UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

**GLAUCIA PANTANO**

# INTERAÇÕES ENTRE AS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SEDIMENTO E METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS: UM ESTUDO NA BACIA HIDROGRÁFICA DO TURVO/GRANDE

**São José do Rio Preto, SP**
**2012**

**GLAUCIA PANTANO**

# INTERAÇÕES ENTRE AS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SEDIMENTO E METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS: UM ESTUDO NA BACIA HIDROGRÁFICA DO TURVO/GRANDE

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Química, área de Química Ambiental junto ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

**São José do Rio Preto, SP**
**2012**

Pantano, Glaucia.
Interação entre as substâncias húmicas de sedimentos e metais potencialmente tóxicos : um estudo na Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande / Glaucia Pantano. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2012.

118 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Altair Benedito Moreira
Co-orientador: Ademir dos Santos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química ambiental. 2. Substâncias húmicas. 3. Metais - Contaminação. 4. Bacias hidrográficas. I. Moreira, Altair Benedito. II. dos Santos, Ademir. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 54:574

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

**GLAUCIA PANTANO**

**Interações entre as Substâncias Húmicas de sedimento e metais potencialmente tóxicos: um estudo na Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Química, área de Química Ambiental junto ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

**BANCA EXAMINADORA**

_____

**Prof. Dr. Altair Benedito Moreira**
**Professor Assistente Doutor**
**Unesp – São José do Rio Preto**
**Orientador**

_____

**Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley**
**Professor Adjunto**
**UEL – Londrina**

_____

**Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida**
**Professor Assistente Doutor**
**Unesp – São José do Rio Preto**

São José do Rio Preto, 20 de Abril de 2012.

**DEDICO**

*Aos meus pais, Angelo e Maria e as minhas irmãs Elisangela e Valéria pelo incentivo, paciência e apoio desde o inicio dessa jornada.*

**AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente à Deus que esteve ao meu lado em todos os momentos, e me deu forças para superar todas as dificuldades.*

*À toda minha família, meus pais Angelo e Maria, minhas irmãs Elisangela e Valéria e meu cunhado Rui pelo carinho, apoio, incentivo.*

*À Capes pela bolsa concedida.*

*Ao professor Dr. Altair B. Moreira pela orientação, confiança, dedicação, paciência e conhecimento transmitido durante toda a realização deste trabalho.*

*À professora Drª. Márcia C. Bisinoti pelo incentivo, colaboração, confiança, ajuda no meu crescimento profissional e por todas as oportunidades que me foram dadas.*

*Ao meu co-orientador Dr. Ademir dos Santos, pela atenção e sugestões dadas durante todo o desenvolvimento do trabalho.*

*Ao professor Dr. Julio Cesar Rocha que cedeu o laboratório no IQ-Araraquara para realização da extração das Substâncias Húmicas.*

*Ao professor Dr. Antônio Aparecido Mozeto por ceder equipamentos para a coleta de sedimentos.*

*À Profª. Drª. Ana Maria Pires e à Profª. Drª. Luciana Camargo de Oliveira pelas valiosas sugestões dadas no exame de qualificação.*

*Aos amigos do LECA, Amanda, Bruno, Bruna, Camila, Fernanda, Flavia, Fabio, Jessica, João Paulo, Naiara, Mariele, Renata e Vitor que me acolheram no laboratório e me ajudaram durante todo o período que permaneci no grupo de pesquisa.*

*Aos amigos Ana Lucia e Carlos, alunos de iniciação cientifica que eu co-orientei e me ajudaram na execução de parte dos experimentos.*

*A todos os professores do DQCA pelos conhecimentos transmitidos que auxiliaram na minha formação.*

*À secretária do departamento Rita e aos técnicos de laboratório Claudinei, Daniela e Eliane que sempre foram prestativos, e me auxiliaram quando precisei.*

*Aos técnicos que me auxiliaram quando precisei.*

*À Cibely S. Martin da UNESP campus de Presidente Prudente que me auxilio nas análises de espectroscopia na região do infravermelho.*

**RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo estudar a interações das Substâncias Húmicas (SH) com os metais cobre(II), cromo(III) e cromo(VI) por meio de dois métodos, o da supressão da fluorescência molecular e o sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial (SUFT). As SH foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas na região do infravermelho e do ultravioleta-visível e por fluorescência molecular. Foram realizadas duas coletas de sedimentos, uma no período de chuva e outra no de seca, sendo coletados em três rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, Rio Preto, Rio Turvo e Rio Grande. O sedimento foi coletado com o auxilio de uma draga manual do tipo Van Veen. As SH foram extraídas de acordo com metodologia oficial sugerida pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH). A constante de estabilidade condicional (Kc) foi determinada por meio da supressão da fluorescência e variou de $5,6x10^{-3}$ – 1,23 em período chuvoso para o íons cobre, e de $5,5x10^{-3}$ – $8,7x10^{-2}$ para o período de seca. Quando a Kc foi determinada para o complexo SH-Cr(III) valores de $1,9x10^{-1}$-$5,2x10^{-1}$ e $2,1x10^{-1}$-$3,5x10^{-1}$, foram determinados para o período de chuva e de seca, respectivamente. Por fim a Kc foi determinada para a interação das SH com Cr(VI), de forma geral os valores de Kc foram maiores para o período de chuva. A capacidade complexante (CC) determinada por meio do SUFT para a interação das SH com cobre(II) teve valores que variaram de $4,0x10^{-1}$ – $6,3x10^{-1}$ mmol Cu $g^{-1}$ SH e de $1,4x10^{-1}$ – $5,3x10^{-1}$ mmol Cu $g^{-1}$ SH para período de chuva e seca, respectivamente. Para o Cr(III) a CC variou de $2,1x10^{-1}$ – $9,7x10^{-1}$ e de $2,6x10^{-1}$ – $8,4x10^{-1}$ mmol Cr $g^{-1}$ SH para o período de chuva e seca, respectivamente. Quando a interação das SH com o Cr(VI) foi estudada por meio do SUFT só foi possível calcular a CC para os pontos NRP e CAPRP, pois para os demais não observou-se a mudança da inclinação da reta necessária para fazer o cálculo. Conclui-se que a sazonalidade influencia na estrutura química das SH; há uma maior interação das SH com Cu(II) e Cr(III) para o período de chuva (maiores valores de Kc); já comportamento contrario foi observado para o cromo(VI). Quando a CC foi determinada para a interação das SH com cobre foi observado maiores valores para o período de chuva comparado ao de seca para os pontos RTURARG e RGRANDE indicando maior interação das SH com o metal no primeiro período; já para o metal Cr(III) a maior interação das SH com o referido metal ocorre no período de chuva apenas para os pontos CAPRP e RGRANDE.

**Palavras chaves**: capacidade complexante, substâncias húmicas, metais, caracterização.

## ABSTRACT

This work aimed to study the interactions of humic substances (HS) with copper(II), chromium(III) and chromium(VI), using by two methods, the suppression of the molecular fluorescence and tangential flow ultrafiltration sytem (TFUS). The HS were characterized by spectroscopic thecniques in the infrared and ultraviolet/visible region and molecular fluorescence. There were two sediment samples, one during the wet season and another the dry, being these sediments collected from the three Rivers of the Turvo/Grande drainage basin, Preto river, Turvo river and Grande river. The collection of sediment was carried out with the aid of a manual Van Veen type dredge. The HS were extracted according to the official methodology suggested by the International Humic Substances Society (IHSS). The conditional stability constant (Kc) was determined by suppressing fluorescence and ranged from $5,6x10^{-3}$ – 1,23 in the wet season for the copper ions, and of the $5,5x10^{-3}$ – $8,7x10^{-2}$ to the dry season. When Kc was determined for the complex HS-Cr(III) values of $1,9x10^{-1}$-$5,2x10^{-1}$ e $2,1x10^{-1}$-$3,5x10^{-1}$, were determined for the wet and dry seasons, respectively. Finally, the Kc was determined for the interactions oh HS with the Cr(VI) in geral the Kc values were higher for the wet season. Complexant capacity (CC) was determined by means of TFUS for the interactions of the HS with Copper(II) the values ranged from $4,0x10^{-1}$ – $6,3x10^{-1}$ mmol Cu $g^{-1}$ HS and of $1,4x10^{-1}$ – $5,3x10^{-1}$ mmol Cu $g^{-1}$ HS for a wet and dry season, respectively. For the Cr(III) CC ranged from $2,1x10^{-1}$ – $9,7x10^{-1}$ and from $2,6x10^{-1}$ – $8,4x10^{-1}$ mmol Cr $g^{-1}$ HS for the wet and dry period, respectively. When the interactions oh HS with Cr(VI) was studied by means of TFUS was only possible to calculate the CC for the points NRP and CAPRP, as for others not observed a change in the slope of the line necessary to make the calculation. We concluded that the seasonality influence on the chemical structure of HS, there is a greater interactions of humic substances with Cu(II) and Cr(III) for the wet season (greater values Kc), while opposite behavior was observed for Cr(VI). When the CC was determined for the interactions of HS with copper was observed higher values for the wet season compared to dry for points RTURARG and RGRANDE indicating greater interactions of HS with this metal in the first period, while for the metal Cr(II) greater interactions of HS with this metal occurs during the wet season only for the points CAPRP and RGRANDE.



Keywords: Capacity complexant, humic substances, metal, characterization.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estrutura química proposta para o ácido húmico por Flaig (1960).....23

**Figura 2.** Estrutura química proposta para o ácido fúlvico por Buffle (1970).....23

**Figura 3.** Estrutura química proposta para o ácido fúlvico por Schnitzer e Khan (1978).....23

**Figura 4.** Estrutura química proposta para os ácidos húmicos por Schulten e Schnitzer (1993)..23

**Figura 5.** Modelo estrutural proposto por Schulten e Schnitzer (1997), onde as esferas azul, vermelhas, brancas e pretas representam os átomos de carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente. As letras A, B e C seriam espaços vazios na molécula.....24

**Figura 6.** Modelo estrutural proposto por Simpson e colaboradores (2002), as esferas vermelhas representam os cátions metálicos, as unidades pretas os polissacarídeos, as unidades azuis os polipeptídios, as unidades verdes as cadeias alifáticas e as marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.....25

**Figura 7.** Mapa esquemático contendo os principais corpos aquáticos, municípios, bem como a localização dos pontos de amostragem de sedimento (1 a 4) representados por pontos em vermelho ao longo dos principais rios da Bacia do Turvo/Grande. (CETESB, 2008).....35

**Figura 8.** Foto dos locais de amostragem a) NRP, b) CAPRP, c) RTURARG e d) RGRNDE....36

**Figura 9.** Equipamento *Jar Test* utilizado na extração das Substâncias Húmicas.....37

**Figura 10.** Cuba de diálise das Substâncias Húmicas.....38

**Figura 11.** Sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial, M1 se refere ao suporte no qual a membrana de 1 KDa é acoplada e P1 a pinça utilizada para fechar o fluxo de SH.....41

**Figura 12.** Porcentagem de metal presente no sedimento e complexado as SH do sedimento a) metal cobre e b) metal cromo.....44

**Figura 13.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH NRP 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.....45

**Figura 14.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH CAPRP 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.....45

**Figura 15.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH RTURARG 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.....46

**Figura 16.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH RGRANDE 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.....46

**Figura 17.** Espectros na região do infravermelho das SH extraídas em a) período de chuva e b) período de seca.....49

**Figura 18.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH CAPRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.....51

**Figura 19.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH NRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.....52

**Figura 20.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH RTURARG com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.....53

**Figura 21.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH RGRANDE com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.....54

**Figura 22.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de chuva no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cobre.....57

**Figura 23.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de seca no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cobre.....57

**Figura 24.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH RTURARG (a) período de chuva e (b) período de seca.....59

**Figura 25.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.....59

**Figura 26.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de chuva no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(III).....62

**Figura 27.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de seca no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(III).....62

**Figura 28.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH RTURARG (a) período de chuva e (b) período de seca.....64

**Figura 29.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.....65

**Figura 30.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de chuva no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....67

**Figura 31.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de seca no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....67

**Figura 32.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizada para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RTURARG extraída em período de chuva.....68

**Figura 33.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizada para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RTURARG extraída em período de seca.....69

**Figura 34.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cr(VI) período de chuva no modo a) emissão e b) sincronizado.....69

**Figura 35.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cr(VI) período de seca no modo a) emissão e b) sincronizado.....70

**Figura 36.** Cinética de complexação da SH CAPRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).....71

**Figura 37.** Cinética de complexação da SH NRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).....72

**Figura 38.** Cinética de complexação da SH RTURARG com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).....72

**Figura 39.** Cinética de complexação da SH RGRANDE com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).....72

**Figura 40.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH NRP coletada a) período de chuva e b) período de seca com o metal cobre(II).....73

**Figura 41.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH NRP coletada a) período de chuva e b) período de seca com o metal cromo(III).....75

**Figura 42.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH NRP coletada a) período de chuva e b) período de seca com o metal cromo(VI).....77

**Figura 43.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).....91

**Figura 44.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).....91

**Figura 45.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).....92

**Figura 46.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).....92

**Figura 47.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).....93

**Figura 48.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).....93

**Figura 49.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH CAPRP (a) período de chuva e (b) período de seca.....94

**Figura 50.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.....94

**Figura 51.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH NRP (a) período de chuva e (b) período de seca.....95

**Figura 52.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.....95

**Figura 53.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH RGRANDE (a) período de chuva e (b) período de seca.....96

**Figura 54.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.....96

**Figura 55.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).....97

**Figura 56.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).....97

**Figura 57.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).....98

**Figura 58.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).....98

**Figura 59.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).....99

**Figura 60.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).....99

**Figura 61.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH CAPRP (a) período de chuva e (b) período de seca.....100

**Figura 62.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.....100

**Figura 63.** Curvas de supressão de fluorescência naa s modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH NRP (a) período de chuva e (b) período de seca.....101

**Figura 64.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.....101

**Figura 65.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH RGRANDE (a) período de chuva e (b) período de seca.....102

**Figura 66.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.....102

**Figura 67.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....103

**Figura 68.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....103

**Figura 69.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....104

**Figura 70.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....104

**Figura 71.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....105

**Figura 72.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).....105

**Figura 73.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH CAPRP extraída em período de chuva.....106

**Figura 74.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.....106

**Figura 75.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH CAPRP extraída em período de seca.....107

**Figura 76.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.....107

**Figura 77.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH NRP extraída em período de chuva.....108

**Figura 78.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.....108

**Figura 79.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH NRP extraída em período de seca.....109

**Figura 80.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.....109

**Figura 81.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RGRANDE em período de chuva.....110

**Figura 82.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cr (VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.....110

**Figura 83.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RGRANDE em período de seca.....111

**Figura 84.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cr (VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.....111

**Figura 85.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH CAPRP coletada a) período de chuva e b) período de seca.....112

**Figura 86.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH RTURARG coletada a) período de chuva e b) período de seca.....112

**Figura 87.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH RGRANDE coletada a) período de chuva e b) período de seca.....113

**Figura 88.** Determinação da Capacidade Complexante da SH CAPRP coletada a) período de chuva e b) período de seca.....114

**Figura 89.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RTRUARG coletada a) período de chuva e b) período de seca.....114

**Figura 90.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RGRANDE coletada a) período de chuva e b) período de seca.....115

**Figura 91.** Determinação da Capacidade Complexante da SH CAPRP coletada a) período de chuva e b) período de seca.....116

**Figura 92.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RTRUARG coletada a) período de chuva e b) período de seca.....116

**Figura 93.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RTRUARG coletada a) período de chuva e b) período de seca.....117

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Número de onda das bandas de absorção e atribuições das SH.....29

**Tabela 2**. Localização dos pontos de amostragem quanto ao município e descrição do tipo de uso e ocupação do solo.....35

**Tabela 3.** Condições Instrumentais utilizadas na determinação dos metais por FAAS.....89

**Tabela 4.** Condições Instrumentais utilizadas na determinação dos metais por GFAAS.....89

**Tabela 5.** Resultados do índice z obtidos no ensaio de proficiência em tecido vegetal.....90

**Tabela 6.** Valores de Concentração dos metais no sedimento e na SH contida no sedimento (sed.).....42

**Tabela 7.** Valores da razão $E_4/E_6$ para as diferentes SH extraídas de sedimentos de rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande.....48

**Tabela 8.** Tempo necessário para estabilização do complexo SH-Metal.....56

**Tabela 9.** Valores da Constante de Estabilidade Condicional Kc para os complexos SH-Cu(II).60

**Tabela 10.** Valores da Constante de Estabilidade Condicional Kc para os complexos SH-Cr(III).....65

**Tabela 11.** Constante de estabilidade Condicional dos complexos SH-Cr(VI).....70

**Tabela 12.** Valores de CC para os complexos SH-Cu(II).....74

**Tabela 13.** Valores de CC para os complexos SH-Cr(III).....76

**Tabela 14.** Valores de CC para os complexos SH-Cr(VI).....78

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABNT -** Associação Brasileira de Normas Técnicas

**Abs -** Absorbância

**AF** - Ácido fúlvico

**AH** – Ácido húmico

**BH-TG** - Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande

**CAPRP -** Captação do Rio Preto

**CC** - Capacidade Complexante

**CETESB** - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

**COT** - Carbono Orgânico Total

**EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**EPA** - *Environmental Protection Agency*

**FAAS** - *Flame Atomic Absorption Spectometry*

**GFAAS** - *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectometry*

**HPSEC –** High Performance Size Exclusion Chromatograph

**HU** - Humina

**IF** - Intensidade de Fluorescência

**IHSS –** International Humic Substances Society

**Kc** - Constante de estabilidade condicional

**NRP** - Nascente do Rio Preto

**RGRANDE** - Rio Grande após receber águas dos rio Preto e Turvo

**RTURARG -** Rio Turvo antes de desaguar no rio Grande

**Sed -** Sedimento

**SH** - Substâncias húmicas

**SHA** - Substâncias húmicas aquática

**SISH** - Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas

**SUFT** - Sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial

**SUMÁRIO**


1. Introdução....20
2. Revisão Bibliográfica....21
   2.1. Substâncias Húmicas e Estrutura Química....21
   2.2. Importância Ambiental das Substâncias Húmicas....25
   2.3. Extração das Substâncias Húmicas....26
   2.4. Caracterização das SH....27
      2.4.1. Fluorescência Molecular....28
      2.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada....28
      2.4.3. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível....29
   2.5. Estudo da Capacidade Complexante das SH com metais....30
      2.5.1. Fluorescência Molecular....30
      2.5.2. Sistema de Ultrafiltração com fluxo tangencial (SUFT)....31
3. Objetivo geral....32
   3.1. Objetivos específicos....32
4. Parte Experimental....32
   4.1. Materiais e equipamentos....32
   4.2. Limpeza das vidrarias....33
   4.3. Soluções e Reagentes....33
      4.3.1. Solução padrão para análises por meio da espectrometria de Absorção Atômica....33
      4.3.2. Solução padrão para experimentos de titulação das SH com os metais....33
   4.4. Locais de Amostragem....33
   4.5. Procedimentos de Amostragem e preservação das amostras....36
   4.6. Extração das Substâncias Húmicas de sedimento....37
   4.7. Purificação das substâncias húmicas....37
   4.8. Quantificação de carbono orgânico total (COT)....38
   4.9. Decomposição das Substâncias húmicas e do sedimento....38
   4.10. Caracterização Estrutural das Substâncias Húmicas....39
      4.10.1. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível....39

4.10.2. Espectroscopia por Fluorescência Molecular.....39
4.10.3. Espectroscopia na região do infravermelho.....39
4.11. Capacidade Complexante das SH por Supressão da Fluorescência.....39
4.11.1. Tempo de complexação.....39
4.11.2. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Metal.....40
4.12. Determinação da Capacidade Complexante das Substâncias Húmicas por meio do Sistema de Ultrafiltração com fluxo tangencial.....40
4.12.1. Tempo de complexação.....40
4.12.2. Determinação da Capacidade complexante das SH por espécies metálicas.....41
4.12.3. Determinação das espécies metálicas.....41
5. Resultados e Discussão.....42
5.1. Decomposição das SH e dos sedimentos.....42
5.2. Caracterização das Substâncias Húmicas.....44
5.2.1. Caracterização por fluorescência molecular.....44
5.2.2. Caracterização por espectroscopia na região do ultravioleta/visível.....47
5.2.3. Caracterização por Espectroscopia na região do Infravermelho.....49
5.3. Estudos de Capacidade de Complexação das SH através da Supressão de Fluorescência.....50
5.3.1. Tempo de Complexação.....50
5.3.2. Interação das SH com Cobre(II) por supressão da fluorescência molecular.....56
5.3.2.1. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Cu(II).....58
5.3.3. Interação das SH com Cromo(III) por supressão da fluorescência molecular.....61
5.3.3.1. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Cr(III).....63
5.3.4. Interação das SH com Cromo(VI) por supressão da fluorescência molecular.....66
5.3.4.1. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Cr(VI).....68
5.4. Estudos da Capacidade Complexante das SH através do Sistema de Ultrafiltração com Fluxo Tangencial (SUFT).....71

5.4.1. Tempo de Complexação.....71
5.4.2. Capacidade Complexante das SH com Cobre(II).....73
5.4.3. Capacidade Complexante das SH com Cromo(III).....75
5.4.4. Capacidade Complexante das SH com Cromo(VI).....77
6. Conclusão.....79
7. Referências Bibliográficas.....80

## 1. Introdução

As Substâncias Húmicas (SH) são compostos orgânicos que apresentam elevada massa molar, coloração escura e estrutura química indefinida. Diversos modelos já foram propostos para elucidar a estrutura química, entretanto nenhum ainda é totalmente aceito pela comunidade científica (Piccolo, 2001; Schulten e Schnitzer, 1997). Mediante isto, a caracterização das SH é muito importante, pois, permite elucidar melhor a sua estrutura química, para isto diversas técnicas vêm sendo utilizadas por vários autores. Dentre elas podemos citar a espectroscopia na região do infravermelho e ultravioleta/visível, análise elementar, ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética eletrônica e fluorescência molecular (Azevedo e Nozaki, 2008; Ferrari et al., 2011; Giovanela et al., 2010; Gusso, 2008; Magdaleno, 2007; Rosa et al., 2000; Sloboda, 2007; Zara et al., 2006; Zhang et al., 2011).

Apesar da grande complexidade da estrutura das SH, grupos funcionais que compõe a sua estrutura química já são bem conhecidos, dos quais podemos citar os grupos carboxílicos, fenólicos, aminídicos e quinônicos. Esses grupos são constituídos principalmente por átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre (átomos doadores de elétrons), os quais são responsáveis por uma importante propriedade ambiental que é a de complexar poluentes ambientais, tais como, pesticidas, herbicidas e principalmente metais. Portanto, estudos que buscam esclarecer o comportamento de poluentes por meio da interação destes com as SH são de grande importância, pois podem contribuir para entender a biodisponibilidade, transporte e toxicidade dos mesmos em ambientes aquáticos (Mastrángelo et al., 2011; Rocha e Rosa, 2003; Rosa et al., 2003; Soler-Rovira et al., 2010; Spierings, et al., 2011).

Uma forma simples e bastante empregada para entender o comportamento de espécies metálicas no ambiente na presença de substâncias húmicas baseia-se na determinação da constante de estabilidade condicional (Kc) do complexo SH-Metal por meio da Técnica de Fluorescência Molecular (Hur e Lee, 2011; Ryan e Weber, 1982; Silva et al., 1998; Zhang et al., 2010). Outra forma para estudar a interação das SH com os metais é empregando um sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial (SUFT), o qual permite determinar a capacidade complexante da SH com o metal estudado (Duarte et al., 2003; Gouveia et al., 2010; Janos, 2003; Mendonça, 2010; Rocha et al., 1999; Romão, 2003; Sargentini et al., 2001).

No presente trabalho foram realizados estudos de interação de substâncias húmicas extraídas de sedimentos com os metais Cu(II), Cr(III) e Cr(VI). O cobre foi escolhido por ser um

metal bastante utilizado em estudos de complexação e também por estar presente naturalmente em ambientes aquáticos, no entanto fontes antropogênicas podem contribuir com a presença deste no ambiente. Por exemplo, a lixiviação de solos nos quais tenham sido aplicado sulfato de cobre para o controle de pragas, assim como o uso de algicidas a base de cobre em águas de recreação, também podem contribuir como fontes antropogênicas no aporte deste metal para o ambiente (Gagneten e Gervasio, 2007; Tadini et al., 2009).

Já as duas formas de cromo mencionadas, foram escolhidas, pois estudos realizados na região (Urânia – SP) encontraram elevados valores de concentração de cromo em água subterrânea para abastecimento público. A concentração deste metal tem sido superior ao valor legislado (0,05 mg $L^{-1}$), chegando a uma concentração de 0,14 mg $L^{-1}$. Nesses estudos são relatados elevadas concentrações de cromo na região da bacia hidrográfica do turvo/grande. Segundo os autores acredita-se que o cromo seja proveniente de origem natural, o qual associou à presença do mineral diopsídio no arenito e ao elevado valor pH do solo (Bertolo et al., 2009). Entretanto, a presença de curtumes na cidade de São José do Rio Preto e região também é discutida como uma possível fonte antropogênica do referido metal para o ambiente. Neste contexto, estudos que buscam entender o comportamento desses metais no ambiente são de extrema importância, principalmente porque são poucos os estudos acerca desta temática na região de estudo em questão.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Substâncias Húmicas e Estrutura Química

As substâncias húmcias (SH) são originadas a partir da degradação de restos de plantas e animais presentes no ambiente e são operacionalmente fracionadas em três frações, o ácido húmico (AH), o ácido fúlvico (AF) e a humina (HU). Estas se diferenciam pela solubilidade em meio alcalino, sendo o primeiro insolúvel em meio ácido, o segundo solúvel em qualquer valor de pH e a humina insolúvel em meio ácido ou básico (Mac Carthy, 2001).

As substâncias húmicas apresentam características bastante peculiares como elevada massa molar, coloração escura, e estrutura química indefinida a qual é constituída por diversas unidades alifáticas e aromáticas.

Desde os anos sessenta, modelos para a estrutura químicas das SH vêm sendo propostos. Flaig (1960) propôs uma possível estrutura para o ácido húmico, onde este seria composto por

anéis aromáticos com substituintes hidroxilas, grupos carboxílicos e quinonas (Figura 1). Já Kononova em 1966 sugeriu que não há diferença significativa entre os ácidos húmicos e fúlvicos, e a humina seria insolúvel em meio alcalino uma vez que estaria fortemente ligada a material inorgânico.

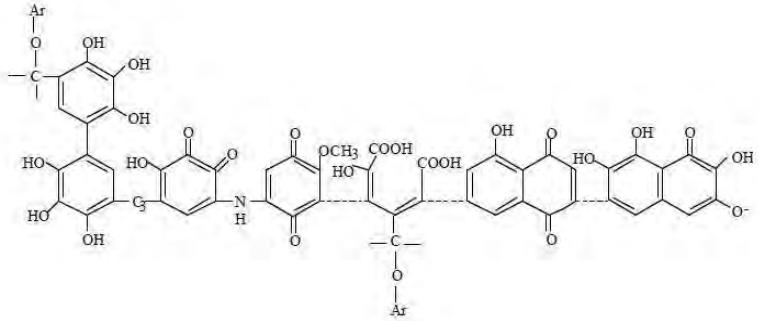


**Figura 1.** Estrutura química proposta para o ácido húmico por Flaig (1960).

Segundo Bufle (1970) os ácidos fúlvicos seriam compostos por grupamentos alifáticos e aromáticos substituídos por grupos químicos contendo oxigênio, como os carboxílicos e cetônicos. Esta estrutura está representada na Figura 2.

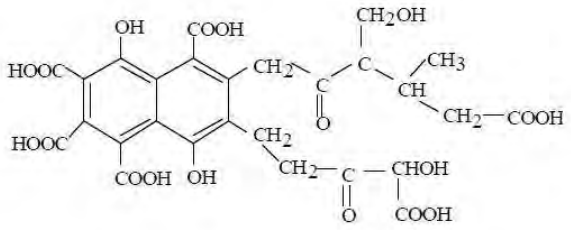


**Figura 2.** Estrutura química proposta para o ácido fúlvico por Buffle (1970).

Schnitzer e Khan (1978) propuseram um modelo para os ácidos fúlvicos, o qual seria formado por grupos ácidos benzenocarboxilicos ligados a grupos fenólicos por meio de ligações de hidrogênio, o que formaria uma estrutura estável e polimérica (Figura 3).

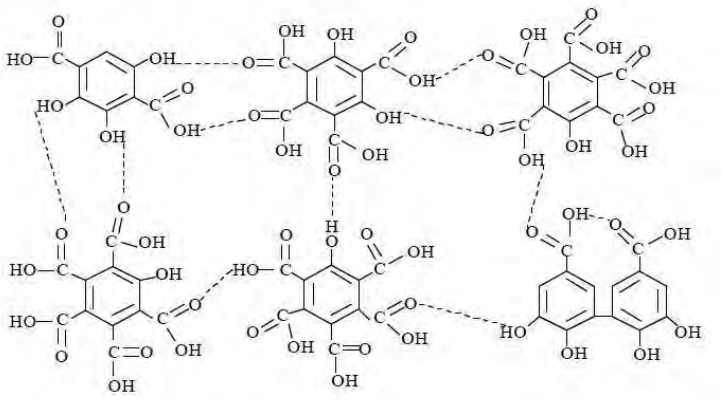


**Figura 3.** Estrutura química proposta para o ácido fúlvico por Schnitzer e Khan (1978).

Em 1993 foi proposto um novo modelo para a estrutura química dos ácidos húmicos. Por meio de estudos espectroscópicos, pirólise e microscopia eletrônica Schulten e Schnitzer (1993) propuseram uma estrutura complexa com vários anéis aromáticos substituídos por diferentes grupos funcionais, como carboxílicos, alcoólicos e fenólicos (Figura 4).

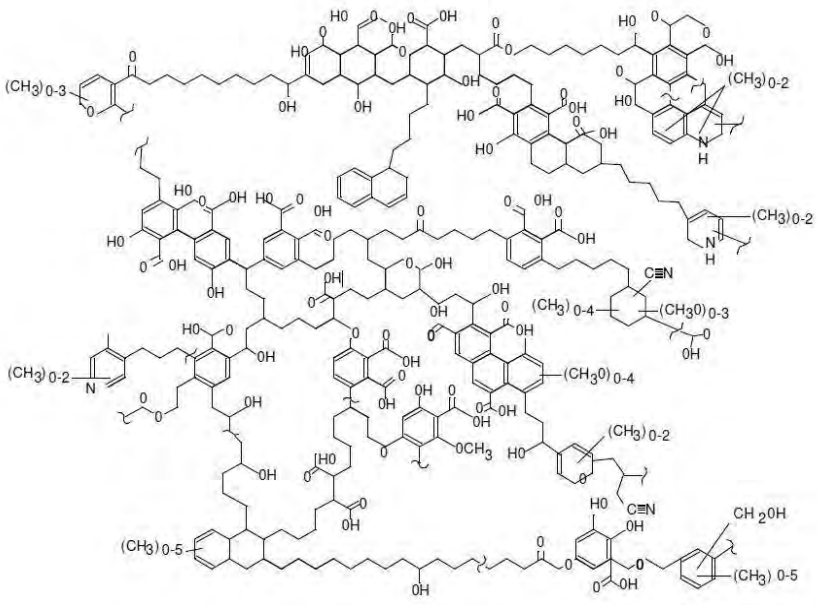


**Figura 4.** Estrutura química proposta para os ácidos húmicos por Schulten e Schnitzer (1993).

Outro modelo foi proposto por Schulten e Schnitzer (1997), este foi chamado de macromolecular, onde a estrutura química seria formada de macromoléculas orgânicas, como

proteínas e polissacarídeos. Além disso, esses autores observaram espaços vazios na estrutura química das SH.

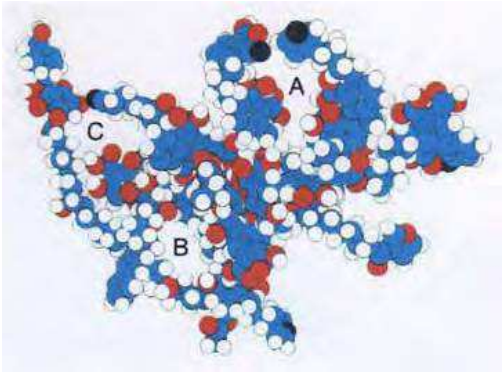



**Figura 5.** Modelo estrutural proposto por Schulten e Schnitzer (1997), onde as esferas azul, vermelhas, brancas e pretas representam os átomos de carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente. As letras A, B e C seriam espaços vazios na molécula.

Por fim, diferentemente dos modelos que consideram as SH como grandes compostos macromoleculares, surge a proposta de que as substâncias húmicas teriam estruturas supramoleculares. Este modelo foi sugerido por diferentes autores, dentre eles, Piccolo (2001) utilizou a técnica de cromatografia de alta resolução de exclusão por tamanho (HPSEC – do inglês high-performance size exclusion chromatograph), obtendo resultados que indicam uma estrutura formada por moléculas pequenas e heterogêneas, unidas principalmente por forças de Van der Walls e ligações de hidrogênio.

O modelo supramolecular propõe uma estrutura auto-organizada em conformações supramoleculares, o que seria responsável pelo grande tamanho aparente das substâncias húmicas. O pH influencia a estrutura química das SH por meio da protonação e consequentemente aumento das ligações de hidrogênio (Piccolo, 2001). Neste conceito os ácidos fúlvicos são associações de pequenas moléculas hidrofílicas, enquanto que os ácidos húmicos são constituídos por associações de estruturas majoritariamente hidrofóbicas.

Simpson e colaboradores (2002) reforçaram a teoria supramolecular, demonstrando que as SH extraídas de solos são formadas por diferentes moléculas de baixa massa molecular (próximo de 200 Da), assim propuseram uma estrutura (Figura 6) para ilustrar o agregado formado por diversas estruturas na presença de cátions metálicos originalmente no ambiente.

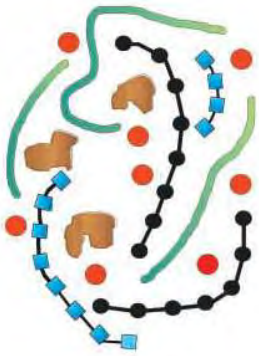


**Figura 6.** Modelo estrutural proposto por Simpson e colaboradores (2002), as esferas vermelhas representam os cátions metálicos, as unidades pretas os polissacarídeos, as unidades azuis os polipeptídios, as unidades verdes as cadeias alifáticas e as marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.

## 2.2. Importância Ambiental das Substâncias Húmicas

As interferências antropogênicas vêm causando impacto ambiental há vários anos, sendo que a degradação de ecossistemas naturais causadas pela liberação antrópica de metais tóxicos é uma das grandes preocupações atuais. Lançamentos de efluentes industriais, domésticos e atividades agrícolas são as principais fontes destes compostos para o ambiente. Cabe ressaltar que a presença de metais tóxicos em corpos aquáticos representa um grave risco à saúde humana, principalmente quando utilizados para o abastecimento público (Santoyo et al., 2000).

As SH possuem uma característica redox dependente das condições do meio, elas podem reduzir espécies como Cr(IV) a Cr(III) alterando a toxicidade dessas espécies, uma vez que a espécie hexavalente é bem mais tóxica que a trivalente (Romão et al., 2002) e também reduzir o íon $Hg^{2+}$ a $Hg^{0}$ sob condições de pH natural (Rocha et al., 2000).

Entretanto, para outros metais como cobre, complexos formados com substâncias húmicas contribuem para a redução da sua toxicidade. Há muitos estudos descritos na literatura acerca dos efeitos das substâncias húmicas sobre a especiação e a toxicidade do íon cobre(II) em corpos aquáticos (Cao, et al., 2004; Lorenzo et al., 2002; Ma, et al., 1999; Nogueira, et al., 2005). Brooks e colaboradores (2007) demonstraram que a toxicidade do cobre está relacionada com a concentração do íon livre no meio aquático e não com a concentração total. Segundo Santos e colaboradores (2008), em ambientes onde há presença de maior quantidade de matéria orgânica

dissolvida ocorre redução da biodisponibilidade do cobre, bem como da toxicidade do metal para zooplânctons.

Wilson e Alhamdani (1997), investigaram os efeitos das substâncias húmicas sobre toxicidade do cromo(VI) utilizando *Azolla caroliana*. Neste contexto, os autores adicionaram cromo em um meio contendo SH e outro sem as substâncias húmicas e constataram que a toxicidade do cromo foi menor no meio que continha substâncias húmicas. Em outro trabalho realizado por Stackhouse e Benson (1989), eles avaliaram a influencia dos ácidos húmicos sobre a toxicidade e biodisponibilidade de duas formas do cromo trivalente (cloreto de cromo e lignosulfonato de cromo) utilizando um invertebrado de água doce, o *Daphnia pulex*. Nos experimentos que continham 98,2 $\mu g\ L^{-1}$ de Cr (cloreto de cromo) e 90,4 $mg\ L^{-1}$ de Cr (lignosulfonato de cromo) e 50 $mg\ L^{-1}$ de ácido húmico foi observado uma diminuição da toxicidade para as duas formas do cromo. Já nas concentrações de 0,5 e 5,0 $mg\ L^{-1}$ de AH não foi observada qualquer influência na toxicidade do cromo dos dois compostos. No entanto, para cloreto de cromo o ácido húmico nas concentrações 5,0 e 50 $mg\ L^{-1}$ diminuiu o percentual de cromo livre presente no meio, sendo que a concentração do metal adicionada foi de 98,2 $\mu g\ L^{-1}$.

Além da importante propriedade de complexar diversos metais, as SH possuem a capacidade de reter água, o que evita o processo de erosão em solos (Stevenson, 1994). Essa classe de compostos também possui a capacidade de formar complexos com micronutrientes essenciais para plantas (Fe, Mn, Cu, Zn, e outros) tornando-os biodisponiveis gradativamente (Santos, 2004).

Uma outra propriedade ambiental tão importante quanto as já descritas acima é a interação das SH com compostos orgânicos, como pesticidas e herbicidas, o que torna esta classe de compostos mais facilmente degradáveis no ambiente.

### 2.3. Extração das Substâncias Húmicas

A extração das SH contidas em sedimentos é comumente realizada empregando-se solventes, sendo que para esses métodos há duas classes de extratores, os moderados e os alcalinos. Os principais extratores moderados são o pirofosfato de sódio ($Na_4P_2O_7$), os agentes complexantes orgânicos em meio aquoso (acetilacetona e 8- hidroxiquinolina), o ácido fórmico, entre outros. Os extratores moderados são menos drásticos na extração, porém também são menos efetivos que os extratores alcalinos. Eles possuem algumas desvantagens, tais como o pirofosfato

de sódio possui poder de extração de até 30% menor em relação aos extratores alcalinos, e ainda o extrato húmico apresenta contaminação por ferro e alumínio (Rosa, 1998).

Já a extração com ácido fórmico, apresenta como desvantagem a possibilidade de solubilizar compostos de natureza não húmica, principalmente polissacarídeos e altas quantidades de Fe, Al e Ca, essa elevada quantidade de contaminantes impossibilita a purificação completa das substâncias húmicas (Rosa, 1998). Por último, os extratores moderados acetilacetona e 8-hidroxiquinolina são pouco efetivos para extração de material orgânico proveniente de solos que não sejam do tipo Spodosol, além disso, o material extraído possui resíduos de cátions metálicos.

Os extratores alcalinos possuem elevado poder de extração, ainda que possam provocar mudanças na estrutura química das SH, eles são os mais empregados (Hur et al., 2009; Wasserman et al., 1998). Os principais extratores alcalinos usados são hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de sódio (NaOH), os quais são utilizados na razão solo/extrator de 1:10 (g:mL). Segundo Toledo et al., 1985 a solução 0,5 mol $L^{-1}$ de NaOH possui uma melhor capacidade de extrair as SH, uma vez que possibilita realizar a extração simultânea dos ácidos húmicos e ácidos fúlvicos.

Apesar da possibilidade de mudança na estrutura química das SH, a extração alcalina tem sido o procedimento mais utilizado e sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH) (Fernandes et al., 2010; Garcia-Mina, 2006; Mendonça, 2010; Rosa, 1998; Town et al., 1992; Zhang et al., 2011). Este método utiliza como agente extrator o NaOH 0,1 mol$L^{-1}$ por um período de 4 horas, sendo que a razão solo/extrator é de 1:10 (m/v) em atmosfera de nitrogênio e à temperatura ambiente (Clapp, et al., 1993).

### 2.4. Caracterização das SH

Sabendo que as SH ainda não possuem uma estrutura química definida até o presente momento, a caracterização das SH é muito importante, pois por meio dela é possível conhecer um pouco mais a respeito sobre sua estrutura química, uma vez que ainda há muitas controvérsias entre pesquisadores. Técnicas espectroscópicas na região do ultravioleta/visível, na região do infravermelho, análise elementar, ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética eletrônica e fluorescência molecular estão entre as mais utilizadas para realizar a caracterização das SH.

### 2.4.1. Fluorescência Molecular

A Fluorescência molecular é uma técnica baseada na emissão de radiação eletromagnética originada a partir da excitação de moléculas. Estas, ao serem excitadas têm seus elétrons em níveis de menor energia promovidos para orbitais mais energéticos, os quais ao retornarem ao estado fundamental emitem luz em comprimento de onda superior ao de excitação (Lakowicz, 1999).

A caracterização por fluorescência molecular pode ser feita pela aquisição de três espectros distintos. Os espectros de emissão são obtidos quando a intensidade de luz emitida em função do comprimento de onda é medida com a excitação realizada em um comprimento de onda fixo (Lombardi e Jardim, 1999). Já espectros de excitação são registrados quando a amostra é excitada em diversos comprimentos de ondas, e a intensidade de luz fluorescente emitida é medida em um comprimento de onda fixo. Por fim, espectros obtidos utilizando a modalidade sincronizada fornecem dados de comprimento de onda de excitação e de emissão paralelamente durante a análise em um intervalo de comprimento de onda constante pré-estabelecido (Lombardi e Jardim, 1999).

Os espectros na modalidade emissão podem fornecer informações a respeito da composição da SH estudada. Os AF e AH apresentam picos de intensidade de emissão de radiação nas regiões de comprimentos de onda de 380-460 nm e 410-480 nm, respectivamente, sendo que os $\lambda$ de excitação podem variar entre 250-260 nm para os ácidos fúlvicos e 300 e 340 nm para os ácidos húmicos (Baker; Genty, 1999).

Os espectros na modalidade sincronizada podem fornecer informações a respeito da presença de aminoácidos aromáticos quando a intensidade de fluorescência (IF) máxima ocorre em regiões de comprimentos de onda entre 260-302 nm; já a região de 302-340 nm está associada a compostos como naftaleno e seus derivados (com dois anéis aromáticos). Em 340-370 nm estão presentes os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos contendo de 3 a 4 anéis, em 370-420 nm com 5 anéis aromáticos e em 438-487 nm compostos com 7 anéis aromáticos (Peuravuori et al., 2002).

### 2.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier

A absorção da radiação na região do infravermelho é referente à energia de vibração e rotação associada às ligações químicas da molécula. Existem dois tipos de vibrações, a de

deformação axial e a de deformação angular a primeira está relacionada à mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo de ligação entre os dois átomos, já a segunda está relacionada à mudança no ângulo de ligação (Silverstein et al., 1994).

A espectroscopia na região do infravermelho pode fornecer informações a respeito dos grupos funcionais que compõem a estrutura química das SH. A Tabela 1 mostra as principais bandas presentes nos espectros das substâncias húmicas e a que tipo de vibração/grupo funcional é referente (Rocha e Rosa, 2003; Stevenson, 1994).

**Tabela 1.** Número de onda das bandas de absorção e atribuições das SH.

| **Número de onda / $cm^{-1}$** | **Atribuições** |
|---|---|
| 3500 – 3300 | Estiramento OH de alcoóis e/ou fenóis e/ou ácidos carboxílicos |
| 3200 | Estiramento CH de alcenos e/ou aromáticos |
| ~ 2930 – 2860 | Estiramento CH alifáticos |
| 1710 – 1720 | C=O de cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos |
| 1630 – 1650 | C-O de íons carboxilatos aromáticos, C=C de alcenos e/ou aromáticos, C=O e deformação N-H de amidas aromáticas |
| ~ 1580 | Estiramento C=C aromático |
| 1380 – 1420 | C-H alifáticos, OH de alcoóis e ácidos |
| 1240 | C-O de alcoóis e fenóis |
| ~ 1030 e 1080 | C-O de alcoóis, fenóis, éteres, ésteres e ácidos carboxílicos |
| 950 – 670 | Deformação CH de anéis aromáticos |

### 2.4.3. Espectroscopia na região do ultravioleta/visível

A espectroscopia na região do ultravioleta/visível, no caso de compostos de natureza molecular, possibilita identificar transição de elétrons $\pi$ em duplas ligações conjugadas e reações de transferência de elétrons de grupos adjacentes. Os grupos que contém estes elétrons são denominados de cromóforos. A absorção da energia acontece quando os elétrons de orbitais de

menor energia passam para orbitais de maior energia. A coloração escura das substâncias húmicas pode ser atribuída às ligações duplas conjugadas aleatoriamente, e assim essa coloração permite que o grau de humificação seja avaliado (Budziak, 2002).

Os valores de razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm, referida razão $E_4/E_6$ são amplamente utilizadas para caracterizar as SH (Fontana, 2009; Santos, 2008; Saab e Martin-Neto, 2007; Zara et al., 2006). O comprimento de onda de 465 nm é atribuído a absorbância de grupos alifáticos, já em 665 nm é atribuído a absorbância de grupos aromáticos, sendo que o valor desta razão diminui com o aumento da massa molecular e com a condensação dos anéis, podendo assim ser utilizada como um indicador do grau de condensação das SH, conseqüentemente do grau de humificação (Stevenson, 1994).

## 2.5. Estudo da Capacidade Complexante das SH com metais

### 2.5.1. Fluorescência Molecular

As SH possuem grupos cromóforos, os quais são responsáveis pela emissão de fluorescência das mesmas. Entretanto, esta emissão pode ser suprimida quando íons metálicos se ligam às SH formando complexo SH-Metal, sendo que este comportamento ocorre principalmente quando os metais são íons paramagnéticos (Lombardi e Jardim, 1997). Estudo da interação das SH com metais pode ser realizado por meio da supressão da intensidade de fluorescência, sendo assim é possível determinar a constante de estabilidade condicional (Kc) do complexo SH-Metal e por meio desta inferir na disponibilidade do metal livre no ambiente aquático (Hur e Lee, 2011; Lavrik et al., 2010; Magdaleno, 2007; Melo, 2010; Silva et al., 1998; Terbouche et al., 2010).

A equação 1, a qual correspondente à reação de complexação entre as SH e o metal está representada a seguir:

$$M_{(aq)} + L_{(aq)} \leftrightarrows ML_{(aq)} \quad (1)$$

onde, M corresponde ao íon metálico paramagnético, L ao sítio ligante disponível nas substâncias húmicas e ML o complexo formado entre a SH e o metal. A constante de estabilidade condicional Kc pode ser calculada empregando-se a equação 2:

$$Kc = \frac{[M][L]}{[ML]} \quad (2)$$

Sabendo-se que a supressão de fluorescência é observada com as sucessivas adições de metal e assumindo que a reação é 1:1 (metal:ligante) uma interpretação dos dados desta diminuição da IF pode ser realizada utilizando o modelo de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) demonstrado pela equação 3:

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{f} + \frac{1}{(f.Kc.[M])} \quad (3)$$

onde $I_o$ é a intensidade de fluorescência que as Substâncias Húmicas apresenta na ausência de íons metálicos, $\Delta I$ corresponde a $I_o - I$, onde I = intensidade de fluorescência da SH após cada adição do metal e [M] a concentração do metal livre. Quando um gráfico de $I_o/\Delta I$ versus 1/[M] é linear, Kc e *f* podem ser calculados pelo coeficiente angular (1/((*f* Kc)) e pela intersecção da reta (1/*f*). Para a obtenção da Kc considera-se $C_M \approx [M]$, uma vez que apenas a concentração do metal adicionado ($C_M$) é conhecida.

### 2.5.2. Sistema de Ultrafiltração com fluxo tangencial (SUFT)

A capacidade complexante das SH pode ser estudada utilizando um sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial. Neste sistema, uma membrana de *polyethersulfone* de 1 KDa é colocada e por esta uma solução do ligante (SH) e do metal é impulsionada por uma bomba peristáltica, a qual passa tangencialmente à membrana e apenas metais livres e/ou complexos SH-Metal menor que 1 KDa será coletado. O metal livre nesta solução é posteriormente quantificado por meio da espectrometria de Absorção Atômica. Desta forma, por meio deste sistema é possível separar o metal livre daquele ligado à SH. Este sistema tem sido bastante utilizado para estudar a interação das SH com íons metálicos (Burba et al., 2001; Gouveia et al., 2010; Janos, 2003; Mendonça, 2010; Rocha et al., 1999; Sargentini et al., 2001).

Quando as substâncias húmicas é titulada com o íon metálico primeiramente ocorre saturação dos sítios ligantes mais fortes e depois dos mais fracos. Essa diferença na força dos ligantes faz com que haja uma mudança na inclinação da curva de titulação, desta forma na intersecção das duas secções lineares é determinado o valor da capacidade complexante das SH (Einax; Kunze, 1996 apud Mendonça, 2010; Romão et al., 2003; Town e Powell, 1993).

## 3. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as Substâncias Húmicas de sedimentos amostrados nos rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande e estudar a interação SH-Metal por meio da capacidade complexante e da constante de estabilidade condicional das SH extraídas de sedimentos com os metais cobre(II), cromo(III) e cromo(VI).

### 3.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar as SH por meio das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível, fluorescência molecular e análise elementar.
- Estudar a capacidade complexante das Substâncias Húmicas frente aos metais cobre(II), cromo(III) e cromo(VI) por meio de dois métodos distintos, o sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial e o de supressão do sinal de fluorescência no modo de fenda fixa e sincronizada.
- Determinar a Constante de Estabilidade Condicional do Complexo SH-Metal por meio da técnica de Fluorescência, assim como determinar a capacidade complexante das SH utilizando o Sistema de Ultrafiltração com Fluxo Tangencial.
- Verificar a influência da sazonalidade na estrutura química das SH e na capacidade complexante dessa classe de compostos.

## 4. Parte Experimental

### 4.1. Materiais e equipamentos

Os seguintes materiais e equipamentos foram necessários para o desenvolvimento do presente estudo:

A) Sistema de produção de água deionizada (Millipore, modelo Direct-Q), B) Vidrarias (Laborglas), C) Espectrofotômetro modelo IR Affinity-1 (Shimadzu), D) Balança analítica (Shimadzu AX200), E) Micropipetas (Eppendorfs - Research), F) Analisador de Carbono Orgânico Total (Shimadzu, TOC-VCSH), G) Espectrofluorímetro (Varian, Cary Eclipse), H) Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização por Chama (FAAS), (Varian, AA240FS), I) Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização por forno de grafite (GFAAS), (Varian, AA280Z), J) Destilador de Ácido Sub-Boiling (Marconi), K) Sala limpa com Capela de Fluxo

Laminar (Marconi), L) Espectrofotômetro de UV-VIS (Femto, 700 Plus), M) Medidor Multiparâmetro pH/Cond/TDS/Temp (Hanna, HI991300), N) Bomba peristáltica (Ismatec, IPC931C), O) Aparelho Jar Test (JT 102.6, Milan ).

### 4.2. Limpeza das vidrarias

As vidrarias (balão volumétrico, béquer e pipetas) e recipientes plásticos (frascos de armazenamento de soluções, bandejas plásticas e eppendorf) empregados no presente trabalho foram lavadas por várias vezes com água, em seguida foram mantidas em um banho ácido HCl 10% (v/v) por no mínimo 24 horas. Antes do uso, os materiais foram lavados três vezes com água deionizada.

### 4.3. Soluções e Reagentes

Todas as soluções foram preparadas por diluição e/ou dissoluções de reagentes com elevado grau de pureza. O ácido nítrico utilizado para preparo de padrões foi destilado em destilador sub-boiling anterior ao seu emprego.

#### 4.3.1. Solução padrão para análises por meio da espectrometria de Absorção Atômica

Todas as soluções padrões foram preparadas a partir de padrões de 1000 mg $L^{-1}$ da marca Aldrich ou Fluka.

#### 4.3.2. Solução padrão para experimentos de titulação das SH com os metais

As soluções estoques de 1000 mg $L^{-1}$ foram preparadas a partir dos sais dos metais, para isto foram usados cloreto de cobre, nitrato de cromo(III) e dicromato de potássio para preparo das soluções de cobre, cromo(III) e cromo(VI), respectivamente.

### 4.4. Locais de Amostragem

A região de estudo, Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande (BH-TG), possui uma área de drenagem de 15.925 $km^2$; os corpos aquáticos têm sido empregados para diversos fins como abastecimento, irrigação, geração de energia, afastamento de efluentes domésticos, pesca, lazer, dentre outros. As áreas rurais são impactadas principalmente pela atividade agropecuária, a qual

gera problemas como a erosão e contaminação por agroquímicos provenientes das culturas de cana-de-açúcar e laranja (Instituto de Economia Agrícola, 2009).

A cultura de cana-de-açúcar vem crescendo na BH-TG, o que gera preocupações, uma vez que estudos relatam que esta cultura pode gerar a salinização de solos devido a utilização da vinhaça (Ferraresi, 2011; Madejon et al., 2001). Já o lançamento de efluentes domésticos é uma fonte de poluentes das áreas urbanas, a porcentagem da população da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande que é atendida pelo tratamento de esgotos é de 73% (CETESB, 2010). Desta forma, estudos que visam realizar a caracterização de SH de sedimentos de rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande e avaliar o comportamento de metais na presença das referidas substâncias húmicas são importante para verificar a disponibilidade e toxicidade de metais.

Foram realizadas duas amostragens de sedimento em quatro pontos dos rios da Bacia Hidrográfica Turvo/Grande, sendo uma no mês de fevereiro de 2010 (período de chuva) e outra em julho de 2010 (período de seca). Os pontos de amostragens estão ilustrados na Figura 7, estes locais foram escolhidos baseado em estudo realizado por Melo (2010), neste foi monitorado dez pontos na BH-TG, nos quais foram determinadas as concentrações de dez metais, sendo que o cobre e o cromo apresentaram maiores concentrações nos quatro pontos escolhidos para o presente estudo.

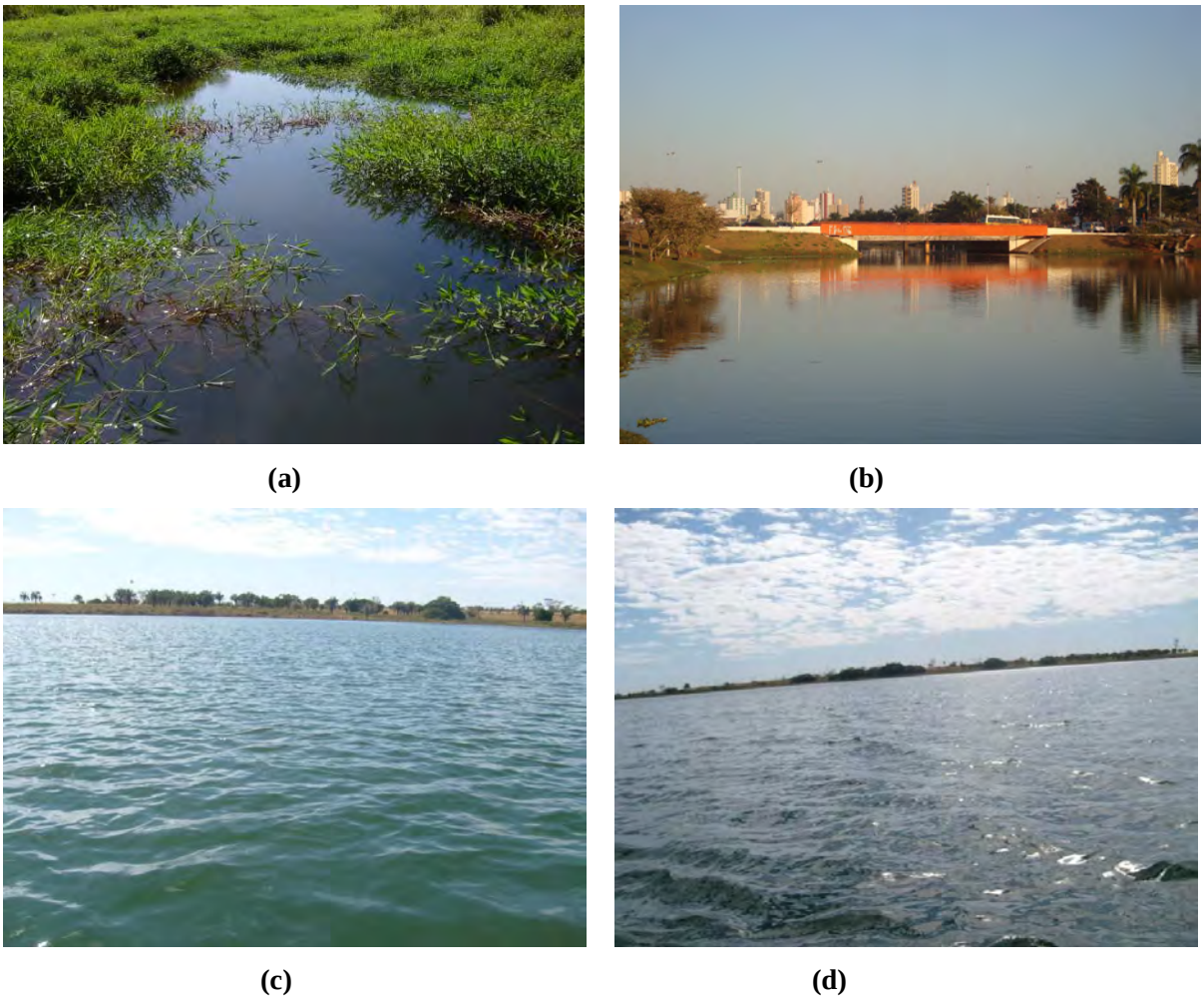
**Figura 7.** Mapa esquemático contendo os principais corpos aquáticos, municípios, bem como a localização dos pontos de amostragem de sedimento (1 a 4) representados por pontos em vermelho ao longo dos principais rios da Bacia do Turvo/Grande. (CETESB, 2008)

A descrição das coordenadas geográficas de cada ponto está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2**. Localização dos pontos de amostragem quanto ao município e descrição do tipo de uso e ocupação do solo.

| Locais de amostragens | Siglas | Corpo Hídrico | Município | Coordenadas geográficas | Tipo de uso do solo |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Nascente do Rio Preto | NRP | Rio Preto | Cedral | S20º55’11,3’’ W049º17’59,9’’ | Área de referência |
| 2. Captação do Rio Preto | CAPRP | Rio Preto | São José do Rio Preto | S20º48’29,2’’ W049º22’24,1’’ | Área urbana |
| 3. Rio Turvo antes de desaguar no Rio Grande | RTURARG | Rio Turvo | Cardoso | S19º58’09,8’’ W049º53’37,1’’ | Pastagem / cana-de-açúcar |
| 4. Rio Grande após receber água dos Rios Preto e Turvo | RGRANDE | Rio Grande | Cardoso | S19º58’09,8’’ W049º53’37,1’’ | Pastagem / cana-de-açúcar |

A Figura 8 ilustra as fotos dos quatro locais de amostragem selecionados ao longo dos rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande.



**(a)** **(b)**

**(c)** **(d)**

**Figura 8.** Foto dos locais de amostragem a) NRP, b) CAPRP, c) RTURARG e d) RGRANDE.

### 4.5. Procedimentos de amostragens e preservação de amostras

Os sedimentos superficiais foram coletados com o auxílio de uma draga manual do tipo Van Veen e em seguida armazenados em sacos plásticos e mantidos refrigerados. A amostragem e a preservação do sedimento seguiram recomendações oficiais, como a proposta pela NBR 9898 (ABNT, 1987) e o método 2016 da EPA (EPA, 1994).

Os sedimentos foram secos em bandejas de plástico previamente descontaminadas. A secagem foi realizada em temperatura ambiente na capela de exaustão. Posterior à secagem as raízes e folhas foram retiradas e, por fim, os sedimentos foram macerados em grau de porcelana e

passados em peneira de 0,2 mm. Depois de peneirado, o sedimento foi armazenado em sacos plásticos para posterior extração das substâncias húmicas.

### 4.6. Extração das Substâncias Húmicas de Sedimento

Em aproximadamente 150 g de sedimentos foram adicionados 1,5 L de NaOH 0,1 mol $L^{-1}$. Deixou-se a mistura sob agitação mecânica por 4 horas em atmosfera de nitrogênio em um equipamento Jar Test, como ilustrado na Figura 9. Após a extração centrifugou-se a 3000 rpm por 15 minutos, separando o resíduo (humina) do sobrenadante (ácido húmico + ácido fúlvico). A humina foi descartada e o sobrenadante foi acidificado com HCl 1 mol $L^{-1}$ para pH entre 5 e 6.

**Figura 9.** Equipamento *Jar Test* utilizado na extração das Substâncias Húmicas.

### 4.7. Purificação das Substâncias Húmicas

Para a realização das caracterizações das SH e do estudo de complexação foi necessário que estas estivessem puras, assim foi realizada a diálise para a remoção do excesso de sais dissolvidos.

As membranas de diálise eram de celulose regenerada da marca fischer scientific, as quais foram tratadas com solução de $NaHCO_3$ 2% (m/v) e $Na_2EDTA$ 0,01 mol $L^{-1}$ por 10 minutos, logo depois elas foram lavadas com água deionizada a 65 ºC. As membranas tratadas foram armazenadas a 4 ºC em água deionizada (Town & Powell, 1992).

Depois de tratadas, as membranas de diálise foram preenchidas com o extrato das substâncias húmicas e submersas em um recipiente plástico com água deionizada (Figura 10). Esta água foi substituída diariamente até quando a sua condutividade apresentasse valor próximo a da água que foi utilizada inicialmente (S = 1,8 μS $cm^{-1}$). Para confirmar que todo o sal já havia

sido removido foi realizado teste para presença de íons cloreto com uma solução de nitrato de prata 0,1 mol $L^{-1}$. Em seguida parte do extrato foi seco e outra parte foi armazenada para posterior estudo em solução.

**Figura 10.** Cuba de diálise das Substâncias Húmicas empregando-se membranas de celulose regenerada.

### 4.8. Quantificação de carbono orgânico total (COT)

A quantificação de carbono orgânico total foi feita empregando-se um Analisador de Carbono Orgânico Total (Shimadzu, TOC-VCSN).

### 4.9. Decomposição das Substâncias húmicas e do sedimento

A decomposição das amostras de sedimentos foram realizadas de acordo Método 3050B da EPA (1996). Adicionou-se 10,0 mL de $HNO_3$ 1:1 (v/v) à aproximadamente 1,5 g de amostra, aqueceu-se a 95 ºC por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de $HNO_3$ concentrado a mistura e aqueceu-se novamente a 95 ºC por 2 horas. Em seguida, após a amostra ter resfriado, adicionou-se 2,0 mL de água deionizada e 3,0 mL de peróxido $H_2O_2$ 30% (v/v), aquecendo novamente a mistura a 95 ºC por 2 horas. No final a amostra foi filtrada com papel de filtro whatman nº 41 e o filtrado foi coletado em um balão de 100,0 mL, aferindo-se o volume com água deionizada. Esse procedimento foi realizado em triplicata para amostras, branco e amostra de referência certificada.

A decomposição das susbtâncias húmicas também foi realizada por meio da decomposição ácida com $HNO_3$ e $H_2O_2$. Adicionou-se 10,0 mL de SH em erlenmeyers, deixou-se secar a 55ºC em estufa. Em seguida, no mesmo frasco adicionou-se 2,0 mL de $HNO_3$ concentrado destilado em destilador de ácido "*subboiling*", e 2,0 mL de $H_2O_2$ 30% (v/v). Cobriram-se os erlenmeyers e aqueceu-se em chapa a 95ºC por 2 horas. Em seguida as amostras foram filtradas

com papel filtro whatman nº 41 e o filtrado foi coletado em um balão de 50,0 mL (Junior et al., 2001).

## 4.10. Caracterização Estrutural das Substâncias Húmicas

### 4.10.1. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

Em 100,0 mL de solução de $NaHCO_3$ 0,005 mol $L^{-1}$ foram solubilizadas 2,0 mg das amostras de SH extraídas. As leituras de absorbância das soluções de SH foram realizadas em 465 e 665 nm, determinando assim a razão $E_4/E_6$ (Sanches, et al., 2007).

### 4.10.2. Espectroscopia por Fluorescência Molecular

Foram obtidos espectros de emissão de fluorescência na faixa entre 350 e 650 nm, sendo que o comprimento de onda de excitação foi fixado em 332 nm. Espectros de fluorescência sincronizada foram obtidos na região de 240 a 700 nm, utilizando um intervalo entre os comprimentos de onda de excitação e emissão de $\Delta\lambda$ = 20 nm (Melo, 2010).

### 4.10.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 $cm^{-1}$, com resolução 4 $cm^{-1}$ e 100 varreduras. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr na proporção de 100:1 (Kbr:Amostra) (Sanches, et al., 2007).

## 4.11. Interação das SH com metais por Supressão de Fluorescência

A interação entre as substâncias húmicas e o metal foi determinada por meio do efeito de supressão da fluorescência da SH com a adição do metal. Para isto, soluções de substâncias húmicas extraída de sedimentos dos diferentes pontos de amostragem foram monitoradas. Para avaliar a supressão da fluorescência foi empregado o modo de emissão na modalidade sincronizada.

### 4.11.1. Tempo de complexação

Experimentos a fim de avaliar o tempo para estabilização do complexo SH-Metal foram realizados. Para isto, em um volume de 50,0 mL de solução SH contendo 12,0 mg $L^{-1}$ de Carbono Orgânico Total (COT) foi adicionado 7,0 mg $L^{-1}$ de metal. As soluções foram mantidas sob

agitação magnética e a cada 5 minutos espectros de fluorescência no modo emissão e sincronizada foram obtidos. Esses estudos foram realizados para as SH extraídas de sedimentos dos diferentes pontos de amostragem, com cobre(II), cromo(III) e cromo(VI).

#### 4.11.2. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Metal

Para a determinação da constante de estabilidade condicional foi utilizado um volume de 50,0 mL de SH contendo 12,0 mg $L^{-1}$ de COT, a qual foi transferida para um béquer mantendo-se sob agitação magnética constante. Em seguida alíquotas da solução de metal foram adicionadas de tempo em tempo (tempo determinado como descrito no item 4.11.1) e varreduras de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizada foram realizadas. O tempo zero corresponde ao espectro da SH sem adição do metal. As adições de metal foram realizadas até que não fosse verificada alteração da intensidade de fluorescência.

### 4.12. Interação das SH com metais por meio do Sistema de Ultrafiltração com fluxo tangencial

O estudo de complexação entre os metais e as SH também foi feito utilizando um sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial. Para este estudo foi colocado uma membrana de *polyethersulfone* de 1 KDa, a qual impede a passagem das SH e dos complexos SH-Metal com tamanho molecular maior que 1 KDa. Deste modo, os íons metálicos livres não complexados às SH ou trocados por elas passam pela membrana e podem ser quantificados por espectrometria de absorção atômica (Burba et al., 2001).

#### 4.12.1. Tempo de complexação

O tempo de complexação foi determinado utilizando-se um volume de 100,0 mL de solução de SH 100,0 mg $L^{-1}$ e nesta adicionado o metal numa concentração de 7,12 mg $L^{-1}$. As soluções foram mantidas sob agitação magnética e a cada 5 minutos alíquotas de 2,0 mL eram retiradas. A primeira alíquota retirada é referente à SH sem adição do metal. Esses estudos foram realizados para os metais cobre(II) e cromo(III) com todas as substâncias húmicas.

### 4.12.2. Determinação da Capacidade Complexante das SH por espécies metálicas

Para a determinação da capacidade complexante, um volume de 100,0 mL de solução de SH 100,0 mg $L^{-1}$ foi utilizado. Para isto, este volume foi bombeado pelo sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial contendo uma membrana de 1 kDa por cerca de cinco minutos antes da adição do metal (Figura 11). Em seguida filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), sendo esta correspondente ao tempo zero (antes da adição do metal). Na sequência foi adicionado alíquotas de solução dos metais à solução de SH para atingir concentrações finais que vão de 5,0 µg $L^{-1}$ a 7,0 mg $L^{-1}$. Depois de alcançado cada equilíbrio (tempo necessário para complexação), e com agitação permanente, alíquotas (cerca de 2 mL) da solução foram coletadas contendo íons $Cu^{2+}$ e $Cr^{3+}$ isolados pelo procedimento de filtração.

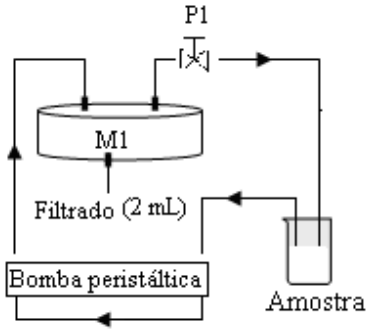



**Figura 11.** Sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial, M1 se refere ao suporte no qual a membrana de 1 KDa é acoplada e P1 a pinça utilizada para fechar o fluxo de SH.

### 4.12.3. Determinação das Espécies Metálicas

No filtrado, a concentração do metal livre foi determinada utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização por Chama (FAAS) ou Espectrômetro de Absorção Atômica com Atomização por Forno de grafite (GFAAS), de acordo com a quantidade adicionada do metal. As condições instrumentais utilizadas na determinação dos metais cobre e cromo por FAAS e GFAAS estão apresentadas nas tabelas 3 e 4 no anexo A.

O Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais, no qual este trabalho foi desenvolvido, participou do ensaio de proficiência em determinação de metais em amostras de tecido vegetal no ano de 2010. Os resultados estão apresentados na tabela 5 no anexo B.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Decomposição das SH e dos sedimentos

Em rios, os sedimentos são um compartimento que podem atuar como sumidouro ou fonte potencial de contaminantes. As SH de sedimentos podem exercer importante papel no controle e biodisponibilidade de espécies metálicas para o ambiente aquático.

Analisando os dados da Tabela 6 é possível verificar que o teor de cobre no sedimento foi maior para o ponto RTURVO no período de chuva (63,18 mg Cu $kg^{-1}$ sed.) e para NRP no de seca (71,36 mg Cu $kg^{-1}$ sed.), sendo que o primeiro ponto se refere a uma área de cultivo de cana-de-açúcar e laranja, e o segundo é referente a uma área rural. Já para o metal cromo, o maior teor é encontrado no ponto CAPRP no período de chuva (54,83 mg Cr $kg^{-1}$ sed.) e no NRP no período de seca (46,74 mg Cr $kg^{-1}$ sed.), sendo que o primeiro ponto se referem a uma represa empregada para fins de abastecimento público em área urbana, este local é receptor de efluentes domésticos e o segundo a uma área tipicamente rural.

**Tabela 6.** Valores de Concentração dos metais no sedimento e na SH contida no sedimento (sed.).

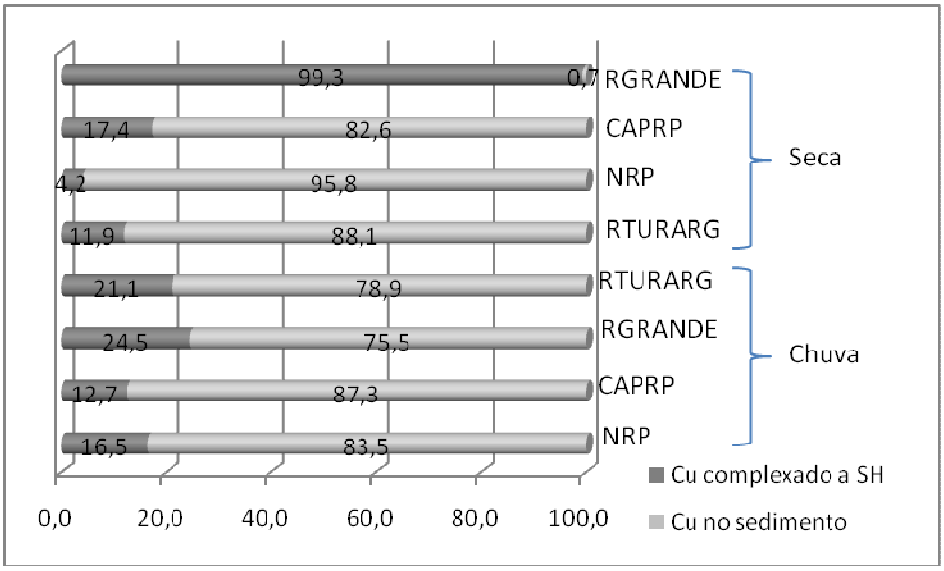
| Período da coleta | Local amostragem | Metal na SH (mg metal $kg^{-1}$ sed.) | | Metal no sedimento (mg metal $kg^{-1}$ sed.) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Cu | Cr | Cu | Cr |
| Chuva | NRP | 1,42 ±0,02 | 0,79 ± 0,05 | 8,62 ± 0,17 | 23,30 ± 0,77 |
| | CAPRP | 7,23 ± 0,08 | 6,02 ± 0,20 | 57,07 ± 0,67 | 54,83 ± 0,66 |
| | RTURARG | 13,33 ± 0,10 | 3,03 ± 0,11 | 63,18 ± 0,42 | 44,98 ± 0,41 |
| | RGRANDE | 7,32 ± 0,08 | 1,06 ± 0,02 | 29,82 ± 0,57 | 30,08 ± 1,07 |
| Seca | NRP | 2,99 ± 0,16 | 12,07 ± 0,79 | 71,36 ± 0,96 | 46,74 ± 0,44 |
| | CAPRP | 9,53 ± 0,18 | 7,69 ± 0,26 | 54,87 ± 0,12 | 37,25 ± 0,59 |
| | RTURARG | 4,91 ± 0,47 | 1,45 ± 0,12 | 41,26 ± 0,53 | 41,00 ± 0,49 |
| | RGRANDE | 12,82 ± 0,29 | 1,57 ± 0,10 | 12,91 ± 0,07 | 27,20 ± 0,21 |

Observando a Figura 12a, foi possível verificar que a porcentagem de cobre presente no sedimento que está complexado a SH foi maior para o ponto RGRANDE (24,5% e 99,3%, para período de chuva e seca, respectivamente). Já o menor valor deste metal presente no sedimento que está complexado a SH é referente ao ponto CAPRP e NRP (12,7% e 4,2%, para período de

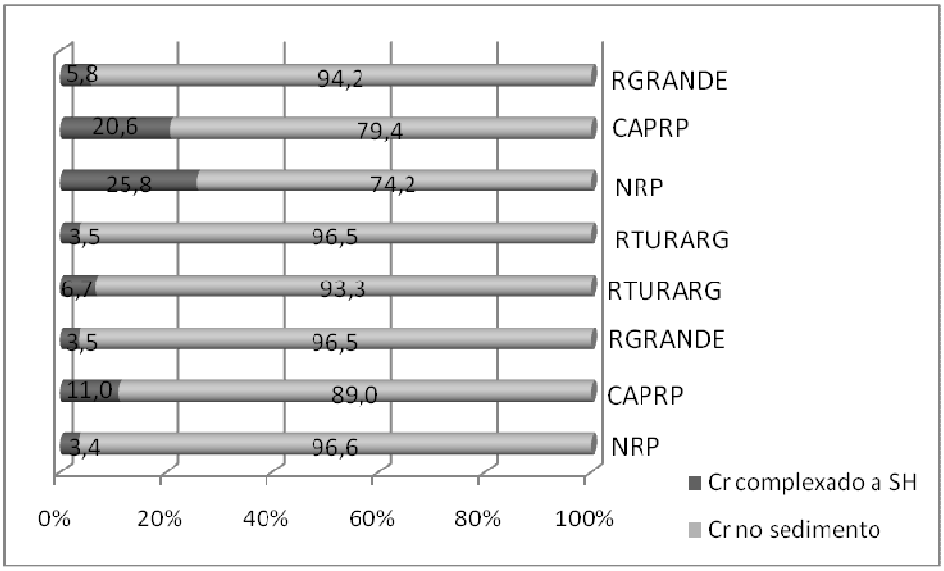
chuva e seca, respectivamente). Quando o metal cromo foi estudado (Figura 12b) foi possível constatar que a maior porcentagem de metal complexado as SH presente no sedimento é referente ao ponto CAPRP e NRP (11,0% e 25,8% para os períodos de chuva e seca, respectivamente). Enquanto que a menor porcentagem complexada a SH está no local NRP e RTURARG para os períodos de chuva e seca, respectivamente.

Analisando os períodos é possível inferir que para o de chuva quanto maior a concentração do metal cobre e cromo presente no sedimento, maior é a quantidade destes metais que está ligado as SH, desta forma menor é a concentração que está associada a outras frações geoquímicas, tais como, óxidos de Fe/Mn, carbonatos, sulfetos e fração residual (Soto-Jiménez, M. e Páez-Osuma, 2010). Já para o período de seca não foi possível estabelecer esta correlação, uma vez que o local de maior teor do metal não foi necessariamente o local que teve maior porcentagem do metal complexado às SH.

Foi possível verificar que uma parte dos metais presentes nos sedimentos está complexado às SH, isto ocorre principalmente devido a grande quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio presentes na estrutura química das SH. Assim, parte dos teores de metais presentes nos sedimentos não está disponíveis para o ambiente. Logo, é possível inferir que as SH podem atuar diminuindo a biodisponibilidade dos metais para o corpo aquático.




(a)




(b)

**Figura 12.** Porcentagem de metal presente no sedimento e complexado as SH do sedimento a) metal cobre e b) metal cromo.

## 5.2. Caracterização das Substâncias Húmicas

### 5.2.1. Caracterização por fluorescência molecular

Algumas estruturas orgânicas presentes nas SH podem ser identificadas observando os espectros de Fluorescência Molecular. Espectros nas modalidades emissão e sincronizada foram obtidos a partir de diferentes substâncias húmicas estudadas, os quais estão apresentados nas Figuras 13 a 16.

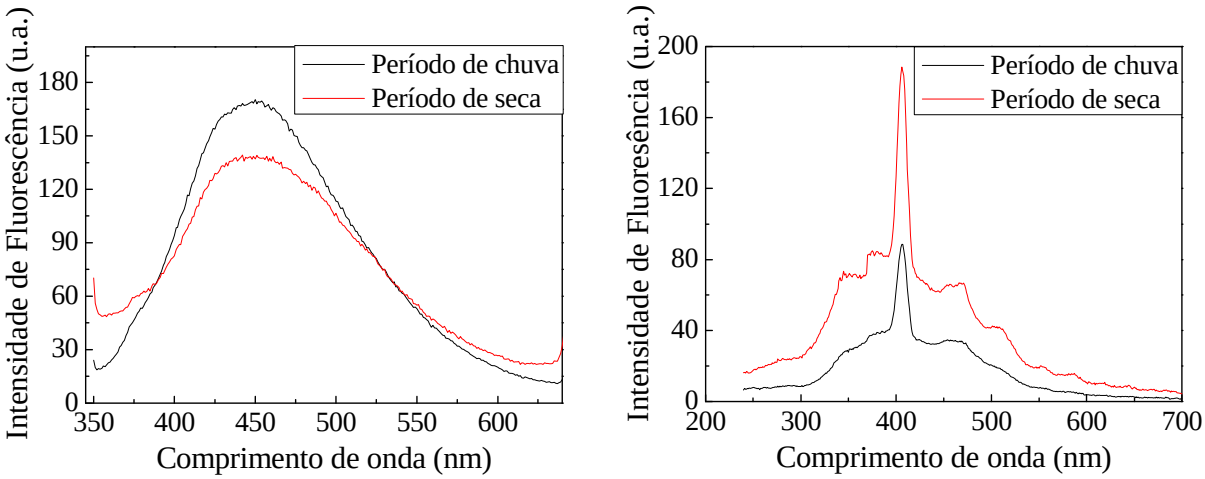



**Figura 13.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH NRP 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.

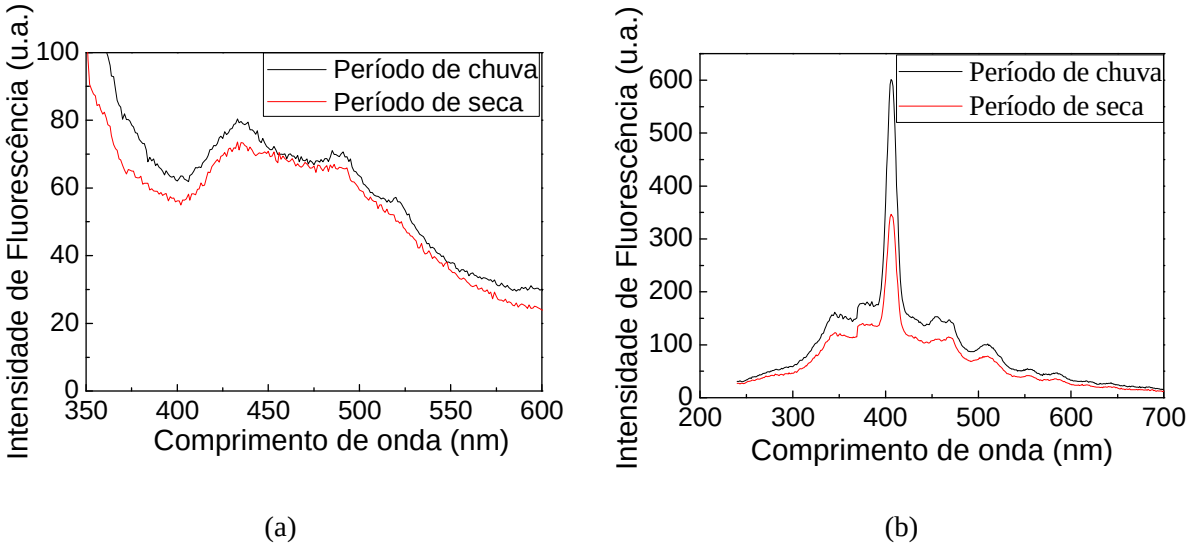



**Figura 14.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH CAPRP 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.

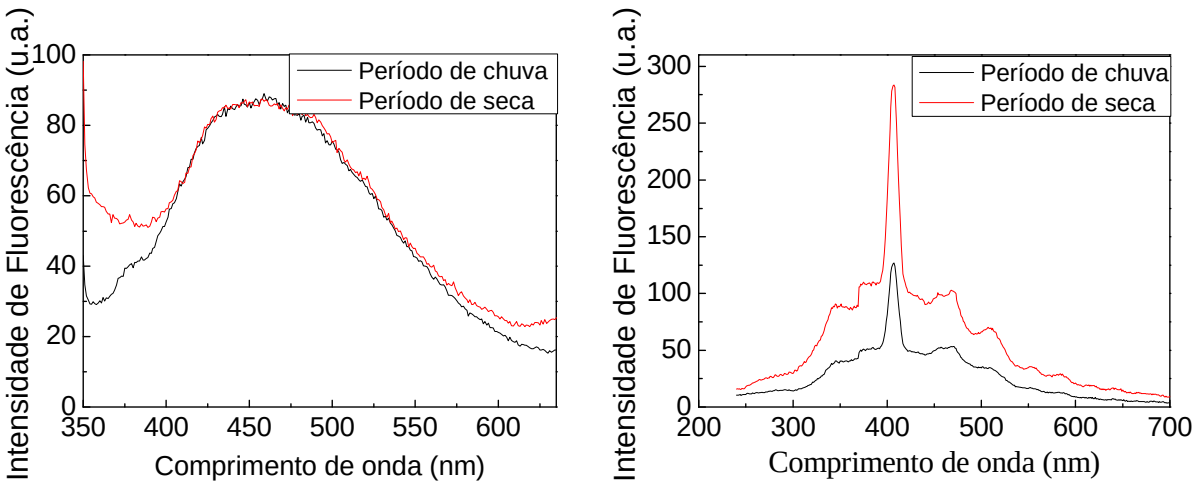



**Figura 15.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH RTURARG 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.

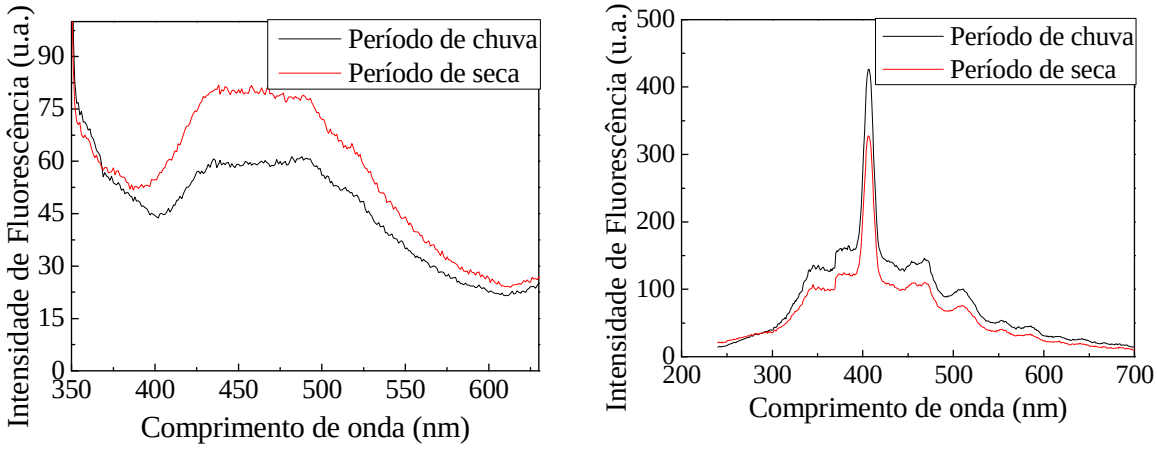



**Figura 16.** a) Espectros de fluorescência molecular no modo emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e b) no modo sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm), para as SH RGRANDE 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.

Analisando as Figuras 13a e 15a é possível verificar um sinal máximo de fluorescência próximo a 450 nm, o qual pode ser atribuído à estrutura de ácidos húmicos. Este sinal de IF já foi encontrado para os AH Aldrich comercial por Magdaleno (2007). Como pode ser observado, a fluorescência máxima aparece para as SH extraídas em período de chuva e em período de seca no mesmo comprimento de onda, sendo mais intenso no período de chuva para a $SH_{NRP}$. Esta

diferença na intensidade de fluorescência pode ser devido à presença de grupos substituintes na molécula; grupos hidroxi, metoxi, amino, cianeto e sulfônico possuem a tendência de ampliar o sinal de fluorescência, por outro lado, grupos cetônicos, carboxílicos e halogênios atuam diminuindo a fluorescência (Gusso, 2008).

Já o espectro da Figura 14a e 16a, apresentam dois sinais máximos de fluorescência em 430 nm e 480 nm, sendo que o primeiro pode ser atribuído a presença de ácidos fúlvicos e o segundo aos ácidos húmicos. Os AF e AH apresentam bandas de emissão de radiação nos comprimentos de onda que podem variar de 380-460 nm e 410-480 nm respectivamente, isso para λ de excitação que pode estar na faixa entre 250-260 nm para ácidos fúlvicos e λ de excitação entre 300 e 340 nm para ácido húmico (Baker; Genty, 1999).

Como mostrado acima, o ácido húmico apresenta comprimento de onda de excitação e de emissão maior do que o ácido fúlvico, entretanto pode apresentar menor intensidade de fluorescência. Este comportamento se deve a diversos fatores como, presença de frações de maior massa molecular e maior caráter aromático comparado ao AF e maior quantidade de grupos substituintes com elétrons livres (carbonilas, cetonas) (Barancíkova et al., 1997; Miano et al., 1988; Senesi et al., 1991).

Já os espectros de fluorescência na modalidade sincronizada apresentado nas Figuras de 13 a 16b exibem uma intensidade de fluorescência máxima em torno de 406 nm, a qual está associada à presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos com 5 anéis conjugados (Peuravuori et al., 2002).

É importante destacar que apenas a IF variou com a sazonalidade para todas as SH estudadas, isto pode ser atribuído aos grupos substituintes presentes na molécula, conforme descrito anteriormente. Vale ressaltar que a diferença de intensidade de fluorescência emitida pelas SH também pode estar relacionada à maior massa molecular, com maior quantidade de anéis aromáticos e ainda devido à menor quantidade de fluoróforos e maior quantidade de grupos substituintes doadores de elétrons existentes no anel aromático (Azevedo e Nozaki, 2008).

### 5.2.2. Caracterização por Espectroscopia na região do ultravioleta/visível

A partir da razão $E_4/E_6$ (razão entre as absorbâncias em 465 nm e 665 nm), é possível inferir sobre o grau de condensação molecular que as substâncias húmicas apresentam (Santos,

2008; Zara et al., 2006). A Tabela 7 apresenta os valores determinados para os vários pontos estudados.

**Tabela 7.** Valores da razão $E_4/E_6$ para as diferentes SH extraídas de sedimentos de rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande.

| Período da coleta | Origem SH | Abs 465 nm | Abs 665 nm | Razão $E_4/E_6$ |
|---|---|---|---|---|
| Período de chuva | **NRP** | 2,002 | 0,567 | 3,53 |
| | **CAPRP** | 0,523 | 0,178 | 2,94 |
| | **RTURAG** | 1,810 | 0,413 | 4,38 |
| | **RGRANDE** | 0,896 | 0,280 | 3,20 |
| Período de seca | **NRP** | 2,003 | 0,456 | 4,39 |
| | **CAPRP** | 0,633 | 0,167 | 3,79 |
| | **RTUARG** | 2,495 | 0,485 | 5,14 |
| | **RGRANDE** | 0,807 | 0,250 | 3,23 |

Observando os dados mostrados na Tabela acima, constata-se que os valores das razões $E_4/E_6$ são menores ou igual a cinco. Esses valores de acordo com Kononova (1966) apud Fontana (2009) indicam que as SH apresentam uma estrutura molecular com maior grau de condensação, assim sendo possui maior número de estruturas aromáticas do que alifáticas, o que corrobora com os dados obtidos com a caracterização por fluorescência molecular.

Os valores da razão $E_4/E_6$ para SH extraídas de sedimentos em período de seca foram maiores do que aquelas extraídas no período de chuva, isto indica que no período de seca as SH possuem estrutura química menos aromática, com menor massa molar, o que é resultado de um menor grau de humificação. Outros trabalhos na literatura já descreveram a influencia da sazonalidade na estrutura química das SH (Oliveira et al., 2007; Santos et al., 2008).

É importante ressaltar que os valores das razões determinadas neste trabalho foram semelhantes a resultados determinados por outros autores (Christensen et al.,1998; Pertusatti, 2007; Rosa et al., 2000; Saab; Martin-Neto, 2007; Santos, 2008; Silverstein et al., 1994 apud Sanches et al., 2007; Zara et al., 2007).

### 5.2.3. Caracterização por Espectroscopia na região do Infravermelho

A caracterização por infravermelho é bastante utilizada, pois esta técnica fornece informações a respeito dos grupos funcionais que compõe a molécula de SH (Araújo et al., 2002; Fontana, 2009; Giovanela, et al., 2010; Khalaf, 2003; Shin et al., 1999; Sloboda, 2007). Na Figura 17 estão apresentados os espectros referentes a cada SH estudada.

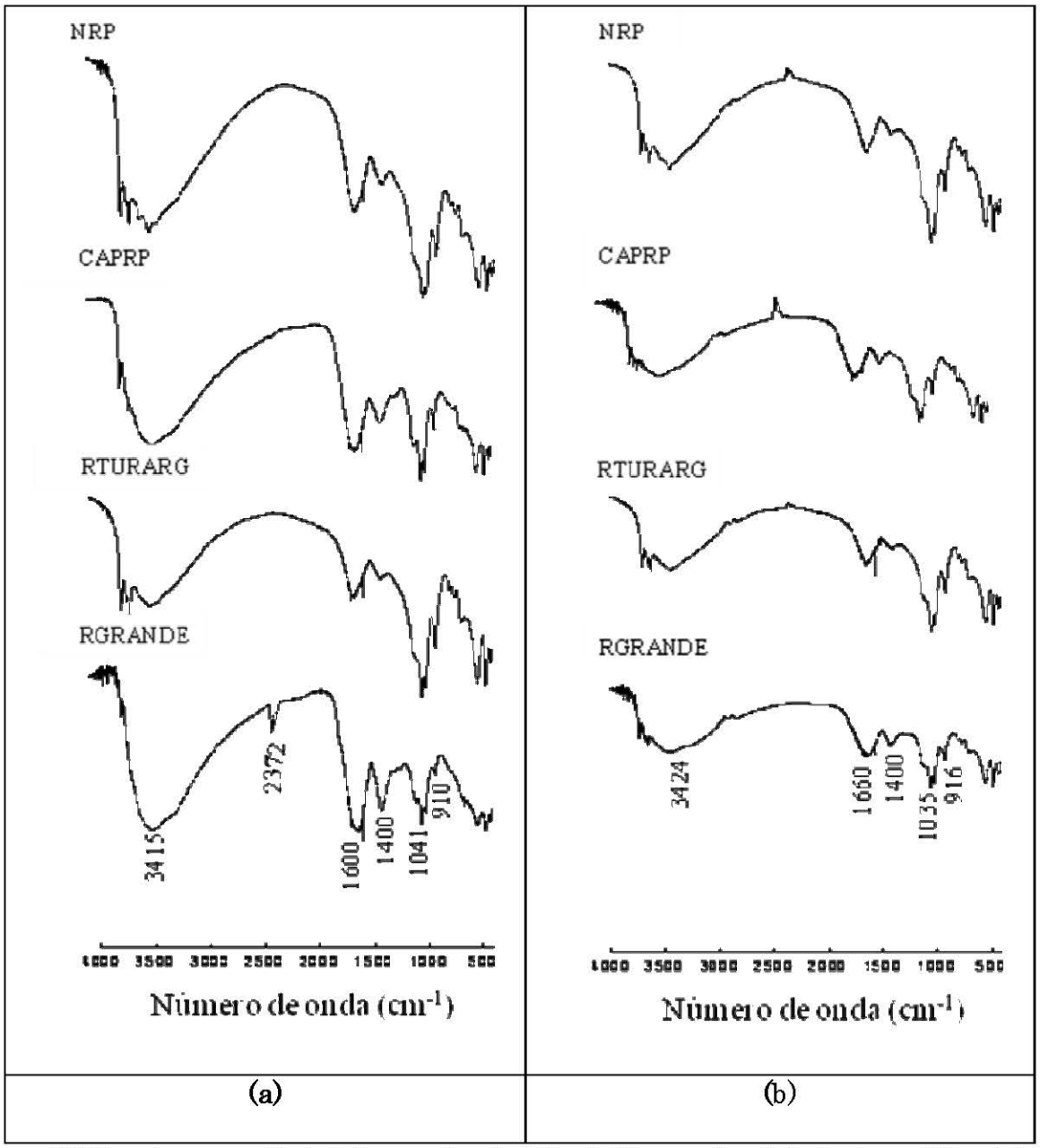



**Figura 17.** Espectros na região do infravermelho das SH extraídas em a) período de chuva e b) período de seca.

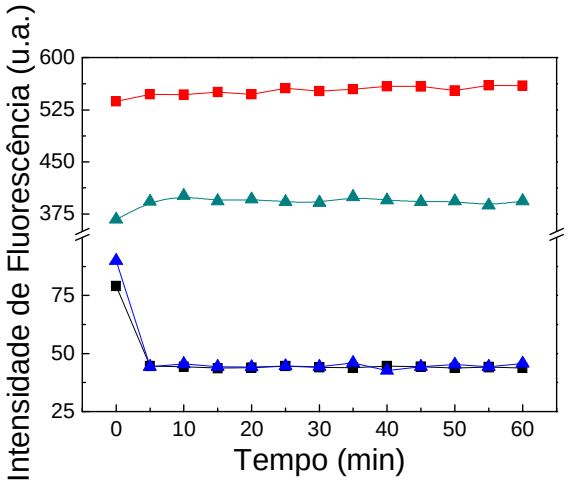
Analisando-se os espectros apresentados na Figura 17, alguns picos característicos das SH são observados. Como pode ser observado, todas as SH estudadas nos diferentes locais de amostragem possuem grupos funcionais semelhantes. Essa similaridade na estrutura das diferentes SH já foi encontrada em outros trabalhos descritos na literatura (Kononova, 1982 apud Fontana, 2009; Schnitzer & Khan, 1972 apud Fontana, 2009; Sloboda, 2007). Todas as SH apresentam uma banda larga e intensa em torno de 3400 $cm^{-1}$, a qual é atribuída ao estiramento ν(O-H) de grupos carboxílicos, fenólicos, alcoóis e ainda da superposição de bandas. Esse estiramento também pode ser atribuído a presença de água. Essa banda está presente no período de seca e de chuva. A banda na região de 1660 a 1630 $cm^{-1}$ pode ser atribuída ao estiramento ν(C=C) de anel, e a vibrações do anel aromático, assim como a δ(OH) da molécula de água. Todos os espectros das SH em período de chuva (Figura 17a) apresentam uma banda mais intensa nesta região, indicando que neste período a quantidade de anel aromático é maior, o que corrobora com os resultados obtidos para a análise de UV/VIS. A banda na região de 1400 $cm^{-1}$ pode ser atribuída à deformação δ(OH) e ao estiramento ν(C-O) em grupos fenólicos e carboxilatos, sendo que esta banda é característica de moléculas de ácidos húmicos (Pertusatti, 2007). Já picos entre 1120 a 1000 $cm^{-1}$ são atribuídos ao estiramento ν(C-O) de polissacarídeos (Landgraf et al., 1998). Por fim, as bandas na região de 950 a 670 $cm^{-1}$ podem ser atribuídas à deformação no plano e fora do plano da ligação CH de anéis aromáticos (Rocha e Rosa, 2003).

É importante destacar que os espectros não apresentam banda na região de 2850 e 2920 $cm^{-1}$, isto é um indicativo de que a concentração de grupos alifáticos é baixa, uma vez que bandas nestas regiões são referente às vibrações do estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H, respectivamente (Pertusatti, 2007).

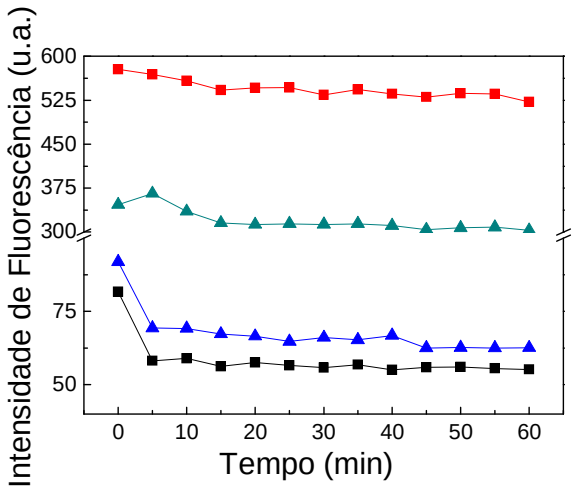
## 5.3. Estudos de Capacidade de Complexação das SH por meio da Supressão de Fluorescência

### 5.3.1. Tempo de Complexação

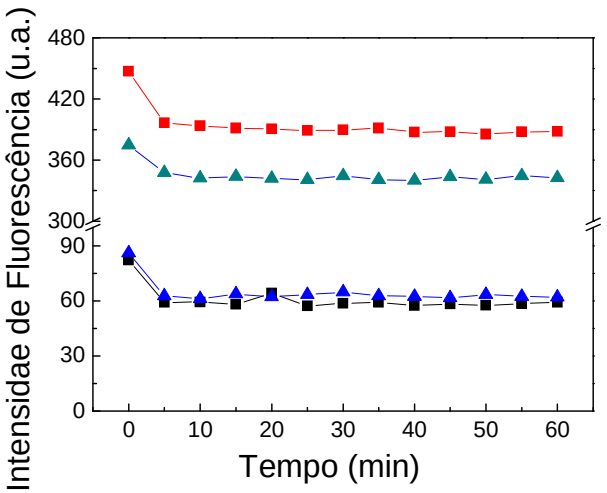
As leituras realizadas no espectrofluorímetro, tanto nas modalidades emissão como sincronizada, foram todas com SH na concentração de 12,0 mg $L^{-1}$ de COT. Nas Figuras 18-21 estão apresentados os tempos necessários para estabilização de cada complexo das diferentes SH com as espécies metálicas cobre(II), cromo(III) e cromo(VI).




(a)

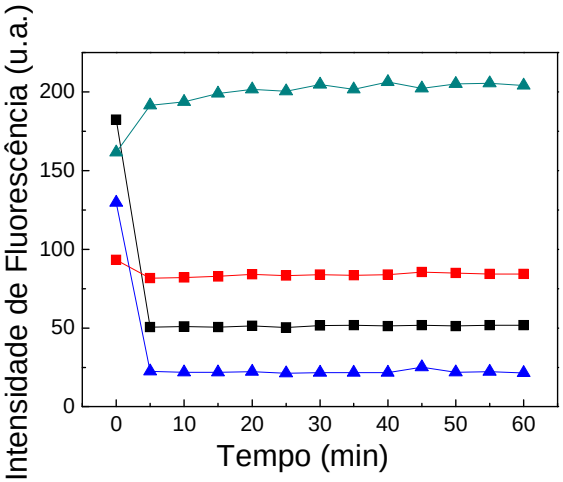



(b)

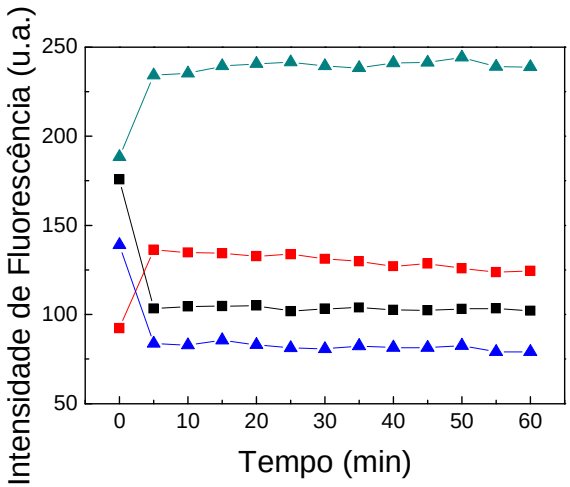



(c)

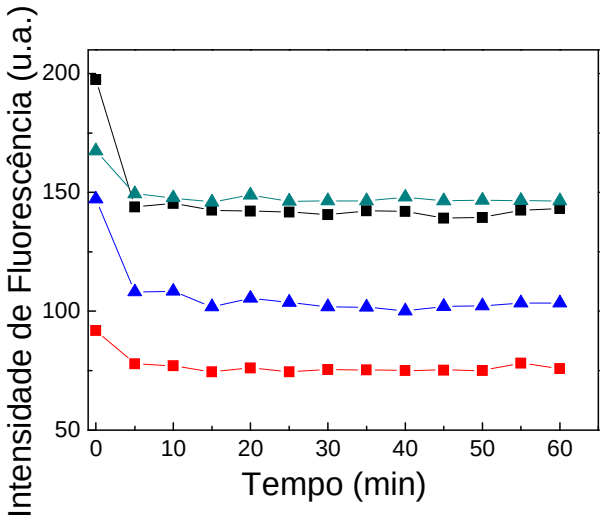
**Figura 18.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH CAPRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.




(a)




(b)




(c)

**Figura 19.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH NRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.

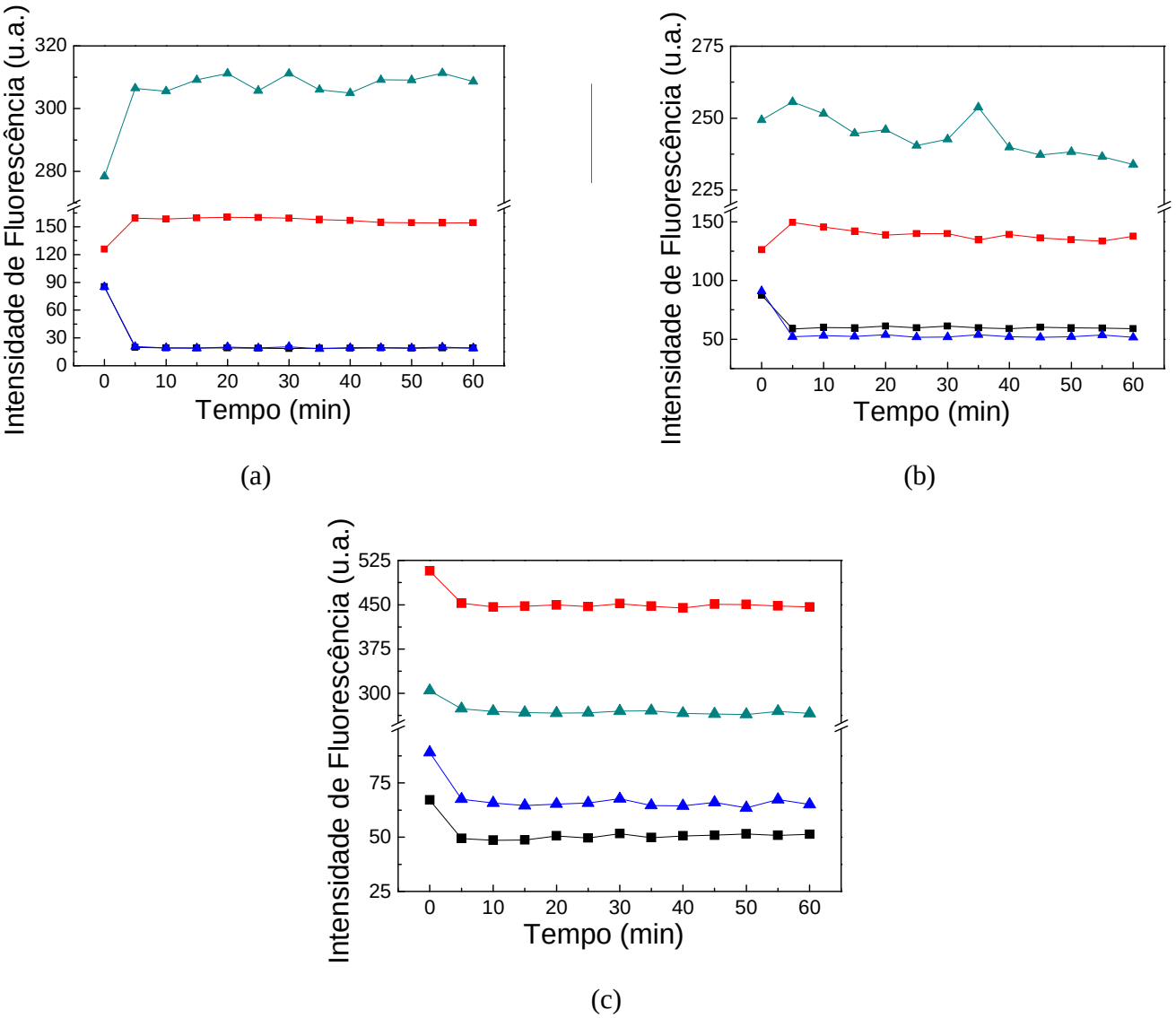



**Figura 20.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH RTURARG com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.

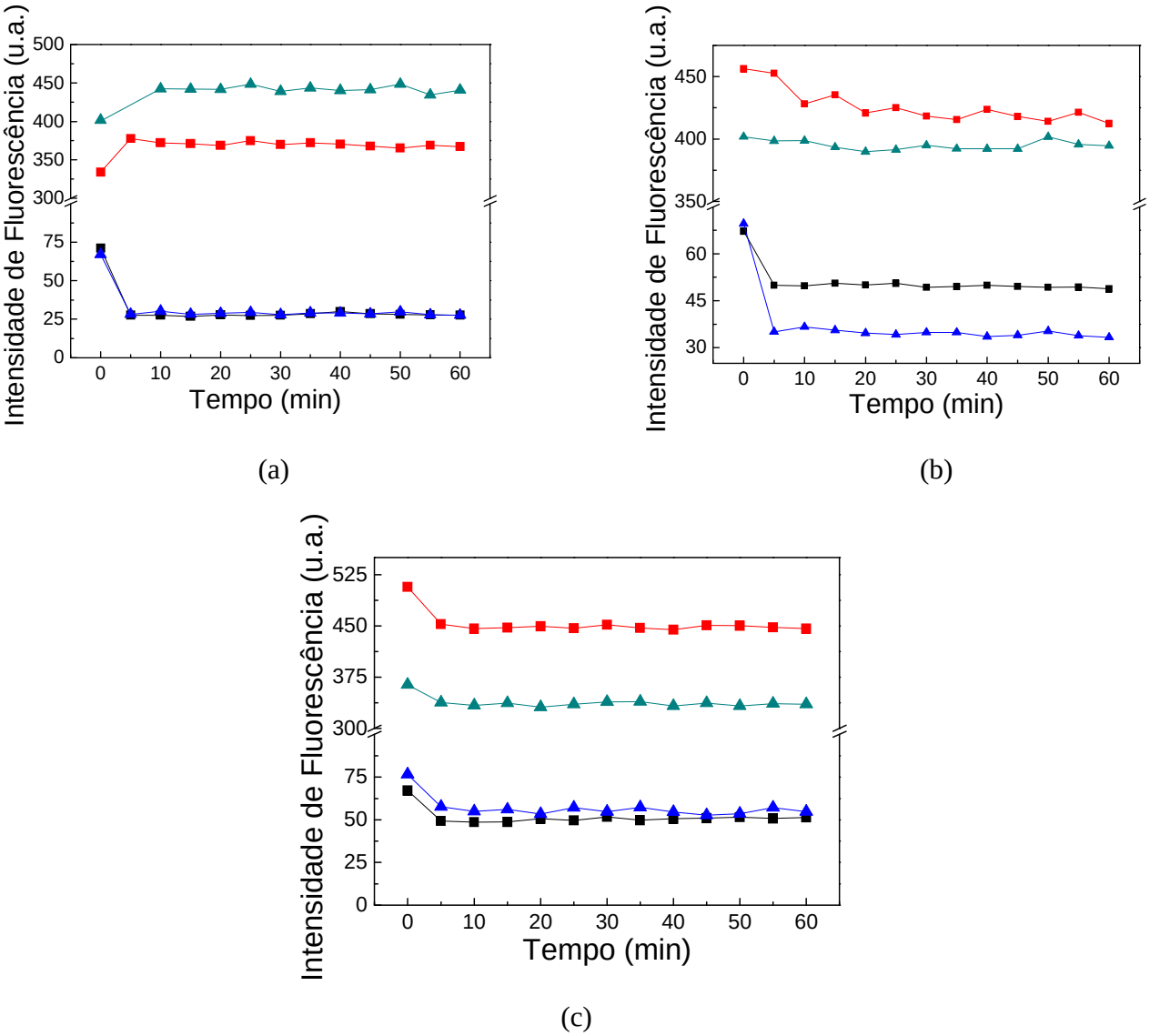



**Figura 21.** Determinação do tempo de complexação necessário para estabilizar o sinal de fluorescência correspondente aos complexos da SH RGRANDE com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI). Sendo -■- emissão período de chuva, -■- sincronizado período de chuva, -▲- emissão período de seca e -▲- sincronizado período de seca.

De acordo com a Figura 18a é possível observar que o tempo de agitação necessário para ocorrer a estabilização do complexo entre o metal cobre e SH ($SH_{CAPRP}$-Cu(II)) foi de aproximadamente 10 minutos para o modo emissão e sincronizado para amostradas coletadas em período chuvoso e de 15 minutos para o período de seca. Já para o complexo $SH_{CAPRP}$-Cr(III) (Figura 18b) foi necessário um tempo de 15 minutos para estabilização do sinal em ambos os

período estudados. Por fim, a estabilização desta SH com metal Cr(VI) (Figura 18c) ocorreu com tempo de agitação de 15 minutos em ambas as modalidades.

Na Figura 19 está ilustrada a cinética de complexação das SH do sedimento amostrado na nascente do Rio Preto com diferentes metais. O tempo de complexação para o complexo $SH_{NRP}$-Cu foi de 10 minutos para o período de chuva e de 15 minutos para período de seca. Para o complexo $SH_{NRP}$-Cr(III) é possível verificar que a estabilização do sinal no modo sincronizado é bem discreta, portanto é necessário um tempo de 20 minutos para ambos os períodos estudados (seca e de chuva). Entretanto, para o metal Cr(VI) a estabilização da intensidade de fluorescência ocorreu com tempo de agitação de 15 minutos em ambas as modalidades e para ambos os períodos estudados (Figura 19c).

Ao estudar a SH proveniente do Rio Turvo antes de desaguar no Rio Grande (Figura 20) foi possível verificar que 10 minutos foram suficientes para a estabilização do sinal de fluorescência para o complexo $SH_{RTURARG}$-Cu(II). Este comportamento foi o mesmo para ambas as modalidades (emissão e sincronizada) para o período de chuva e de seca. O estudo com Cr(III) revelou ser necessário um tempo maior para estabilização da intensidade de fluorescência, sendo necessários 20 e 25 minutos para o período de chuva e seca, respectivamente. Este tempo foi o mesmo para ambas as modalidades de fluorescência estudada. Por fim, o estudo com o Cr(VI), foi necessário um tempo de 10 minutos para a estabilização do complexo $SH_{RTURARG}$-Cr(VI) em ambas as modalidades para os dois períodos estudados.

Para a SH proveniente do Rio Grande (Figura 21) o tempo de estabilização do complexo $SH_{RGRANDE}$-Cu(II) foi de 10 minutos para as duas modalidades estudadas e para os dois períodos de coleta. Para o íon $Cr^{3+}$ foi necessário um tempo de apenas 10 minutos para estabilização do complexo na modalidade emissão, porém 20 minutos foram necessários para estabilização na modalidade sincronizada, desta forma adotou-se 20 minutos como tempo para estabilização do complexo em ambos os períodos estudados. O comportamento cinético com o íon $Cr^{6+}$ foi o mesmo quando $Cu^{2+}$ foi estudado, sendo assim necessário apenas 10 minutos para estabilização do complexo.

O tempo de complexação determinado para cada SH estão descritos na tabela 8 a seguir:

**Tabela 8.** Tempo necessário para estabilização do complexo SH-Metal.

| Período da coleta | Local Amostragem | Tempo Cobre(II)/min | Tempo Cromo(III)/min | Tempo Cromo(VI)/min |
|---|---|---|---|---|
| **Período de chuva** | NRP | 10 | 20 | 15 |
| | CAPRP | 10 | 15 | 15 |
| | RTURARG | 10 | 25 | 10 |
| | RGRANDE | 10 | 20 | 10 |
| **Período de seca** | NRP | 15 | 20 | 15 |
| | CAPRP | 15 | 15 | 15 |
| | RTURARG | 10 | 25 | 10 |
| | RGRANDE | 10 | 20 | 10 |

### 5.3.2. Interação das SH com Cobre(II) por supressão da fluorescência molecular

Os espectros na modalidade emissão e sincronizado foram obtidos para o estudo da capacidade complexante das SH com o Cu(II). Todo o estudo foi realizado com as SH que continham 12,0 mg $L^{-1}$ de COT. Nas Figuras 22 e 23 estão apresentados os espectros obtidos no modo emissão (a) e sincronizado (b) para a SH RTURARG após a adição de alíquota do metal, assim como as respectivas concentrações de metal adicionadas.

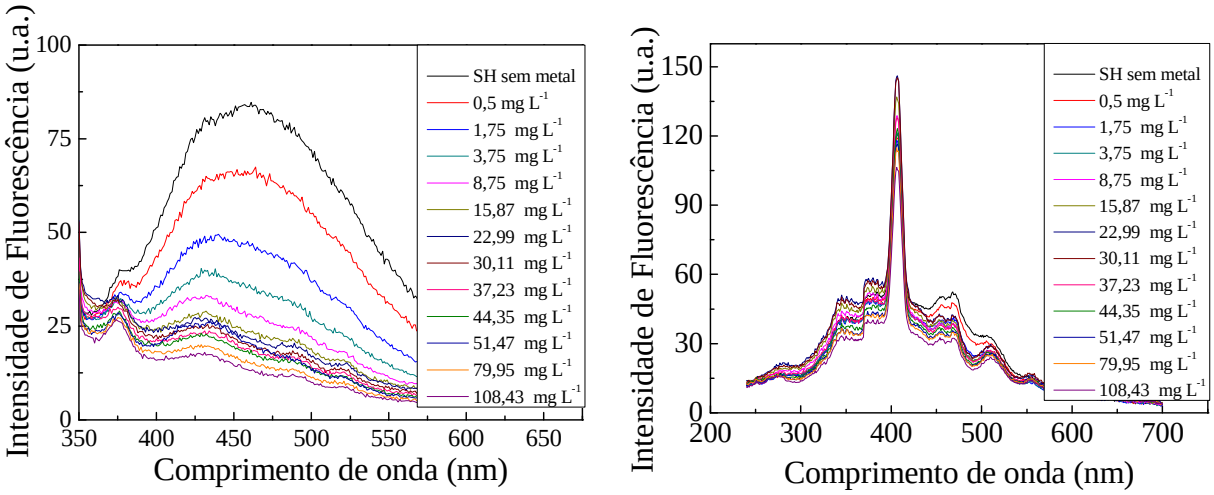



**Figura 22.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de chuva no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cobre(II).

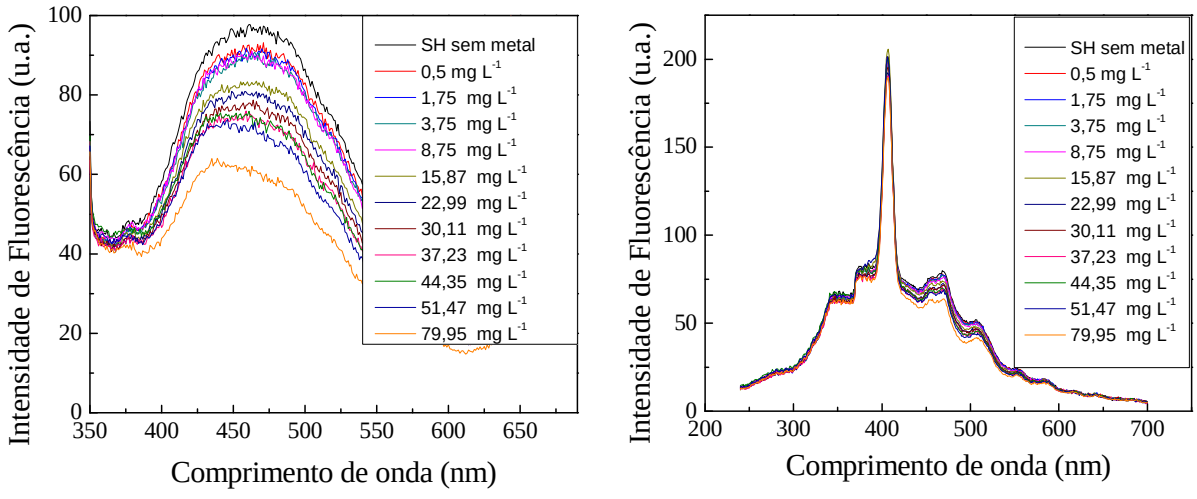



**Figura 23.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de seca no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cobre(II).

Os demais espectros que ilustram a capacidade complexante das SH extraídas dos outros pontos de coleta no período de chuva e de seca encontram-se no anexo C.

Observando as Figuras 22 e 23 é possível verificar que para todas as SH estudadas, tanto em período de seca como de chuva, todos os espectros na modalidade emissão (Figura 22a e 23a) exibem a supressão na intensidade de fluorescência das SH com as sucessivas adições do metal. Entretanto, no modo sincronizado (Figura 22b e 23b) comportamento contrário foi observado, ocorrendo aumento da IF após a adição de metal.

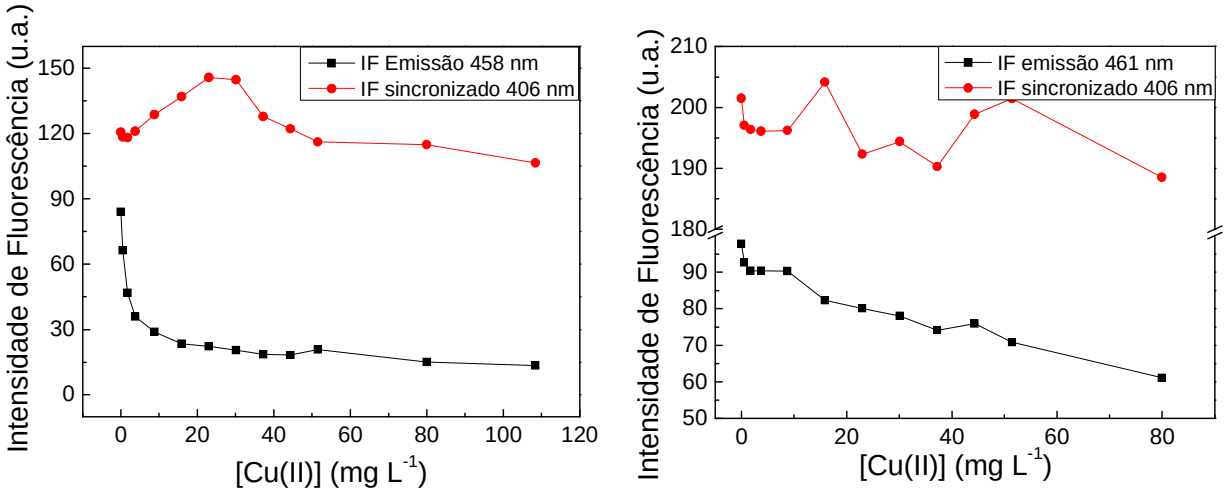
Estudos já realizados com o metal cobre e substâncias húmicas, ácidos húmicos e fúlvicos relataram que com a adição do metal a fluorescência é suprimida (Ryan e Weber, 1982; Silva et al., 1998; Ventry et al., 1991). O comportamento aqui observado pode ser atribuído a alguma característica intrínseca das SH dos corpos aquáticos em estudo, que até o presente momento não temos uma justificativa coerente para tal comportamento.

Há relatos na literatura do aumento da IF quando avaliaram a capacidade de complexação das substâncias húmicas de origem aquática com o alumínio (Melo, 2010; Sharpless et al., 1999), entretanto para o cobre nada semelhante foi encontrado.

#### 5.3.2.1. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Cu(II)

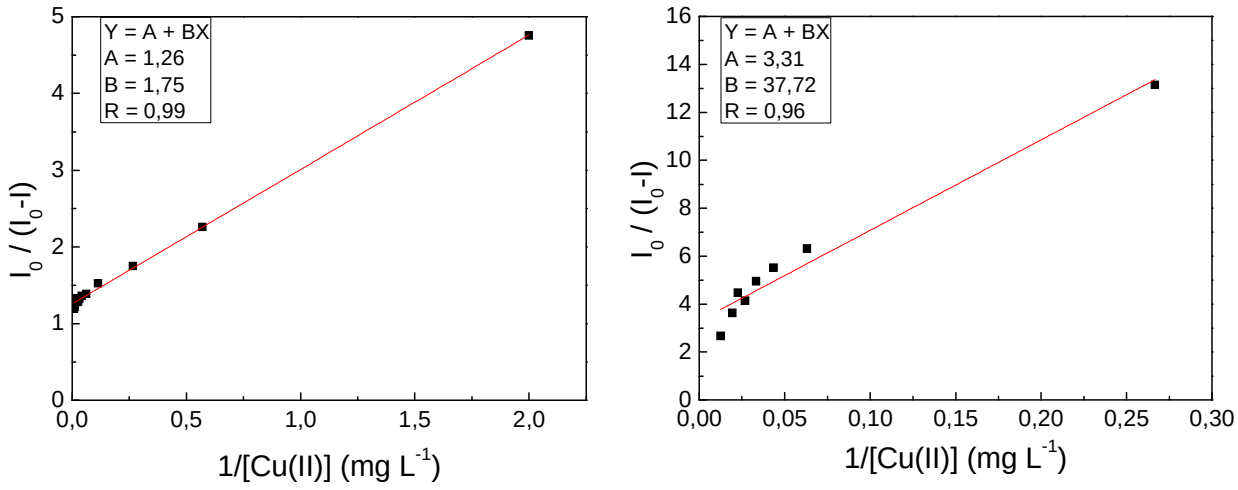
A constante de estabilidade condicional ($K_C$) foi calculada aplicando o modelo de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999). Vale ressaltar que o referido modelo pode ser aplicado somente para a modalidade que apresentar supressão da Intensidade de Fluorescência (emissão ou sincronizado). As curvas de supressão da intensidade do sinal de fluorescência estão ilustradas na Figura 24.

Observando a Figura 24a,b é possível verificar que apenas a modalidade emissão exibiu decréscimo na IF, desta forma a constante de estabilidade condicional (Kc) foi calculada apenas para esta modalidade. O valor de Kc é calculado a partir da linearização do gráfico de 1/[Cobre(II)] versus $I_0/(I_0-I)$, como mostrado na Figura 25.




(a) (b)

**Figura 24.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH RTURARG (a) período de chuva e (b) período de seca.




(a) (b)

**Figura 25.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.

No anexo D são apresentados todos os gráficos das curvas de supressão de fluorescência e as curvas de linearização da IF para todos os complexos formados entre as SH dos diferentes locais de amostragem com o metal cobre.

A Tabela 9 mostra os valores de Kc para os complexos das SH extraídas em período de chuva e de seca para os diferentes locais de amostragem.

**Tabela 9.** Valores da Constante de Estabilidade Condicional Kc para os complexos SH-Cu(II).

| Período da coleta | Local Amostragem | Cobre(II) |
|---|---|---|
| **Período de chuva** | NRP | $8{,}37 \times 10^{-1}$ |
| | CAPRP | $5{,}60 \times 10^{-3}$ |
| | RTURARG | $7{,}20 \times 10^{-1}$ |
| | RGRANDE | 1,23 |
| **Período de seca** | NRP | $6{,}10 \times 10^{-2}$ |
| | CAPRP | $5{,}10 \times 10^{-2}$ |
| | RTURARG | $8{,}70 \times 10^{-2}$ |
| | RGRANDE | $5{,}50 \times 10^{-3}$ |

Observando a Tabela 9 é possível verificar que os valores de Kc para o período chuvoso é maior quando comparado ao período de seca com exceção da $SH_{CAPRP}$, indicando que há maior interação das SH com o referido metal neste período de coleta. Entre as SH estudadas o maior valor de Kc refere-se a $SH_{RGRANDE}$, indicando que há uma maior interação das SH deste corpo aquático com Cu(II), por outro lado, a SH $_{CAPRP}$ é a que apresentou a menor interação com o metal estudado.

A correlação dos valores de Kc com o período em que as SH foram extraídas está estritamente ligado aos grupos funcionais que compõem a estrutura química das SH. Os grupos oxigenados (hidroxilas, fenólicos) e ligações duplas C=C resultam em um maior efeito quelante das substâncias húmicas (Hernández et al., 2007; Hur e Lee, 2011; Plaza et al., 2006; Soler-Rovira et al., 2010). Os valores de Kc corroboram com dados de infravermelho, os quais indicam maior presença dos referidos grupos nas SH extraídas em período de chuva.

Segundo Luster et al., 1996 valores de Kc que variaram de $61{,}66x10^3$ - $29{,}51\ x10^6$ foram encontrados para a constante de estabilidade condicional quando a interação da matéria orgânica dissolvida com o cobre(II) foi estudada. Magdaleno (2007) estudou a interação dos ácidos húmicos comercial com o íon $Cu^{2+}$, encontrando valores de Kc muito superiores ($4{,}27x10^3$) aos encontrados neste trabalho. Hernández et al., 2007 estudou a interação do metal cobre com os ácidos fúlvicos de solos incrementando com dejetos suínos e encontraram valores de Kc que variaram de $28{,}18x10^3$ a $87{,}10x10^3$. Neste estudo foi observado que os AF que apresentam menor conteúdo de grupos funcionais ácidos e menor grau de condensação aromática são caracterizados por menor capacidade de ligação e menor valor de constante de estabilidade condicional. Essa relação dos grupos funcionais com os valores de Kc também foi encontrada em estudo realizado por Plaza e colaboradores (2006), estudo este realizado por meio da interação de ácidos húmicos de solos incrementados com material de compostagem e solos puros com íon $Cu^{2+}$.

Abate e Masini (1999) realizaram estudos de interação de ácidos húmicos extraídos de sedimento amostrado no reservatório de Barra Bonita com o metal cobre por meio da técnica potenciométrica, encontrando valores de Kc igual a $10{,}0x10^5$ e $63{,}1x10^6$ para o primeiro e o segundo sítio ativo, respectivamente.

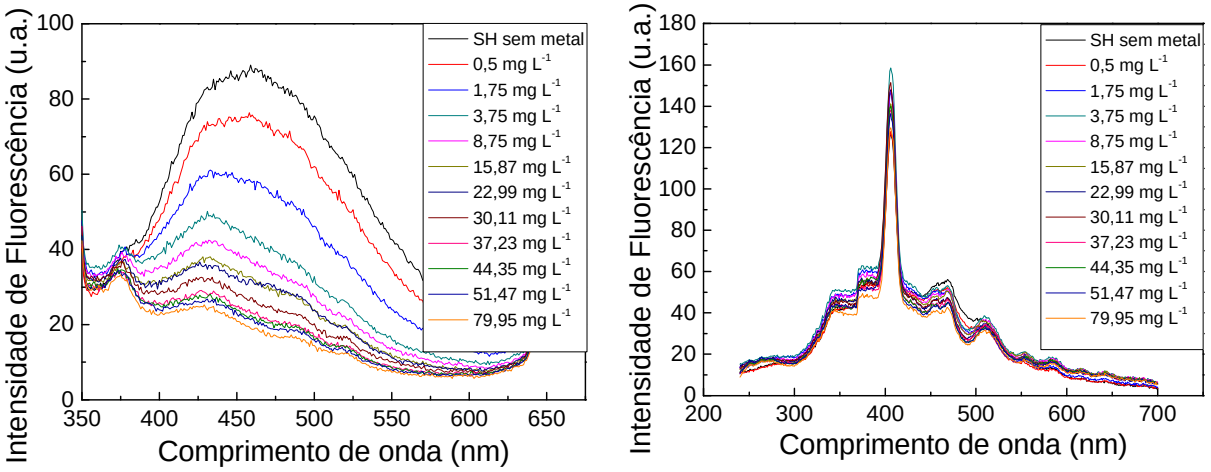
Romão e colaboradores (2003) estudaram a complexação do cobre com as SH de solos alagados e não alagados da Bacia do Rio Negro (AM) por meio do sistema de ultrafiltração. Os valores determinados para a constante de estabilidade condicional do complexo SH-Cu foram de 30,90 e 398,11 para solos alagados e não alagados, respectivamente.

Os valores de Kc determinados por este trabalho são inferiores aos descritos na literatura, porém vale ressaltar que poucos estudos com SH de sedimentos foram realizados, sendo apenas um estudo encontrado. Os menores valores indicam que os complexos do metal cobre com as SH estudadas possuem uma menor estabilidade quando comparado a outros complexos já estudados e que a interação das SH com o Cu(II) é menor do que descrito na literatura (Pandey et al., 2000; Plaza et al.,2006; Ryan e Weber, 1982).

### 5.3.3. Interação das SH com Cromo(III) por supressão da fluorescência molecular

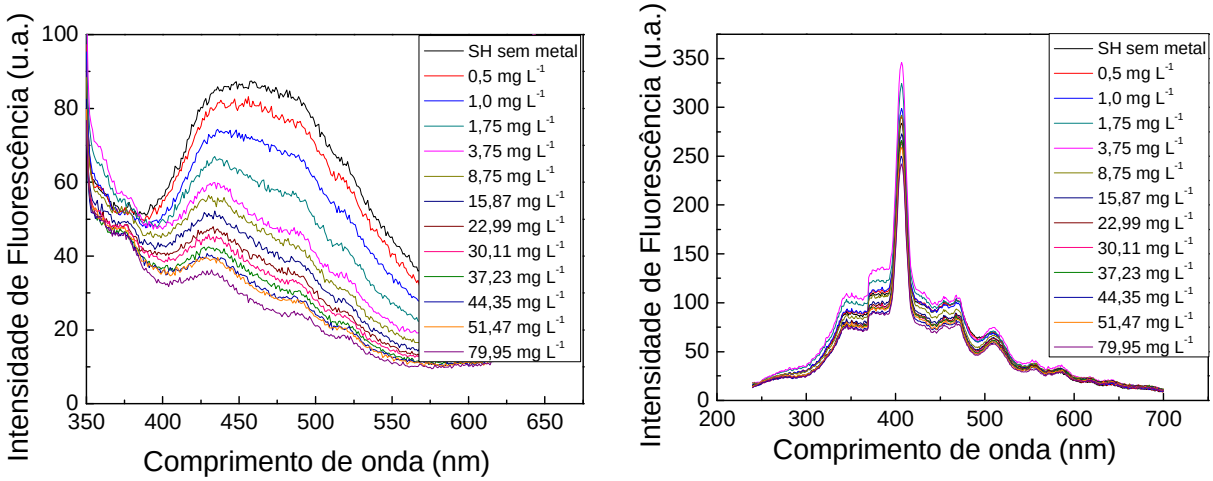
A interação do íon $Cr^{3+}$ com as SH foi estudada, e os espectros da intensidade de fluorescência estão representados nas Figuras 26 e 27 para o modo emissão (a) sincronizado (b)

para as SH RTURARG após a adição de alíquota do metal, assim como as respectivas concentrações de metal adicionadas. Todo o estudo foi realizado com as SH que continham 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.




(a) (b)

**Figura 26.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de chuva no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(III).




(a) (b)

**Figura 27.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de seca no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(III).

Os demais espectros referentes às SH extraídas dos demais pontos de coleta no período de chuva e de seca encontram-se no anexo E.

O comportamento exibido pelas diferentes SH foi o mesmo que o encontrado quando o metal cobre foi estudado, onde espectros no modo emissão exibem a supressão na intensidade de fluorescência das SH com a titulação do metal e os espectros no modo sincronizado apresentam o aumento da IF após a adição de metal.

Melo (2010) realizou um estudo abordando a interação do cromo(III) com a substâncias húmicas aquática (SHA) da Captação da cidade de São José do Rio Preto (CAPRP), e comportamento semelhante ao deste trabalho foi observado, constatando que na modalidade emissão há a supressão da IF, enquanto que na modalidade sincronizado há aumento da IF. Esse comportamento contrário do descrito na literatura provavelmente está relacionado a alguma propriedade estrutural peculiar da SH de sedimentos dos rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, no entanto, as técnicas utilizadas para caracterização das mesmas, revelaram grupos funcionais e características bastante similares às das SH descritas em diversos estudos.

#### 5.3.3.1. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Cr(III)

A constante de estabilidade condicional $K_C$ foi calculada aplicando o modelo de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999), este modelo é aplicado apenas à modalidade de fluorescência que apresenta diminuição da IF. As curvas de supressão da intensidade do sinal de fluorescência estão apresentadas na Figura 28.

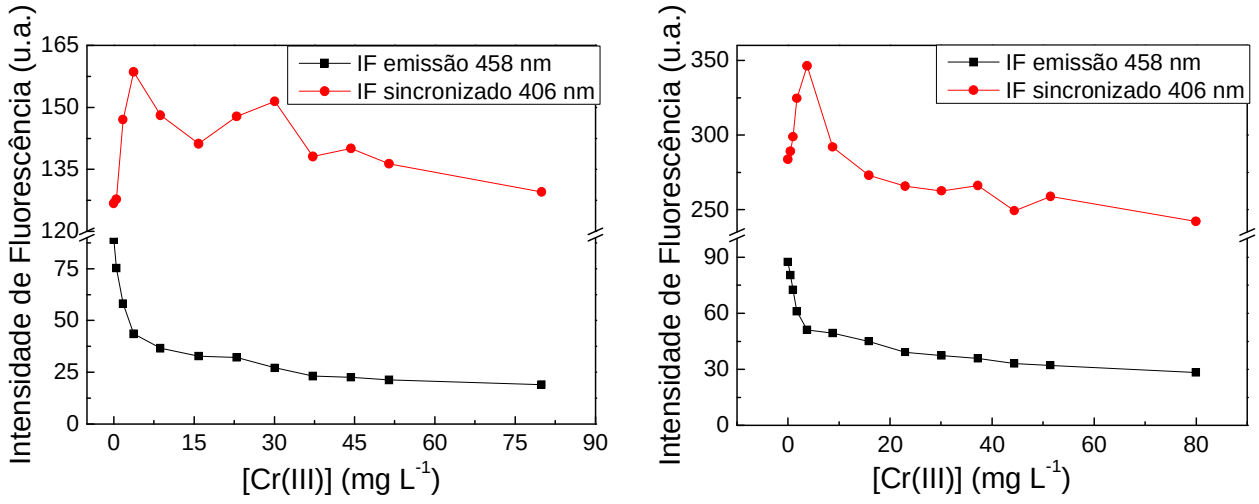
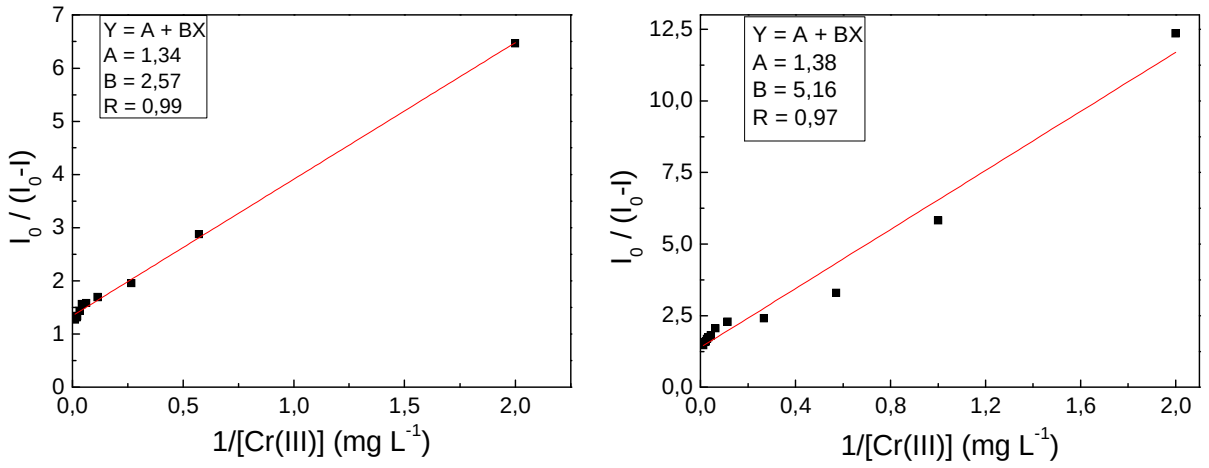



**Figura 28.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH RTURARG (a) período de chuva e (b) período de seca.

Como mostrado na Figura 28 é possível verificar que na modalidade sincronizada há um aumento na IF com a adição do metal, assim o Kc é calculado apenas para a modalidade emissão. O valor da constante de estabilidade condicional é calculado a partir da linearização da intensidade de fluorescência representada pelo gráfico 1/[Cromo(III)] versus $I_0/(I_0-I)$ mostrado na Figura 29.

Os gráficos que demonstram as curvas da supressão da fluorescência e a curva de linearização da IF para todos os complexos formados entre as SH dos demais pontos de amostragem e o metal cromo(III) estão apresentados no anexo F. Na Tabela 10 estão apresentados os valores de Kc para os complexos das SH extraídas em período de chuva e de seca.




(a) (b)

**Figura 29.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.

**Tabela 10.** Valores da Constante de Estabilidade Condicional Kc para os complexos SH-Cr(III).

| Período coleta | Local Amostragem | Cromo(III) |
|---|---|---|
| **Período de chuva** | NRP | $1,9 \times 10^{-1}$ |
| | CAPRP | $2,7 \times 10^{-1}$ |
| | RTURARG | $5,2 \times 10^{-1}$ |
| | RGRANDE | $2,8 \times 10^{-1}$ |
| **Período de seca** | NRP | $3,5 \times 10^{-1}$ |
| | CAPRP | $2,4 \times 10^{-1}$ |
| | RTURARG | $2,7 \times 10^{-1}$ |
| | RGRANDE | $2,1 \times 10^{-1}$ |

Os valores de Kc para os complexos SH-Cr(III) foram maiores em período de chuva para todos os pontos amostrados, com exceção da NRP. Os valores de Kc indicam a estabilidade do complexo formado entre a SH e o metal, portanto maiores valores indicam que a interação das

SH com o íon metálico estudado é maior. Desta forma, com exceção da $SH_{NRP}$ todas as SH possuem uma maior interação com o Cr(II) em período de chuva.

Conforme já mencionado anteriormente a interação das SH com os íons metálicos está diretamente relacionada a grupos funcionais que contem oxigênio e ligações duplas (Hernández et al., 2007; Hur e Lee, 2011; Plaza et al., 2006; Soler-Rovira et al., 2010).

Melo (2010) realizou estudos de interações de cromo(III) com as Substâncias Húmicas Aquáticas (SHA) extraída do Rio Preto no ponto Captação do Rio Preto, ponto este que também fez parte deste estudo. A autora obteve valor de constante de estabilidade condicional bem inferior ($5,8x10^{-3}$) ao valor encontrado neste trabalho, indicando que as SH provenientes de sedimentos possuem uma maior capacidade complexante do que a SHA do mesmo corpo aquático.

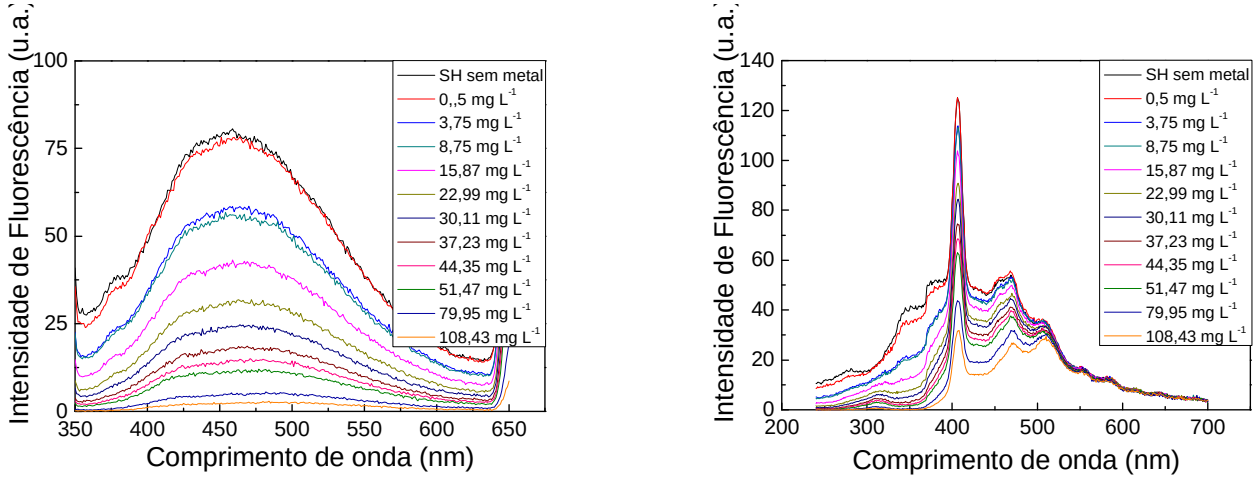
Krajnc et al., 1995 realizaram estudos da interação de ácidos fúlvicos extraídos de solos e turfas com o Cr(III), sendo que os valores de Kc foram determinados por meio do método de troca de íon no equilíbrio químico e encontraram valores igual a $1,71x10^{5}$ e $6,26x10^{5}$ para AF de solos e turfas, respectivamente.

Magdaleno (2007) estudou a interação de ácido húmico aldrich com o cromo(III) e encontrou valores de $14,30x10^{3}$ para a constante de estabilidade condicional.

Estudos que abordam a interação de SH de sedimento com o Cr(III) não foram encontrados na literatura.

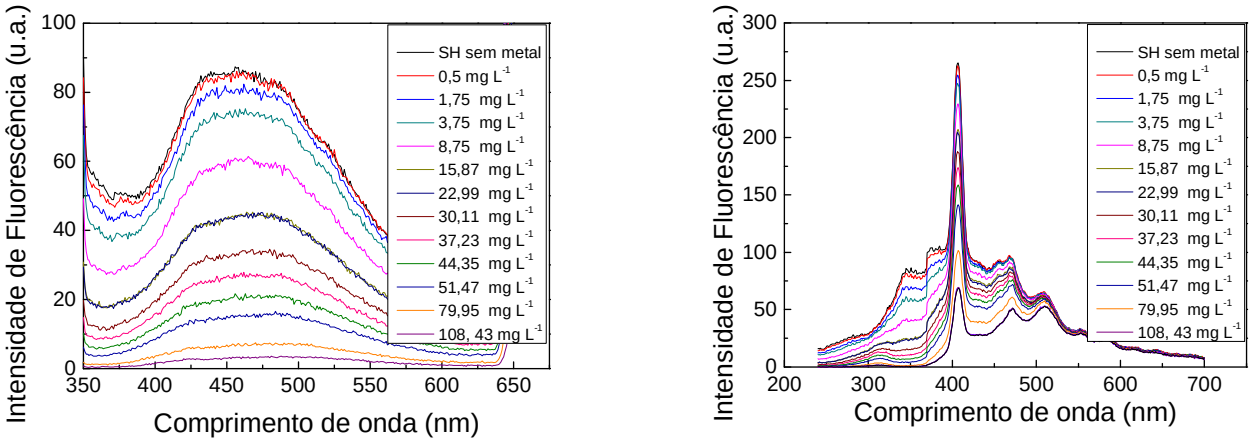
### 5.3.4. Interação das SH com Cromo(VI) por supressão da fluorescência molecular

As Figuras 30a,b e 31a,b mostra os espectros de fluorescência no modo emissão e sincronizado de SH extraídas do RTURARG após a adição de alíquotas do metal cromo, assim como as respectivas concentrações do Cr(VI) empregadas nos estudos de interações deste com as SH. Todo o estudo foi realizado com as SH que continham 12,0 mg $L^{-1}$ de COT.




(a) (b)

**Figura 30.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de chuva no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(VI).




(a) (b)

**Figura 31.** Espectros de fluorescência da SH RTURARG extraída em período de seca no modo (a) emissão (350-650, $\lambda_{exc}$ 332 nm) e (b) sincronizado (240-700, $\Delta\lambda$ 20 nm) obtidos na titulação da SH com cromo(VI).

Os espectros referentes às SH extraídas dos demais pontos de coleta no período de chuva e de seca encontram-se no anexo G.

Comportamento distinto dos metais cobre(II) e cromo(III) foi observado ao estudar a interação das SH com o Cr(VI). Para este íon a supressão de fluorescência foi evidente em ambas as modalidades, emissão e sincronizado. Melo (2010) ao estudar a interação da SHA extraída da água da captação da cidade de São José do Rio Preto observou o mesmo comportamento, ou seja, a diminuição da IF para as duas modalidades de fluorescência.

Depois de uma ampla revisão na literatura, poucos trabalhos contemplando estudos de interação do cromo(VI) com substâncias húmicas foram encontrados.

#### 5.3.4.1. Determinação da Constante de Estabilidade Condicional do complexo SH-Cr(VI)

A constante de estabilidade condicional $K_C$ foi calculada aplicando o modelo de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999). As curvas de supressão da intensidade do sinal de fluorescência para a modalidade emissão e sincronizada estão apresentadas nas Figuras 32 e 33, as quais representam as SH do período de chuva e seca, respectivamente.

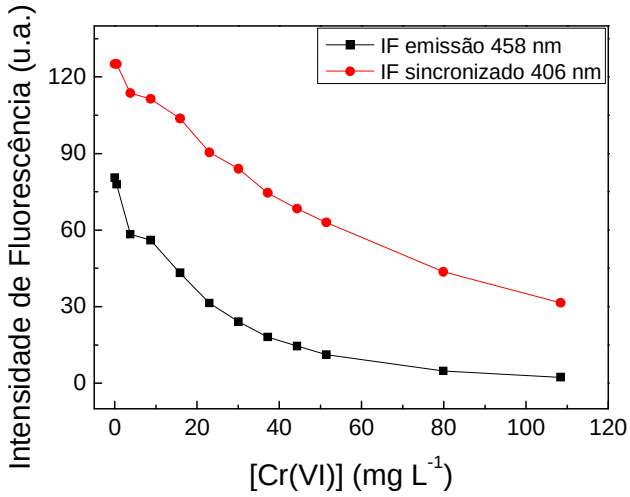



**Figura 32.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizada para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RTURARG extraída em período de chuva.

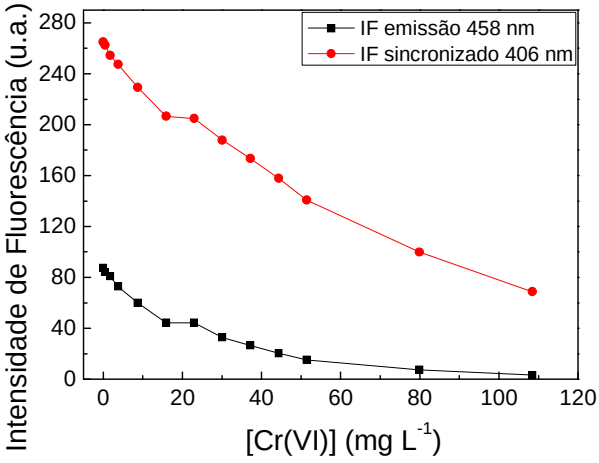
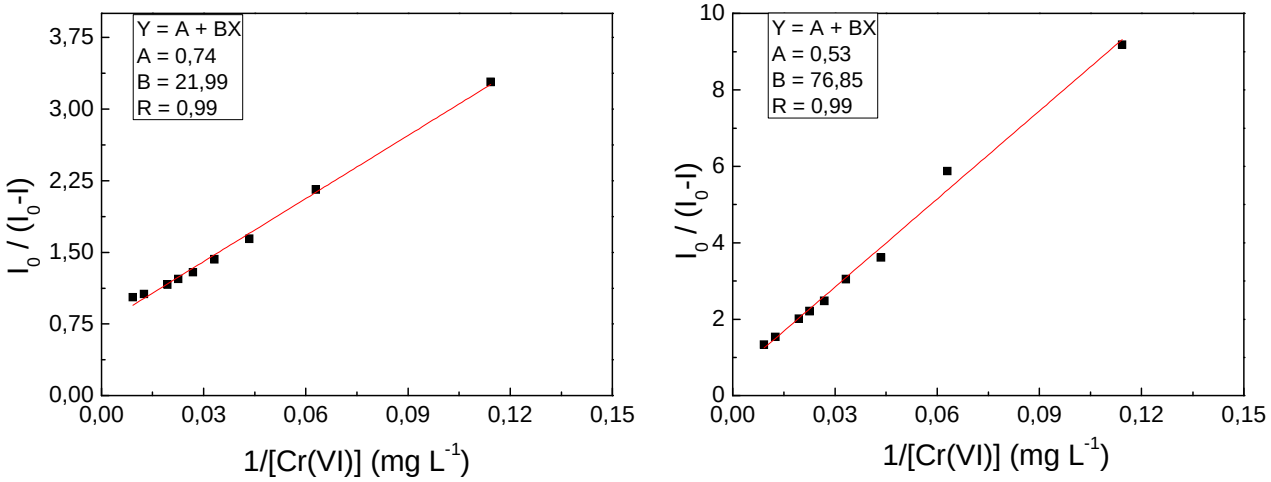


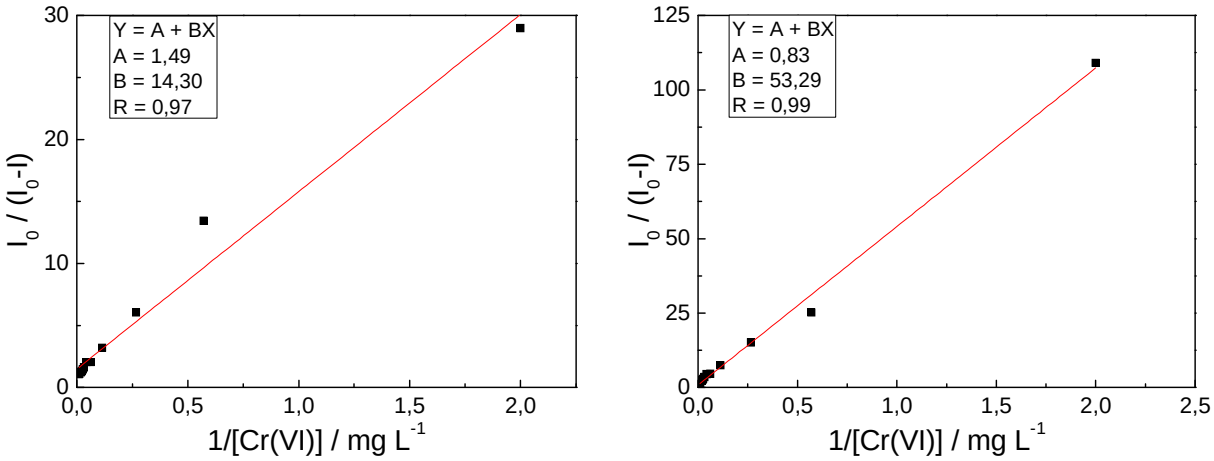

**Figura 33.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizada para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RTURARG extraída em período de seca.

Como pode ser observado nas Figuras acima para os dois períodos estudados em ambas as modalidades de fluorescência ocorreu a diminuição na IF das SH, desta forma um gráfico de 1/[Cromo(VI)] versus $I_0/(I_0-I)$ foi construído (Figura 34 e 35), sendo que o valor de Kc foi determinado a partir da linearização do gráfico.




(a) (b)

**Figura 34.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cr(VI) período de chuva no modo a) emissão e b) sincronizado.




(a) (b)

**Figura 35.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RTURARG-Cr(VI) período de seca no modo a) emissão e b) sincronizado.

Todas as curvas da supressão da fluorescência e a curva de linearização da IF para os complexos formados entre as diferentes SH e o Cr(VI) estão apresentados no anexo H. Na Tabela 11 são apresentados os valores de Kc para os complexos das SH.

**Tabela 11.** Constante de estabilidade Condicional dos complexos SH-Cr(VI).

| **Período da coleta** | **Local Amostragem** | **Cromo(VI)** | |
|---|---|---|---|
| | | **Emissão** | **Sincronizado** |
| **Período de chuva** | NRP | $5,98x10^{-2}$ | $1,39x10^{-3}$ |
| | CAPRP | $4,75\ x10^{-2}$ | $2,67x10^{-2}$ |
| | RTURARG | $3,36\ x10^{-2}$ | $6,89x10^{-3}$ |
| | RGRANDE | $8,77x10^{-2}$ | $2,71x10^{-2}$ |
| **Período de seca** | NRP | $1,00x10^{-1}$ | $7,4x10^{-2}$ |
| | CAPRP | $9,40x10^{-4}$ | $1,1x10^{-2}$ |
| | RTURARG | $1,04x10^{-1}$ | $1,55x10^{-2}$ |
| | RGRANDE | $1,15x10^{-1}$ | $1,99x10^{-2}$ |

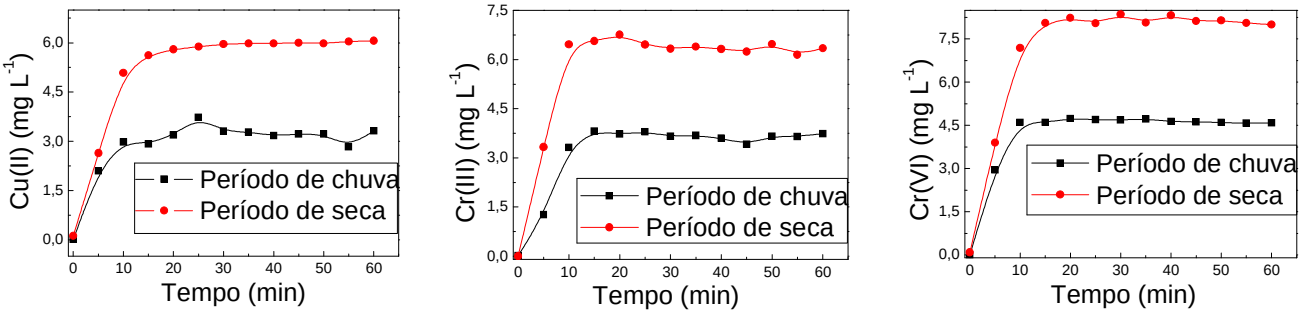
Como pode ser observado, os valores encontrados para a constante de estabilidade condicional dos complexos SH-Cr(VI) são maiores para as modalidades emissão e sincronizada, apenas para a $SH_{CAPRP}$ em período de chuva, para a $SH_{RGRANDE}$ a modalidade sincronizada o valor de Kc é maior para o mesmo período comparado ao de seca. Já as $SH_{NRP}$ e $SH_{RTURARG}$ apresentam comportamento contrário, sendo que em período de seca os valores de Kc foram maiores. Essa diferença encontrada pode estar relacionada à estrutura química das SH, a qual muda de acordo com o período de coleta e com o local de amostragem.

Estudo semelhante foi realizado por Melo (2010) com a SHA extraída de água do Rio Preto localizado no ponto de Captação de água da cidade de São José do Rio Preto. Neste estudo foi encontrado valor de Kc semelhante ao determinado neste trabalho ($2{,}60x10^{-2}$) na modalidade sincronizada, já na modalidade emissão no presente trabalho o valor foi duas vezes maior do que o determinado por Melo. Vale destacar que dados a respeito da interação de SH de sedimentos com o referido íon metálico utilizando a supressão da fluorescência são praticamente inexistentes.

## 5.4. Estudos da Capacidade Complexante das SH por meio do Sistema de Ultrafiltração com Fluxo Tangencial (SUFT)

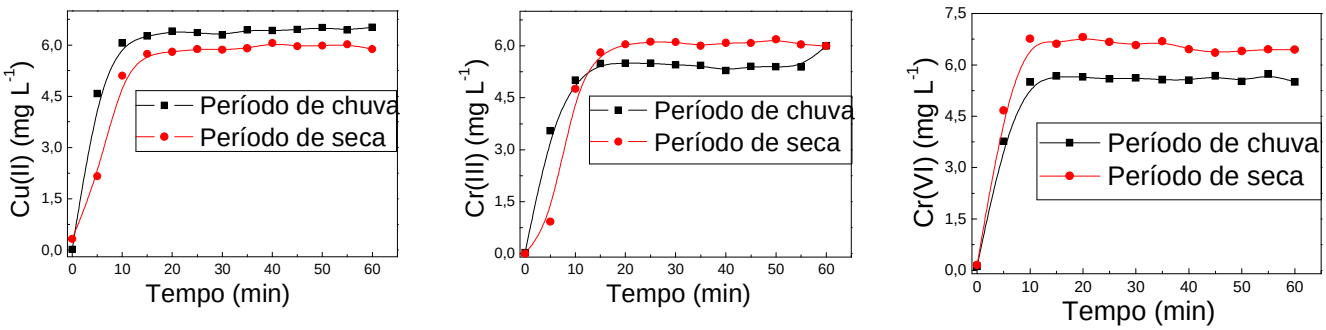
### 5.4.1. Tempo de Complexação

O tempo de complexação foi determinado para todas as SH, as Figuras 36-39 mostram os gráficos de tempo x concentração de metal livre para todos os pontos.



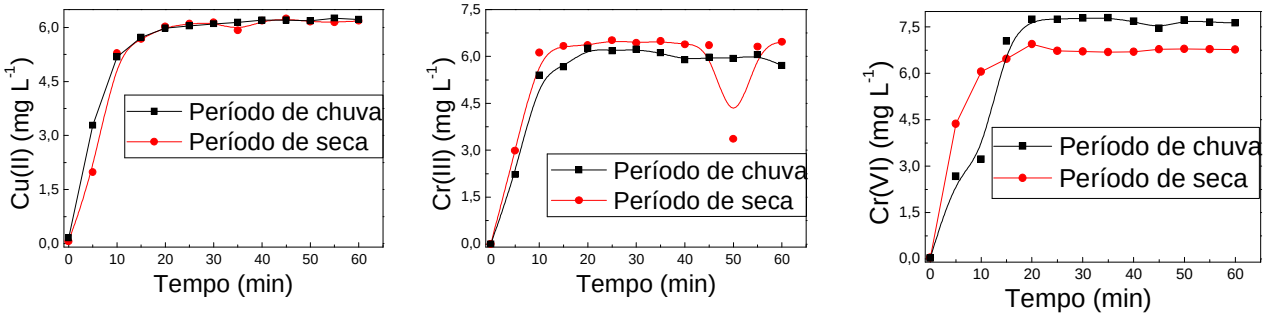

(a) (b) (c)

**Figura 36.** Cinética de complexação da SH CAPRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).



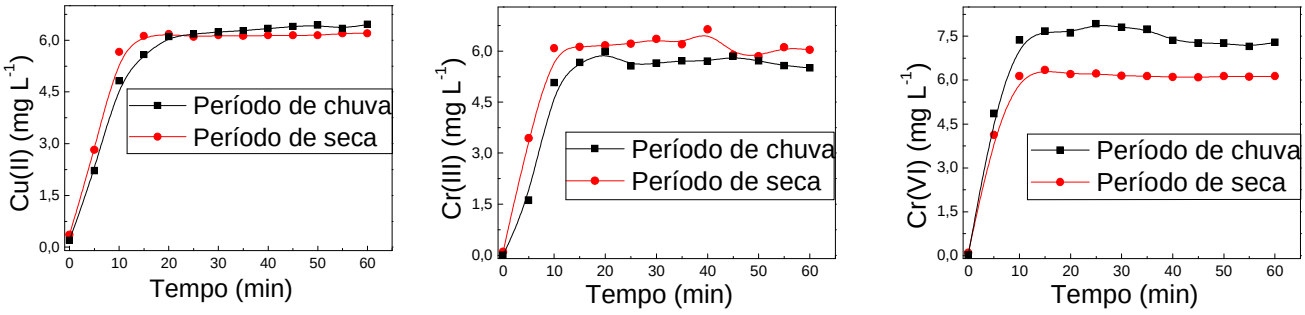

(a) (b) (c)

**Figura 37.** Cinética de complexação da SH NRP com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).




(a) (b) (c)

**Figura 38.** Cinética de complexação da SH RTURARG com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).




(a) (b) (c)

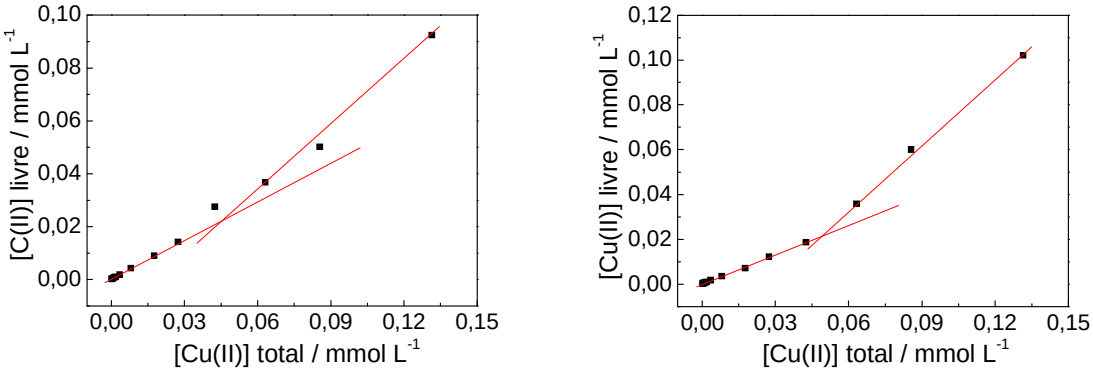
**Figura 39.** Cinética de complexação da SH RGRANDE com os metais (a) Cobre(II), (b) Cromo(III) e (c) Cromo(VI).

Para a $SH_{CAPRP}$, o tempo de complexação com os três metais foi o mesmo, sendo este de 15 minutos tanto para SH proveniente do período de chuva como de seca. Já a $SH_{NRP}$ apresentou comportamento um pouco diferente, o tempo de complexação das SH com o cobre(II) e o Cr(III) foi de 15 minutos, já com Cr(VI) foi de 10 minutos.

Ao estudar a cinética de complexação das $SH_{RTURARG}$ e a $SH_{RGRANDE}$ comportamento semelhante foi observado em relação ao período de seca e chuva, o tempo para atingir o equilíbrio de complexação foi o mesmo para ambas as SH, sendo de 20, 15 e 15 minutos para cobre, cromo(III) e cromo(VI), respectivamente.

### 5.4.2. Capacidade Complexante das SH com Cobre

Para determinar a capacidade de complexante das SH com o cobre foram realizadas titulações com solução padrão de Cu(II) utilizando o SUFT. Na titulação com o íon metálico, primeiro ocorre saturação dos sítios ligantes mais fortes e depois dos mais fracos. Essa diferença na força dos ligantes faz com que haja uma mudança na inclinação da curva de titulação, desta forma na intersecção das duas retas é determinado o valor da capacidade complexante (Einax; Kunze, 1996 apud Mendonça, 2010; Town e Powell, 1993).




(a) (b)

**Figura 40.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH NRP coletada a) período de chuva e b) período de seca com o metal cobre.

Os gráficos referentes às SH dos demais pontos de amostragem estão apresentados no anexo I. A Tabela 12 apresenta os valores determinados da capacidade complexante (CC) das substâncias húmicas com o Cu(II).

**Tabela 12.** Valores de CC para os complexos SH-Cu(II).

| Período de coleta | Local de Coleta | Capacidade complexante (mmol metal $g^{-1}$ SH) |
|---|---|---|
| Período de chuva | **NRP** | $4{,}6x10^{-1}$ |
| | **CAPRP** | $5{,}0\ x10^{-1}$ |
| | **RTURARG** | $6{,}3x10^{-1}$ |
| | **RGRANDE** | $4{,}0x10^{-1}$ |
| Período de seca | **NRP** | $5{,}1x10^{-1}$ |
| | **CAPRP** | $5{,}3x10^{-1}$ |
| | **RTURARG** | $3{,}7x10^{-1}$ |
| | **RGRANDE** | $1{,}4x10^{-1}$ |

Analisando os dados contidos na tabela acima é possível observar que os valores de CC são maiores quando as SH foram extraídas em período de chuva para os pontos RTURARG e RGRANDE, já para os pontos NRP e CAPRP comportamento contrário foi observado.

O maior valor de CC ocorre para as $SH_{RTURARG}$ e $SH_{CAPRP}$ para os períodos de chuva e seca, respectivamente, sendo assim são as SH que possuem uma maior interação com o metal cobre, portanto é possível que elas atuem reduzindo a disponibilidade deste metal para o corpo aquático, por outro lado, a $SH_{RGRANDE}$ é a que possui menor CC em ambos os períodos estudados, indicando uma menor interação com o Cu(II).

Vale destacar que diferenças estruturais, principalmente em relação aos grupos funcionais contendo oxigênio (grupos ácidos carboxílicos e fenólicos) também são responsáveis pela maior ou menor interação das SH com metais, deste modo pode influenciar nos valores de capacidade complexante. Muitos trabalhos descritos na literatura já demonstraram que SH que apresentam maior quantidade dos referidos grupos funcionais possuem uma maior interação por íon metálicos (Hernández et al., 2007; Hur e Lee, 2011; Plaza et al., 2006; Soler-Rovira et al., 2010;).

Como já descrito por alguns autores, a complexação das SH com o metal Cu(II) torna-o menos tóxico à biota (Broks et al., 2007; Santos et al., 2008). Portanto, os maiores valores de CC indicam que as SH do referido local podem reduzir a disponibilidade do referido metal para o corpo aquático, o que pode acarretar numa diminuição da toxicidade deste para a biota.

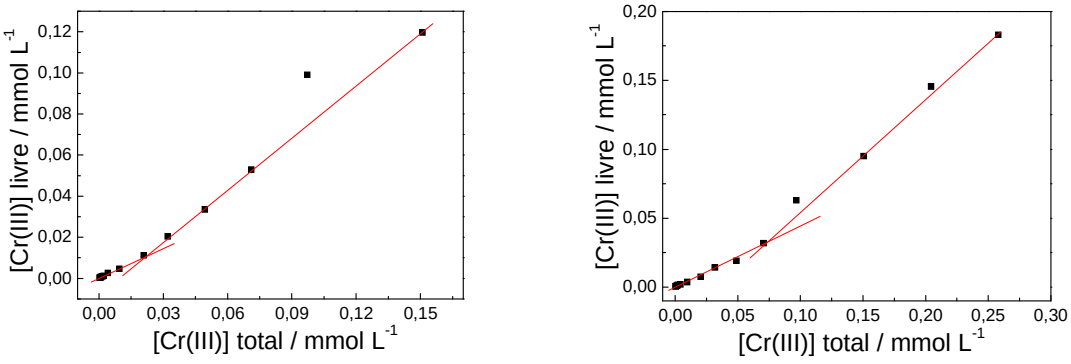
Mendonça (2010) determinou a capacidade de complexação de substâncias húmicas extraídas de turfas de São Simão – SP e Taquaral – SP com o cobre e encontrou valores que variaram de 0,47 a 0,84 mmol metal $g^{-1}$ de SH, valores esses próximos aos encontrados neste trabalho.

Em outro estudo, Romão et al (2003) determinou a capacidade complexante de SH aquáticas e de solos de diferentes regiões brasileiras em solo não alagado e alagado, ambos no Rio Negro (AM). Os valores encontrados de CC foram 1,99 e 1,52 mmol Cu(II) $g^{-1}$ COT, para os dois solos respectivamente. Vale destacar que esses valores foram superiores aos determinados por este trabalho, porém o presente trabalho determina a CC em função da massa de substâncias húmicas de sedimento enquanto Romão estudou a CC em função do COT.

Goveia et al., 2010 estudaram a interação das substâncias húmicas aquáticas com o cobre, por meio do SUFT, encontrando um valor de capacidade complexante igual a 0,99 mmol Cu(II) $g^{-1}$ DOC, esse valor é superior àqueles determinados no presente trabalho, porém vale ressaltar que as SH são de origens diferentes.

### 5.4.3. Capacidade Complexante das SH com Cromo(III)

A capacidade complexante das SH com o Cr(III) foi determinada de forma análoga ao método utilizado para o cobre. Deste modo, por meio da intersecção das duas retas obtidas na titulação das SH com o cromo(III) foi determinado o valor da capacidade complexante (Town e Powell, 1993; Einax; Kunze, 1996 apud Mendonça, 2010; Romão et al., 2003).




(a) (b)

**Figura 41.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH NRP coletada a) período de chuva e b) período de seca com o metal cromo(III).

Os gráficos referentes às SH dos demais pontos de amostragem estão apresentados no anexo J. A Tabela 13 mostra os valores determinados da capacidade complexante das substâncias húmicas com o Cr(III).

**Tabela 13.** Valores de CC para os complexos SH-Cr(III).

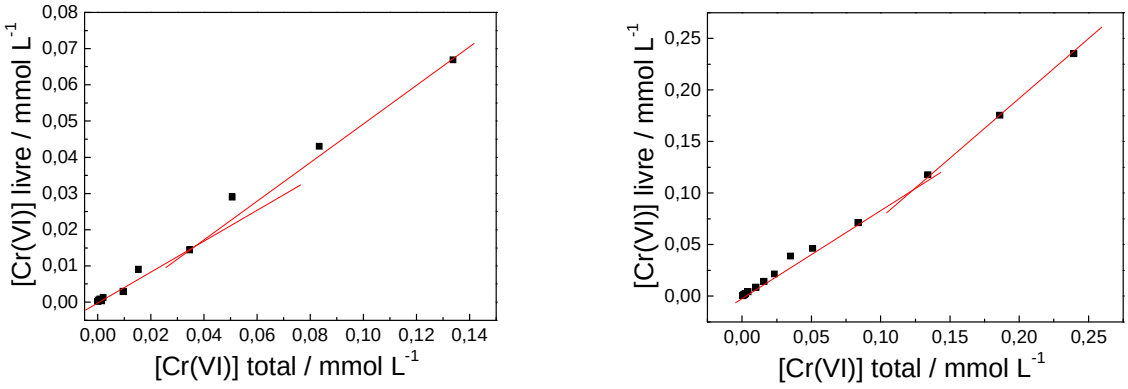
| Período de coleta | Local de Coleta | Capacidade complexante (mmol metal $g^{-1}$ SH) |
|---|---|---|
| Período de chuva | **NRP** | $2,1x10^{-1}$ |
| | **CAPRP** | $9,7x10^{-1}$ |
| | **RTURARG** | $2,5x10^{-1}$ |
| | **RGRANDE** | $8,3x10^{-1}$ |
| Período de seca | **NRP** | $7,6x10^{-1}$ |
| | **CAPRP** | $2,6x10^{-1}$ |
| | **RTURARG** | $8,4x10^{-1}$ |
| | **RGRANDE** | $6,4x10^{-1}$ |

Ao estudar a interação das SH com o íon $Cr^{3+}$ também foi evidente a influência da sazonalidade na capacidade complexante (CC) de diferentes substâncias húmicas, sendo que para a $SH_{NRP}$ e $SH_{RTURARG}$ esta capacidade é maior para período de seca, já para as outras duas SH estudadas comportamento contrário foi observado. O valor encontrado para CC da $SH_{CAPRP}$ chamou bastante atenção, sendo que em período de chuva é a SH que possui maior interação com o metal estudado, já em período de seca possui menor valor de CC dentre todas as SH estudadas. Vale destacar que as diferenças observadas na CC quando a sazonalidade é estudada pode ser atribuída às mudanças nas características da estrutura química das SH, tais como mudanças dos grupos funcionais e também na quantidade de metal originalmente já complexado pelas SH.

Van Den Bergh e colaboradores (2001) estudaram a interação de substâncias húmicas aquática com o cromo(III) e encontraram valor de capacidade de complexante de 0,92 mmol Cr(III) $g^{-1}$ COD. Este valor de CC foi um pouco superior ao encontrado neste trabalho, porém a SH estudada por esses autores possuem origem diferente daquela aqui estudada.

### 5.4.4. Capacidade Complexante das SH com Cromo(VI)

A capacidade complexante das SH com o Cr(VI) foi determinada de forma análoga ao método utilizado para os demais metais descrito acima. Deste modo, a CC foir calculada por meio da intersecção das duas retas obtidas na titulação das SH com o cromo(VI) (Town e Powell, 1993; Einax; Kunze, 1996 apud Mendonça, 2010; Romão et al., 2003).




(a) (b)

**Figura 42.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH NRP coletada a) período de chuva e b) período de seca com o metal cromo(VI).

Algumas substâncias húmicas originadas de diferentes locais de amostragem não exibiram a mudança na inclinação da reta quando foi titulada com o cromo(VI), deste modo para esta SH específica não foi possível calcular a CC.

Os gráficos referentes às SH dos demais pontos de amostragem estão apresentados no anexo K. A Tabela 14 mostra os valores determinados da capacidade complexante das substâncias húmicas com o Cr(VI).

**Tabela 14.** Valores de CC para os complexos SH-Cr(VI).

| Período de coleta | Local de Coleta | Capacidade complexante (mmol metal $g^{-1}$ SH) |
|---|---|---|
| Período de chuva | **NRP** | $3,8x10^{-1}$ |
| | **CAPRP** | 1,10 |
| | **RTURARG** | - |
| | **RGRANDE** | - |
| Período de seca | **NRP** | 1,23 |
| | **CAPRP** | $4,4x10^{-1}$ |
| | **RTURARG** | - |
| | **RGRANDE** | - |

- valores não calculados

Ao estudar a interação das SH com o íon $Cr^{6+}$ houve um comportamento bastante distinto do observado para o cobre e o cromo(III). Não foi possível calcular a CC para as SH referentes aos locais de amostragem RTURARG e do RGRANDE, para estes locais a titulação das SH pelo referido metal não apresentou uma mudança da inclinação da reta com as sucessivas adições de metal. A mudança na inclinação da reta é devido à diferença na força dos sítios ligantes das SH e ocorre quando há a saturação dos sítios ligantes mais forte e então os sítios ligantes mais fracos começam a ser saturados. É possível que as referidas SH que não apresentaram mudanças na inclinação da reta seja devido elas possuírem uma estrutura química com sítios ligantes de forças muito semelhantes, assim sendo não é visível a mudança na intersecção da reta, logo não é possível que a CC seja calculada.

Para a SH NRP o maior valor de CC ocorreu para período de seca, já para SH CAPRP comportamento contrário foi observado, indicando que para este local de amostragem há maior interação das SH com o cromo(VI) em período de chuva.

Santos e colaboradores estudaram a interação de substâncias húmicas de turfas com o cromo(VI) por meio do sistema de ultrafiltração, encontrando uma capacidade complexante de 4,63 mmol metal $g^{-1}$ COT, este valor é muito maior do que o encontrado neste trabalho, porém,

vale ressaltar que a matriz de onde a SH foi extraída é diferente e a CC foi calculada baseada no carbono orgânico total e não na massa de SH, como foi feito no presente trabalho.

## 6. Conclusão

- A caracterização pelas técnicas espectroscópicas (na região do ultravioleta/visível e na região do infravermelho) e fluorescência molecular indicou que as substâncias húmicas de sedimentos da BH-TG possuem características predominantemente aromáticas, tendo estrutura química mais condensada, provavelmente devido ao maior grau de humificação.
- Analisando os valores de razão $E_4/E_6$, os espectros na região do infravermelho e os espectros de fluorescência molecular pode-se inferir que a sazonalidade influencia na estrutura química das SH.
- A SH RGRANDE é a SH que possui maior possibilidade de atuar diminuindo a disponibilidade deste metal para o corpo aquático, uma vez que esta complexa até 99,3% do cobre presente no sedimento. A fração dos metais que não está ligada as SH está associado a outras frações geoquímicas.
- Os valores de constante de estabilidade condicional para os complexos SH-Cobre variaram de $5{,}60 \times 10^{-3}$ a 1,23, com exceção da $SH_{CAPRP}$ constatou-se que o valor da Kc é maior para o período de chuva, indicando que há maior interação das SH com o referido metal neste período quando comparado ao de seca.
- A interação com Cr(III) é maior em período de chuva (maiores valores de Kc) para todos os locais estudados com exceção da NRP. Por outro lado interação das SH com o Cr(VI) só foi maior no período de chuva para os pontos CAPRP.
- Os valores da capacidade complexante, determinados por meio do sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial variaram de $1{,}4 \times 10^{-1}$ a $6{,}3 \times 10^{-1}$ mmol Cu $g^{-1}$ SH. Foi possui verificar uma maior interação das SH com o cobre no período de chuva (maiores valores de CC) para os pontos RTURARG e RGRANDE, indicando que neste período é possível que essas SH atuem diminuindo a biodisponibilidade deste metal para o corpo aquático. Para os outros dois locais de amostragem comportamento contrário foi observado.
- Os valores da capacidade complexante das diferentes substâncias húmicas com o Cr(III) variaram de $2{,}1 \times 10^{-1}$ a $9{,}7 \times 10^{-1}$ mmol Cr $g^{-1}$ SH, foi possível observar a influencia da

sazonalidade, sendo que para $SH_{NRP}$ e $SH_{RTURARG}$ esta capacidade é maior para período de seca ($7,6x10^{-1}$ e $8,4x10^{-1}$ mmol Cr $g^{-1}$ SH, respectivamente), indicando assim maior interação das SH com o referido metal, já para as outras duas SH estudadas comportamento contrário foi observado.

## 7. Referências Bibliográficas


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

ARAÚJO, A. B. et al. Distribuição de metais e caracterização das constantes de troca entre espécies metálicas e frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1103-1107, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 9898**: preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987.

AZEVEDO, J. C. R.; NOZAKI, J. Análise de fluorescência de substâncias húmicas extraídas de água, solo e sedimento da Lagoa dos Patos-MS. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1324-1329, 2008.

BAKER, A.; GENTY, D. Fluorescence wavelength and intensity variations of cave waters. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 217, p. 19-34, 1999.

BARANCÍKOVA, G.; SENESI, N.; BRUNETTI, G. Chemical and spectroscopy characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. **Geoderma**, Amsterdam, v. 78, p. 251-266, 1997.

BERTOLO, R. A.; MARCOLAN, L. N. O.; BOUROTTE, C. L. M. Relações água-rocha e hidrogeoquímica do cromo na água subterrânea de poços de monitoramento multiníveis de Urânia, SP, Brasil. **Geologia USP**, São Paulo, v. 9, p. 47-62, 2009.

BROOKS, S. J. et al. Dissolved organic carbon reduces the toxicity of copper to germlings of the macroalgae, Fucus vesiculosus. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 70, n. 1, p. 88, 2007.

BUDZIAK, C. R. **Grupos ácidos e capacidade de oxidação de ácidos húmicos como método de avaliação de processos de compostagem**. Dissertação (Mestrado)-Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

BUFFLE, J. Les substances humiques et leurs interactions avec les ions mineraux. In: CONFERENCE PROCEEDINGS DE LA COMMISSION D'HYDROLOGIE APPLIQUEE DE I'A' G.H.T.M. L'UNIVERSITE D'ORSAY, 1970.

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. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 371, n. 5, p. 660-669, 2001.

CAO, J. et al. The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of $Cu^{+2}$ by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 507-514, 2004.

CHRISTENSEN, J. B. et al. Characterization of the dissolved organic carbon in landfill leachate-polluted groundwater. **Water Research**, New York, v. 32, n. 1, p. 125-135, 1998.

CLAPP, C. E.; HAYES, M. H. B.; SWIFT, R. S. Isolation, fractionation, functionalities, and concepts of structures of soil organic macromolecules. In: BECK, A. J. et al. (Ed.). **Organic substances in soil and water**: natural constituents and their influences on contamination behavior. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. p. 31-69.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2008**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes-/-relatorios>. Acesso em: 04 Fev. 2012.

_____. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2010**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes-/-relatorios>. Acesso em: 04 Fev. 2012.

DUARTE, R. M. B. O.; SANTOS, E. B. H.; DUARTE, A. C. Spectroscopic characteristics of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids isolated from an eucalyptus bleached Kraft pulp mill effluent. **Water Research**, New York, v. 37, n. 17, p. 4073-4080, 2003.

EINAX, J.; KUNZE, C. Complexation capacity of aquatic systems in dependence on different ligands and heavy metals electroanalytical investigations and statistical evaluation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 354, n. 7-8, p. 895-899, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 2016** - Sediment sampling. 1994.

_____. **Method 3050B** - Acid digestion of sediments, sluges and soil. 1996.

FERNANDES, A. N. et al. Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substance. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 971, n. 1-3, p. 33-38, 2010.

FERRARESI, R. F. M. S. **Caracterização do aporte de poluentes oriundos da atividade sucroalcooleira para a atmosfera, água, solo e sedimento**. 2011. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

FERRARI, E. et al. DRIFT and HR MAS NMR characterization of humic substances from a soil treated with different organic and mineral fertilizers. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 998, n. 1-3, p. 216-224, 2011.

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

FONTANA, A. **Fracionamento da matéria orgânica e caracterização de ácidos húmicos e sua utilização no sistema brasileiro de classificação de solos**. 2009. Tese (Doutorado)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GAGNETEN, A. M.; GERVASIO, S.; PAGGI, J. C. Heavy metal pollution and eutrophication in the lower salado river basin (Argentina). **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 178, p. 335-349, 2007.

GARCIA-MINA, J. M. Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal-humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1960-1972, 2006.

GIOVANELA, M. et al. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from the bottom sediments of a Brazilian subtropical microbasin. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 981, p. 111-119, 2010.

GOUVEIA, D. et al. Approach combining on-line metal exchange and tangential-flow ultrafiltration for in-situ characterization of metal species in humic hydrocolloids. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 397, n. 2, p. 851-860, 2010.

GUSSO, P. K. **Caracterização fluorométrica da matéria orgânica dissolvida e sua relação autóctone/alóctone na Baía de Paranaguá**. 2008. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

HERNÁNDEZ, D. et al. Fluorescence analysis of copper (II) and zinc (II) binding behaviour of fulvic acids from pig slurry and amended soils. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 58, p. 900-908, 2007.

HUR, J.; LEE, B-M. Characterization of binding site heterogeneity for copper within dissolved organic matter fractions using two-dimensional correlation fluorescence spectroscopy. **Chemosphere**, Oxford, v. 83, p. 1603-1611, 2011.

_____; _____; SHIN, H-S. Comparison of the structural, spectroscopic and phenanthrene binding characteristics of humic acids from soils and lake sediments. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1091-1099, 2009.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA). 2009. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/index.php>. Acessado em: Set. 2011.

JANOS, P. Separation methods in the chemistry of humic substances. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 983, p. 1-18, 2003.

KHALAF, M. et al. Comparison of sorption domains in molecular weight fractions of a soil humic acid using solid-state 19F NMR. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 37, p. 2855-2860, 2003.

KONONOVA, M. M. **Matéria orgânica del suelo**: su natureza, propriedades y métodos de investigacion. Barcelona: Oikos-Tau, 1982. 365 p.

_____. **Soil organic matter**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1966.

KRAJNC, M.; STUPAR, J.; MILICEV, S. Characterization of chromium and copper complexes with fulvic acids isolated from soils in Slovenia. **The Science of the Total Environment**, v. 159, n. 1, p. 23-31, 1995.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence espectroscopy**. 2. ed. New York: Kluwer Academic;Plenum Publisher, 1999.

LANDGRAF, M. D.; SILVA, S. C.; REZENDE, M. O. D. Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid sample from peat and vermicompost. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 368, p. 155-164, 1998.

LAVRIK, N. L.; MULLOEV, N. U. Fluorescence quenching study of the effect of association on the structure of humic acids. **Journal of Applied Spectroscopy**, New York, v. 77, p. 582-587, 2010.

LOMBARDI, A.T.; JARDIM, W. F. Fluorescence spectroscopy of high performance liquid chromatography fractionated marine and terrestrial organic materials. **Water Research**, New York, v. 33, p. 512–520, 1999.

LORENZO, J. I.; NIETO, O.; BEIRAS, R. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to Paracentrotus lividus in seawater. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 58, p. 27, 2002.

LUSTER, J.; LLOYD, T.; SPOSITO, G. Milti-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper (II) and aluminum (III) complexation by dissolved organic matter. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 30, p. 1565-1574, 1996.

MA, H. Z. et al. Effect of kinetics complexation by humic acid of copper to Ceriodaphnia dubia. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 18, p. 828-837, 1999.

MAC CARTHY, P. Soil organic matter as function of nitrogen fertilization in crop successions. **Soil Science**, Baltimore, v. 166, p. 738, 2001.

MADEJÓN, E. et al. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 55-65, 2001.

MAGDALENO, G. B. **Alguns estudos de fluorescência e quimiluminescência de substâncias húmicas**. 2007. Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MASTRÁNGELO, M.; AFONSO, M. S.; FERRARI, L. Cadmium toxicity in tadpoles of Rhinella arenarum in relation to calcium and humic acids. **Ecotoxicology**, London, v. 20, n. 6, p. 1225-1232, 2011.

MELO, C. A. **Caracterização e dinâmica de metais em rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande**. 2010. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

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

MIANO, T. M.; SPOSITO, G.; MARTIN, J. P. Fluorescence spectroscopy of humic substances. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 52, p. 1016-1019, 1988.

NOGUEIRA, P. F. M. et al. The effects of Anabaena spiroides (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity to Simocephalus serrulatus (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Biology**, Oxford, v. 50, n. 9, p. 1560-1567, 2005.

OLIVEIRA, L. C. et al. The influence of seasonalness on the structural characteristics of aquatic humic substances extracted from Negro River (Amazon State) waters: interactions with Hg (II). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 860-868, 2007.

PANDEY, A. K.; PANDEY, S. D.; MISRA, D. Stability constants of metal-humic acid complexes and its role environmental detoxification. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 47, n. 2, p. 195-200, 2000.

PERTUSATTI, J. **Aspectos físico-químicos da protonação e desprotonação da superfície do ácido húmico**. 2007. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.

PEURAVUORI, J.; KOIVIKKO, R.; PIHLAJA, K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with differents sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. **Water Research**, New York, v. 36, p. 4552-4562, 2002.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substance. **Soil Science**, Baltimore, v. 166, p. 810-832, 2001.

PLAZA, C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Fluorescence characterization of metal ion-humic acid interactions in soil amended with composted municipal solid wastes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 386, p. 2133-2140, 2006.

ROCHA, J. C. et al. Multi-method study on aquatic humic substances from the “Rio Negro” - Amazonas state/Brazil. Emphasis on molecular-size classification of their metal contents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 10, p. 169-175, 1999.

_____. et al. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro)-a possible process of the mercury cycle in Brazil. **Talanta**, London, v. 53, n. 3, p. 551-559, 2000.

_____; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas**: interações com espécies metálicas. São Paulo: Ed.UNESP, 2003.

ROMÃO, L. P. C. **Utilização do sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial como nova metodologia para determinação da capacidade de complexação e constantes de equílibrio de íons Cu (II) complexados por materia orgânica natural**. 2003. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

_____ et al. Redução de crômio hexavalente por substancias húmicas aquáticas imobilizadas em aminopropil sílica. **Eclética Química**, Marília, v. 27, n. esp., p. 383-391, 2002.

_____ et al. Tangential-flow ultrafiltration: a versatile methodology for determination of complexation parameters in refractory organic matter from Brazilian water and soil sample. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 375, p. 1097-1100, 2003.

ROSA, A. H. **Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfas utilizando-se hidróxido de potássio**. 1998. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1998.

_____; ROCHA, J. C.; FURLAN, M. Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam no processo de extração alcalina. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 472-476, 2000.

ROSA, G. D.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Utilization of ICP/OES for the determination of trace metal binding to defferent humic fractions. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 97, n. 1-3, p. 207-218, 2003.

RYAN, D. K.; WEBER, J. H. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 54, p. 986-990, 1982.

SAAB, S. D.; MARTIN-NETO, L. Anéis aromáticos condensados e relação E4/E6: estudo de ácidos húmicos de gleissolos por RMN 13-C no estado sólido utilizando a técnica CP/MAS desacoplamento defasado. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 260-263, 2007.

SANCHES, S. M.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Caracterização das frações das substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares. **Eclética Química**, Marília, v.32, p. 49-56, 2007.

SANTOS, A. et al. Competition between humic substances and α-amino acids by metal species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, p. 437-440, 2004.

SANTOS, H. O.; LOURENÇO, S. R.; OLIVEIRA, A. F. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas com uso de espectroscopia de UV/VIS. **Revista Tecnológica**, Maringá, v. 17, p. 29-38, 2008.

SANTOYO, E.; SANTOYO-GUTIÉRREZ, S.; VERMA, S. P. Trace analysis of heavy metals in groundwater samples by ion chromatography with post-column reaction and ultraviolet-visible detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 884, n. 1-2, p. 229-241, 2000.

SARGENTINI JUNIOR, E. et al. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 339-344, 2001.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Humic substances in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1972.

_____; _____. **Soil organic matter**. Amsterdan: Elsevier, 1978.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 80, p. 29-30, 1993.

_____; _____. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 162, p. 115-130, 1997.

SENESI, N. et al. Characterization, differentiation, and classification of humic substance by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, Baltimore, v. 52, p. 259-271, 1991.

SHARPLESS, C. M.; MCGOWN, L. B. Effects of aluminum-induced aggregation on the fluorescence of humic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 3264-3270, 1999.

SHIN, H.; MONSALLIER, J. M.; CHOPPIN, G. R. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid. **Talanta**, London, v. 50, p. 641-647, 1999.

SILVA, J. C. G. E. et al. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu (II), Fe (III) and $UO_2^{2+}$. **Talanta**, London, v. 45, p. 1155-1165, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; BONLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387 p.

SIMPSON, A. J. et al. Molecular structure and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 89, p. 84-88, 2002.

SLOBODA, E. **Influência do tamanho molecular aparente das substâncias húmicas aquáticas na eficiência da coagulação com sulfato de alumínio e cloreto férrico**. 2007. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SOLER-ROVIRA, P. et al. In situ remediation of metal-cantamined soils with organic amendments: Role of humic acids in copper bioavailability. **Chemosphere**, Oxford, v. 79, p. 844-849, 2010.

SOTO-JIMÉNEZ, M. F.; PÁEZ-OSUNA, F. A first approach to study the mobility and behavior of lead in hypersaline salt marsh sediments: diffusive and advective fluxes, geochemical partitioning and Pb isotopes. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 104, p. 87-96, 2010.

SPIERINGS, J. et al. Effect of humic substance photoalteration on lead bioavailability to freshwater microalgae. **Environmetal Science Technology**, Washington, v. 45, p. 3452-3458, 2011.

STACKHOUSE, R. A.; BENSON, W. H. The effect of humic acid on the toxicity and bioavaillability of trivalent chromium. **Ecotoxicology and Environment Safety**, New York, v. 17, p. 105-111, 1989.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry**: genesis, composition, reactions. New York: John Wiley, 1994. 496 p.

TADINI, A. M. et al. O efeito do emprego de algicidas na qualidade das águas de recreação de piscinas da cidade de São José do Rio Preto. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais**… Fortaleza, 2009.

TERBOUCHE, A. et al. Characterization and complexing capacity of humic acid extracted from Yakouren soil with heavy metals by conductimetry and quenching fluorescence. **Soil & Sediment Contamination**, Boca Raton, v. 19, p. 21-41, 2010.

TOLEDO, A. P. P.; CARVALHO, J. L. Comparação sobre a capacidade de extração de substâncias húmicas por vários solventes. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 37, n. 7, p. 1174, 1985.

TOWN, R. M.; POWELL, H. K. J. Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatography of humic substances. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 256, n. 1, p. 81-86, 1992.

_____; _____. Ion-seletive electrode potenciometric studies on the complexation of copper (II) by soil-derived humic and fulvic acids. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 279, n. 2, p. 221-233, 1993.

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

VENTRY, L. S.; RYAN, D. K.; GILBERT, T. R. A rapid fluorescence quenching method for the determination of equilibrium parameters for copper (II) complexation by humic materials. **Microchemical Journal**, New York, v. 44, p. 201-214, 1991.

WASSERMAN, J. C.; OLIVEIRA, F. B. L.; BIDARRA, M. Cu and Fe associated with humic acids in sediments of a tropical coastal lagoon. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 28, p. 813-822, 1998.

WILSON, G.; ALHAMDANI, S. Effects of chromium (VI) and humic substances on selected physiological responses of Azolla caroliniana. **American Fern Journal**, Washington, v. 87, p. 17-27, 1997.

ZARA, L. F. et al. A structural conformation study of aquatic humic acid. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 17, p. 1014-1019, 2006.

ZHANG, D. et al. Complexation between Hg (II) and biofilm extracellular polymeric substance: an application of fluorescence spectroscopy. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.175, p. 359-365, 2010.

ZHANG, Y. et al. Chemical characterization of humic substances isolated from mangrove swamp sediments: the Qinglan area of Hainan Island, China. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 93, p. 220-227, 2011.

# ANEXO A

**Tabela 3.** Condições Instrumentais utilizadas na determinação dos metais por FAAS.

| **Parâmetros** | **Elementos** | |
|---|---|---|
| | **Cu** | **Cr** |
| Corrente da Lâmpada (mA) | 4 | 7 |
| Abertura de fenda (nm) | 0,5 | 0,2 |
| Comprimento de onda (nm) | 324,8 | 357,9 |
| Fluxo de acetileno (mL $min^{-1}$) | 2,00 | 2,90 |
| Tipo de oxidante* | AC | AC |
| Fluxo de oxidante (mL $min^{-1}$) | 13,50 | 13,50 |
| Modalidade** | A | A |

* AC: ar comprimido

** A: absorção atômica

**Tabela 4.** Condições Instrumentais utilizadas na determinação dos metais por GFAAS.

| **Parâmetros** | **Elementos** | |
|---|---|---|
| | **Cu** | **Cr** |
| Corrente da Lâmpada (mA) | 4 | 7 |
| Abertura de fenda (nm) | 0,5 | 0,2 |
| Comprimento de onda (nm) | 327,4 | 357,9 |
| Volume de injeção (µL) | 9 | 6 |
| Volume de injeção do modificador (µL) | 9 | 6 |
| Temperatura de pirólise (ºC) | 800 | 1000 |
| Temperatura de atomização (ºC) | 2300 | 2600 |

# ANEXO B

## Resultados do ensaio de proficiência em tecido vegetal da Embrapa

O Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais, no qual este trabalho foi desenvolvido, participou do ensaio de proficiência em determinação de metais em amostras de tecido vegetal no ano de 2010. A Embrapa forneceu 12 amostras durante 4 rodadas, nas quais os metais Fe, Mn, Na, K, Zn e Cu foram determinados. Os resultados desse ensaio são divulgados na forma de "índice z" e sua interpretação é realizada da seguinte maneira: resultados cujo valor estiver dentro do intervalo $|z| \leq 2$ são considerados satisfatórios; resultados que estiverem no intervalo $2 < |z| < 3$ são considerados questionáveis e, resultados acima do valor $|z| \geq 3$ são considerados insatisfatórios. Na tabela 5 são apresentados os resultados do índice z para os metais determinados em 3 rodadas ( a última rodada não teve resultados divulgados pela Embrapa até o presente momento).

**Tabela 5.** Resultados do índice z obtidos no ensaio de proficiência em tecido vegetal.

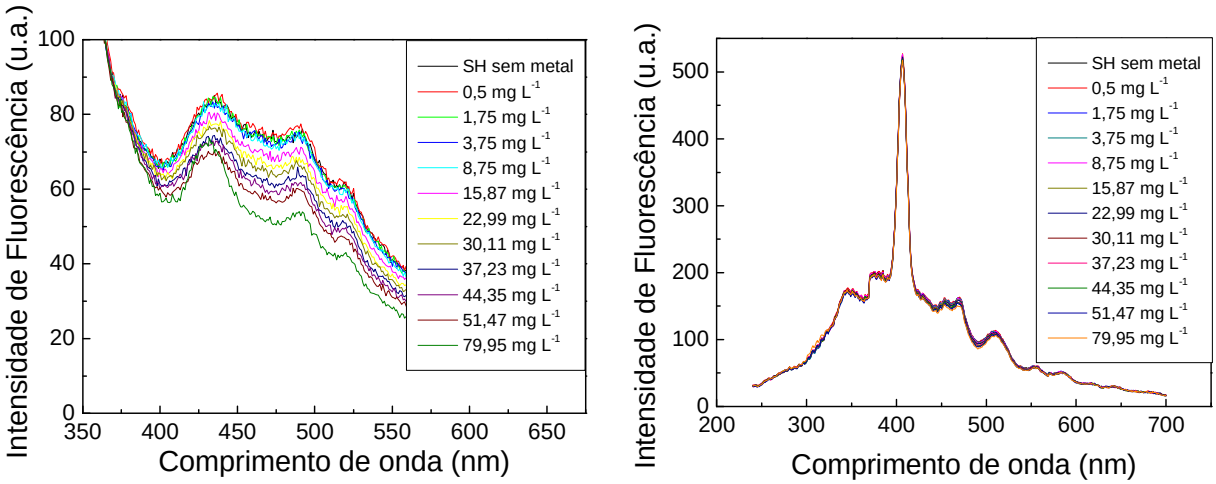
| Rodada | Amostra | Fe | Mn | Na | K | Zn | Cu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 01 | 0,0 | -0,9 | 0,0 | -1,0 | -2,3* | -1,1 |
| | 02 | -0,1 | -0,3 | 0,0 | -0,7 | -0,3 | -3,3* |
| 2 | 03 | -0,8 | -3,0* | 0,0 | -1,1 | -1,2 | -2,1* |
| | 04 | 0,6 | -2,2* | 0,0 | -1,2 | -2,0 | -2,0* |
| 3 | 05 | 0,5 | -1,5 | 0,0 | 0,0 | -1,1 | -0,5 |
| | 06 | 0,3 | -1,5 | 1,5 | -0,2 | -3,4 | -1,1 |

* Resultado questionável ou insatisfatório.

Os resultados mostram que a maioria dos valores encontrados para as concentrações dos metais foram satisfatórios. Resultados questionáveis foram obtidos para Mn, Zn e Cu em algumas amostras. Esses problemas foram relacionados com o preparo do padrão, pois com a troca dos mesmos os problemas foram sanados nas rodadas seguintes.

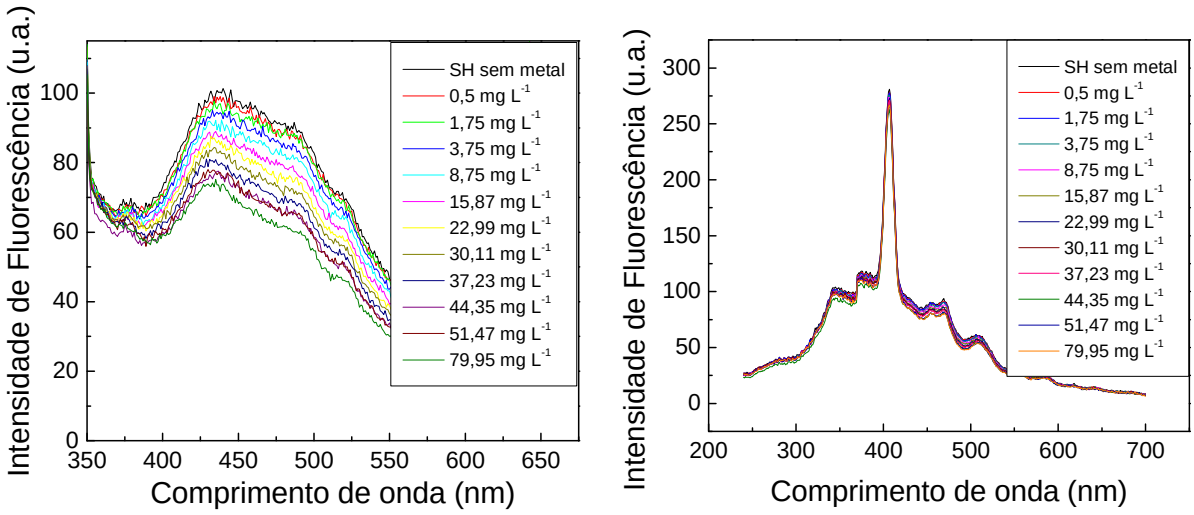
# ANEXO C

## Gráficos que mostram a supressão da fluorescência das substâncias húmicas com a adição do cobre(II)



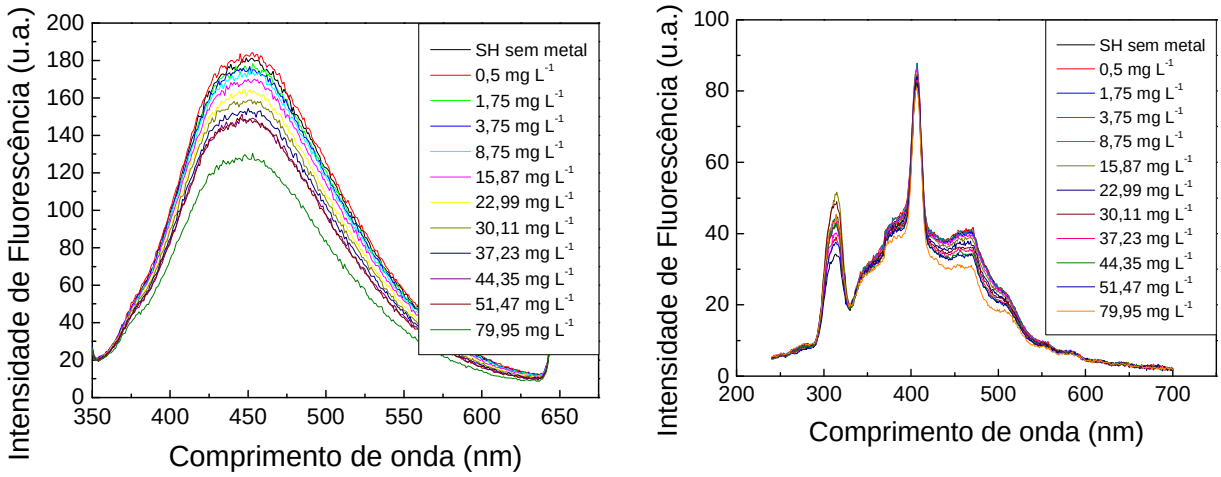

(a) (b)

**Figura 43.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).



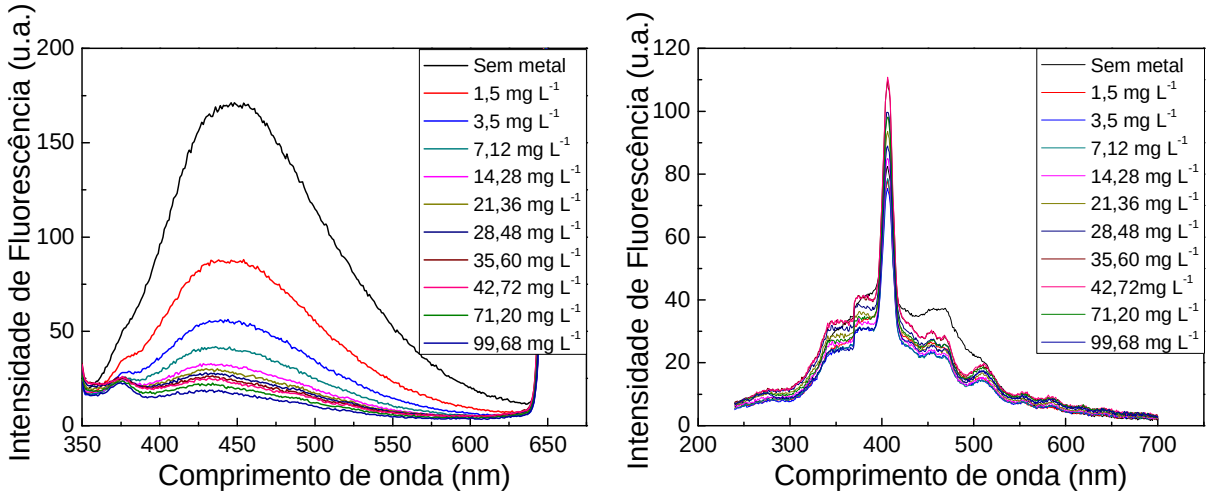

(a) (b)

**Figura 44.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).



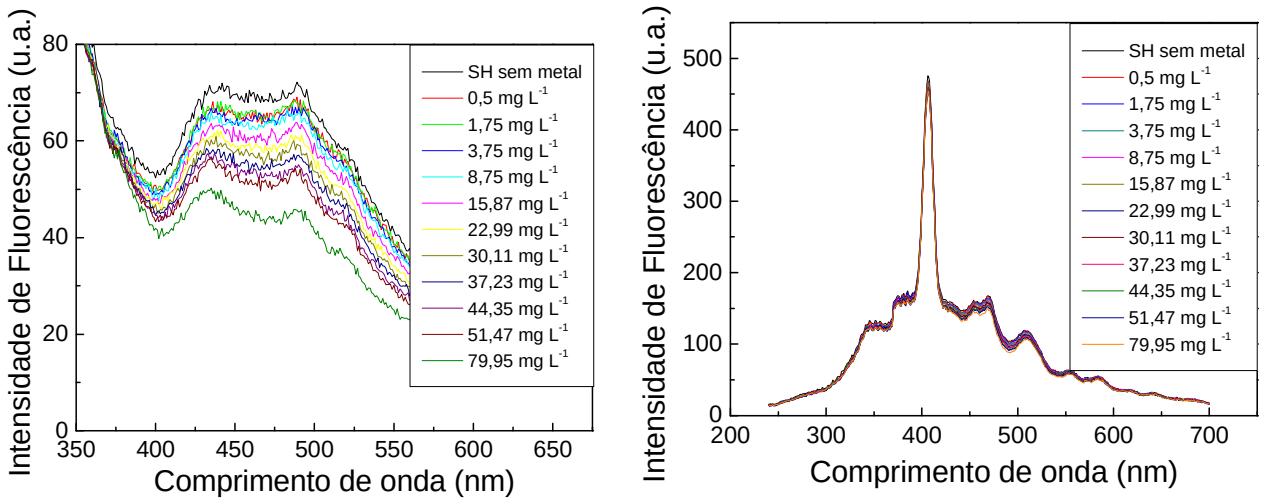

(a) (b)

**Figura 45.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).



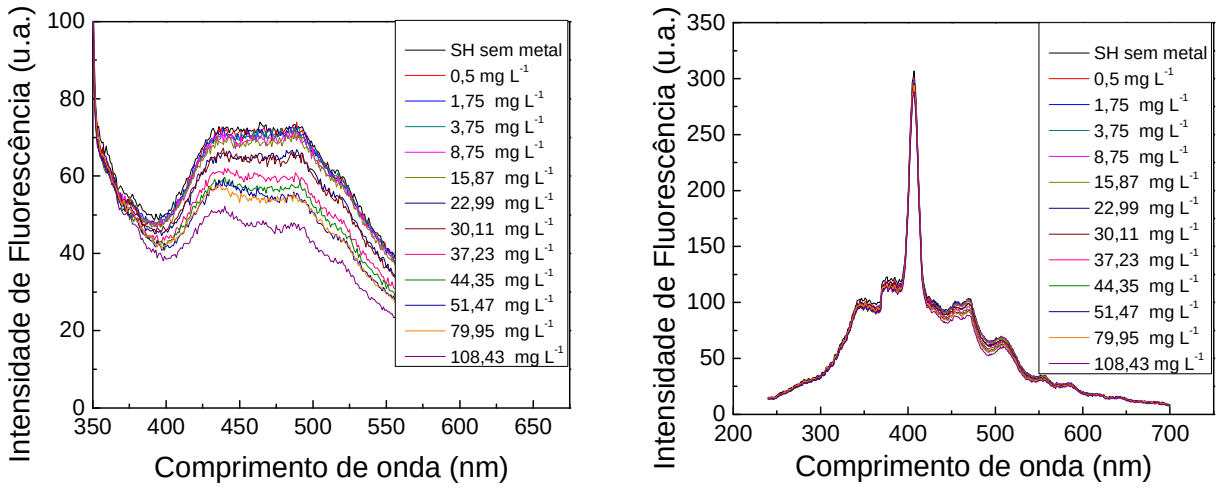

(a) (b)

**Figura 46.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).




(a) (b)

**Figura 47.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).

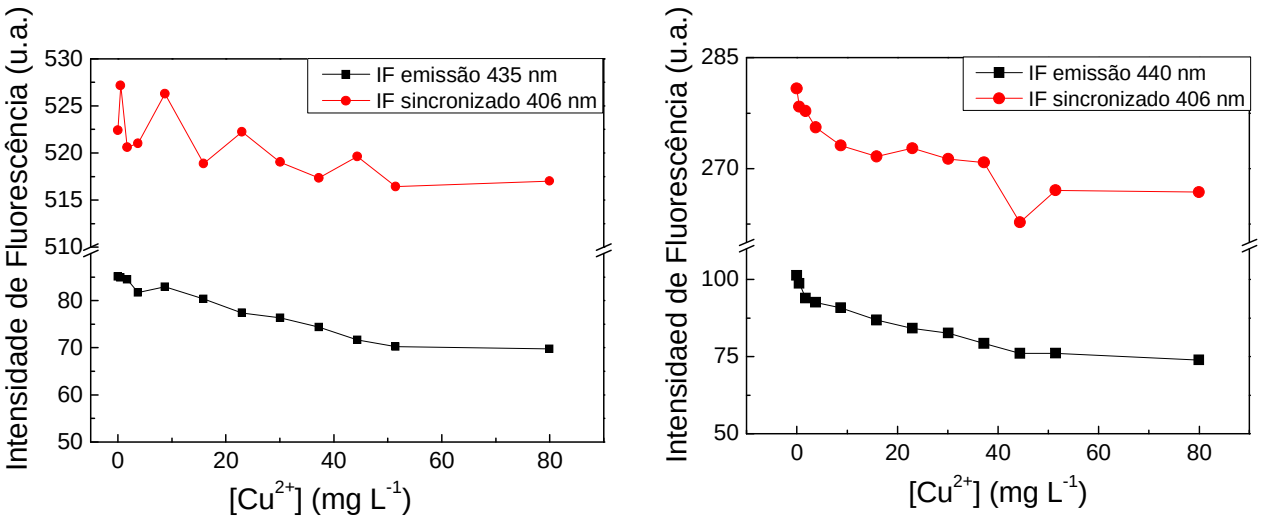



(a) (b)

**Figura 48.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cobre(II).

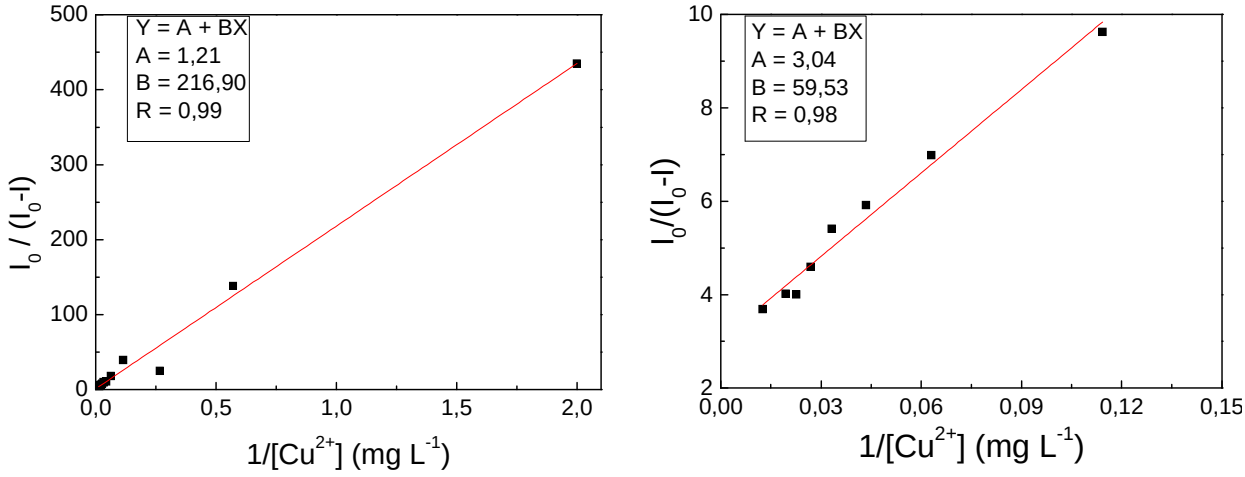
## ANEXO D

**Curvas de Supressão da fluorescência e da linearização da Intensidade de Fluorescência dos complexos SH-Cu(II)**



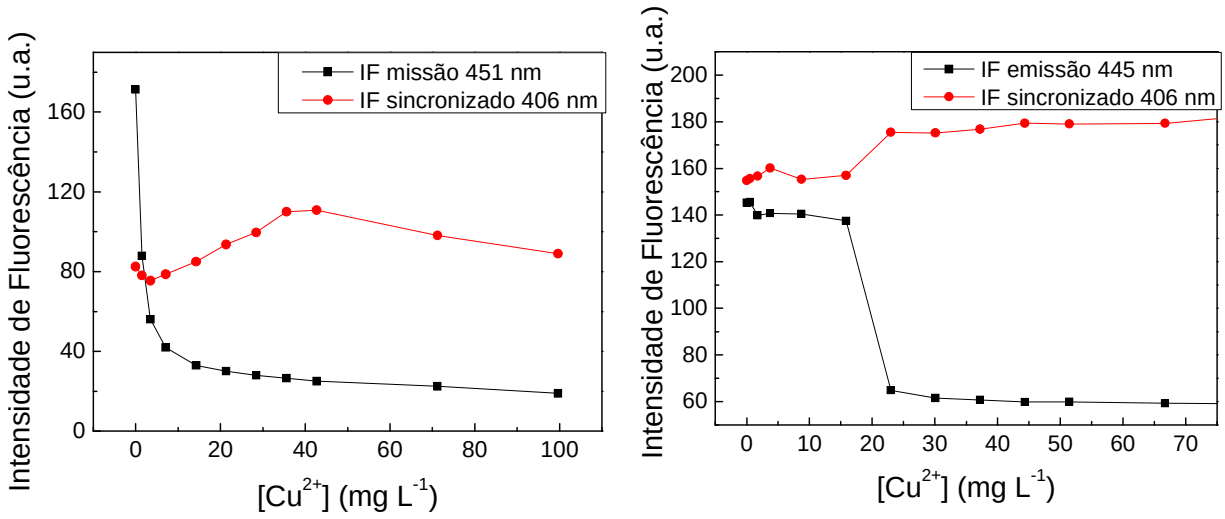

(a) (b)

**Figura 49.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH CAPRP (a) período de chuva e (b) período de seca.



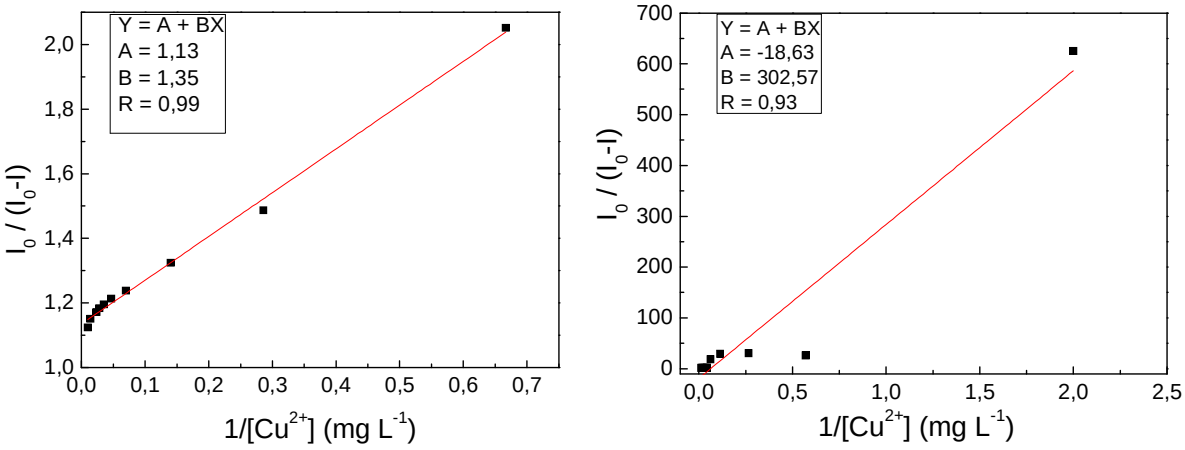

(a) (b)

**Figura 50.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.



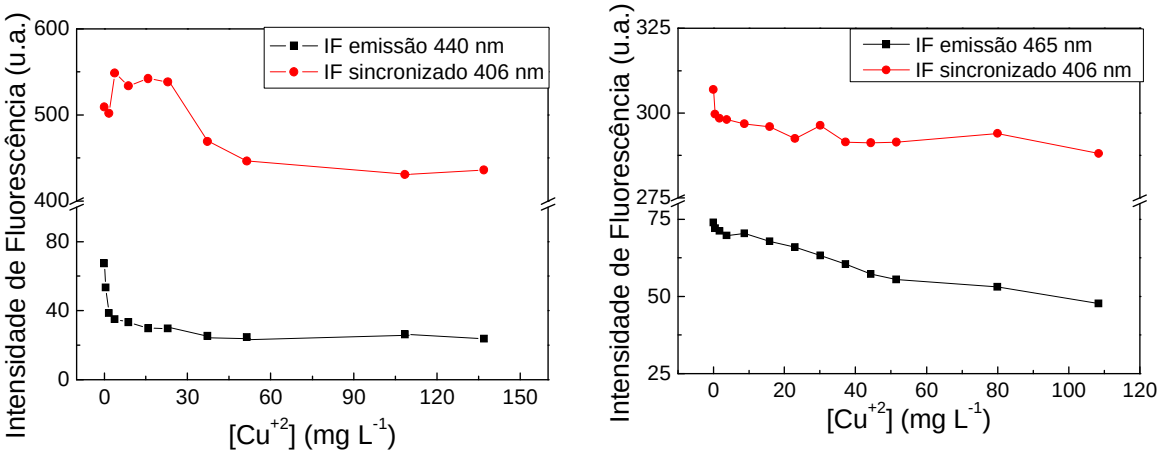

(a) (b)

**Figura 51.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH NRP (a) período de chuva e (b) período de seca.



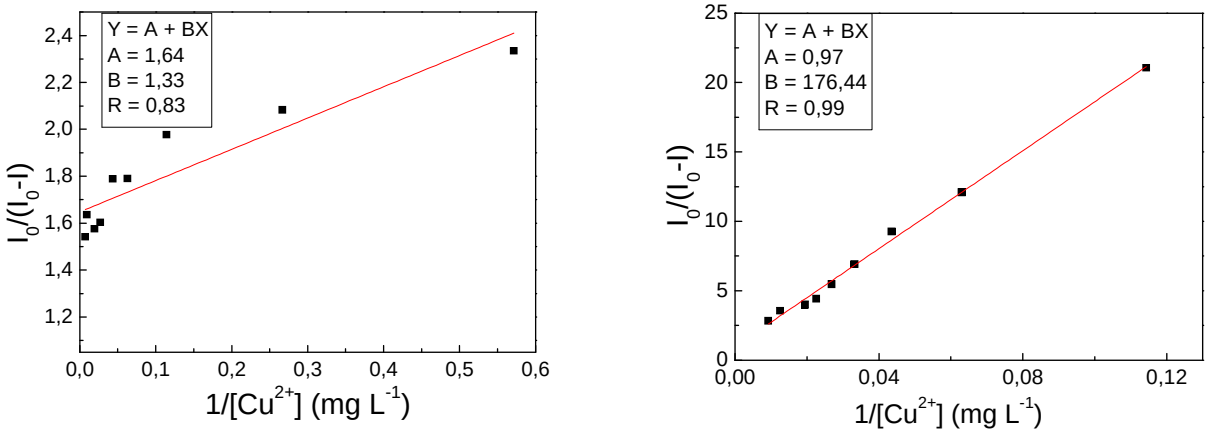

(a) (b)

**Figura 52.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.




(a) (b)

**Figura 53.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cu(II) para a SH RGRANDE (a) período de chuva e (b) período de seca.

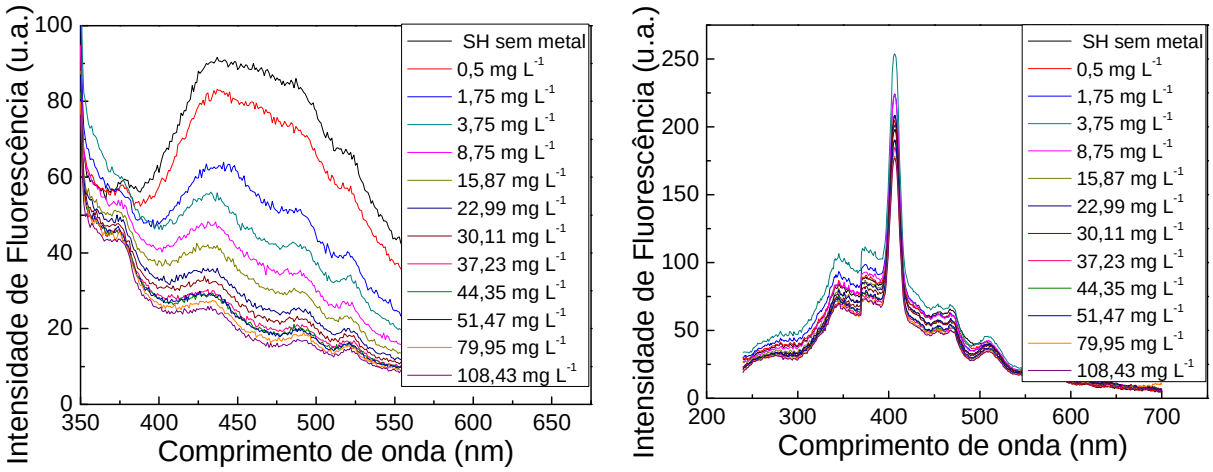



(a) (b)

**Figura 54.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cu(II) (a) período de chuva e (b) período de seca.

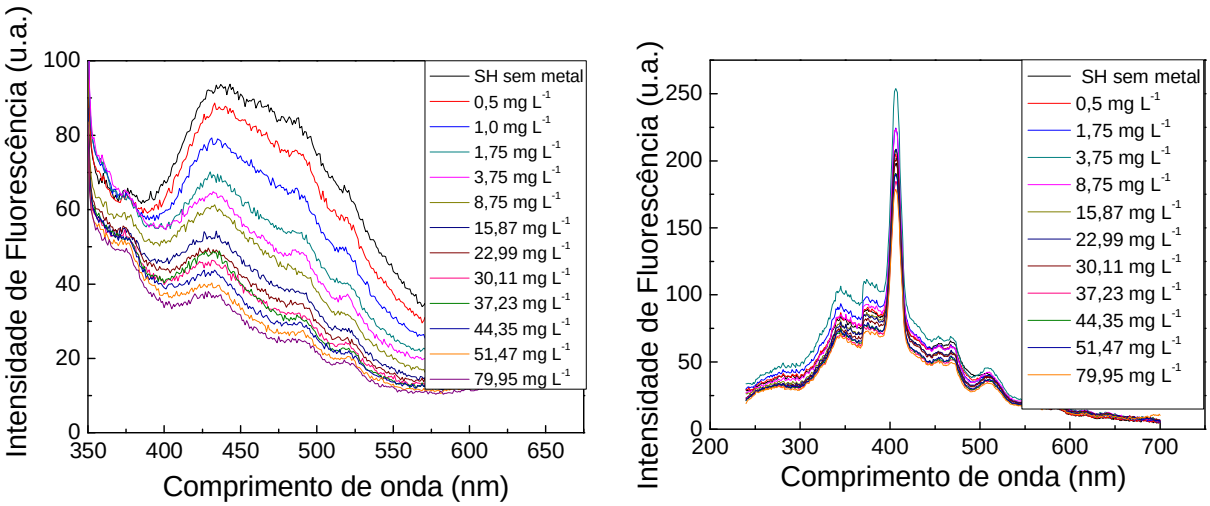
## ANEXO E

### Gráficos que mostram a supressão da fluorescência das substâncias húmicas com a adição do cromo(III)



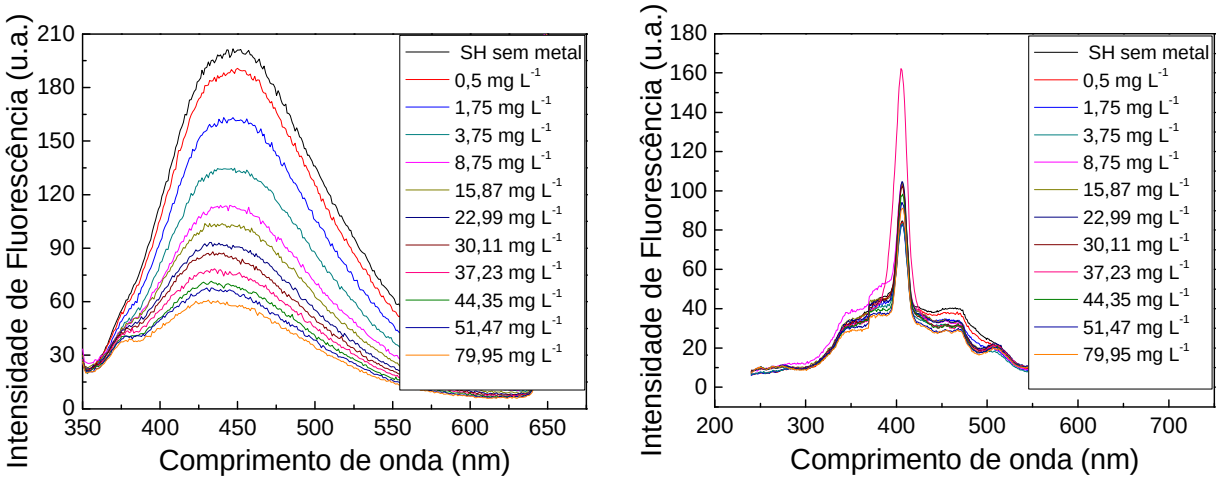

(a) (b)

**Figura 55.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).



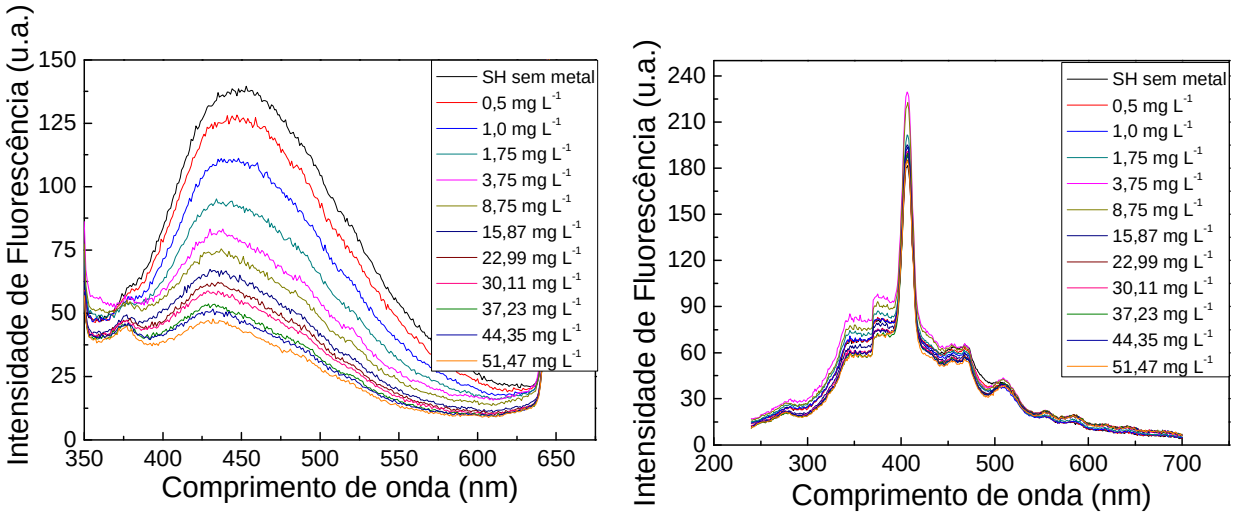

(a) (b)

**Figura 56.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).



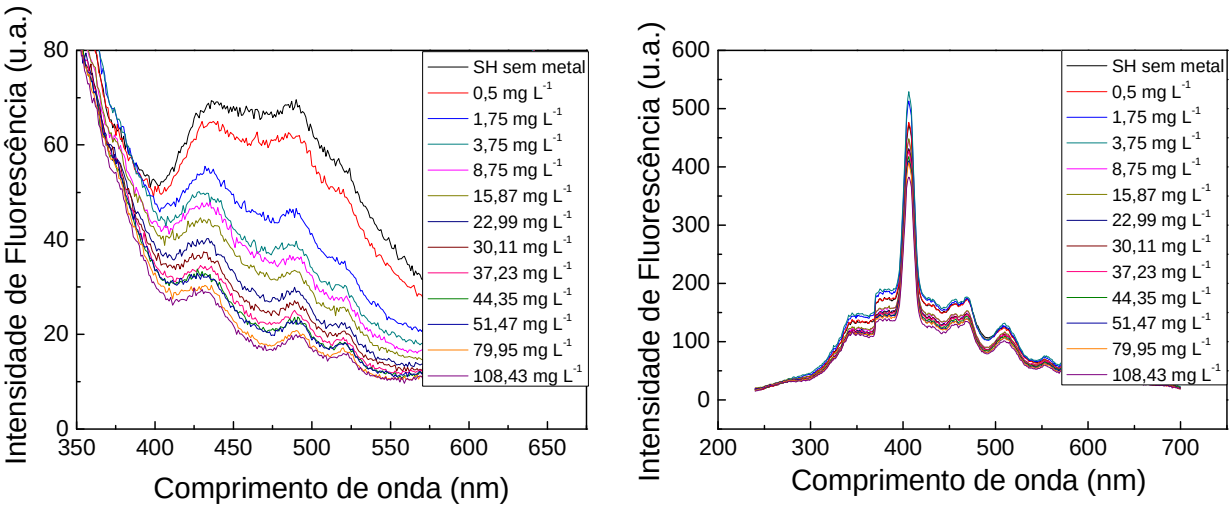

(a) (b)

**Figura 57.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).



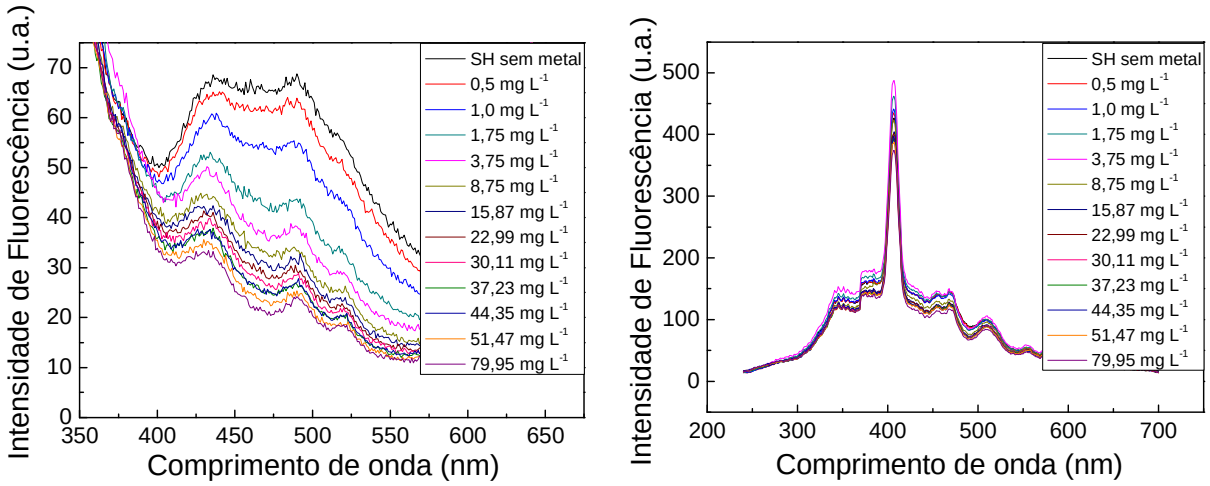

(a) (b)

**Figura 58.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).




(a) (b)

**Figura 59.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).

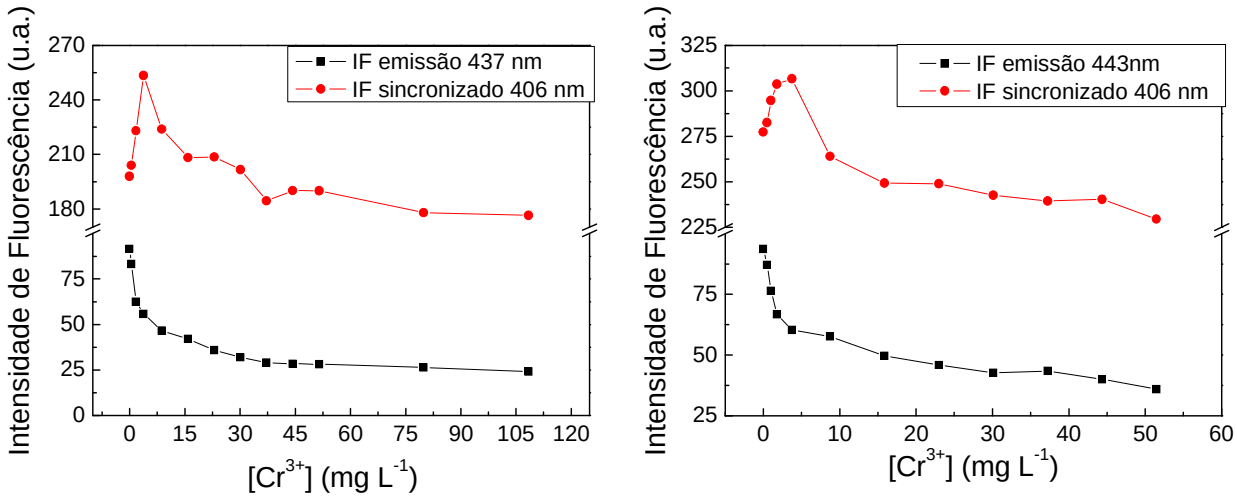



(a) (b)

**Figura 60.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(III).

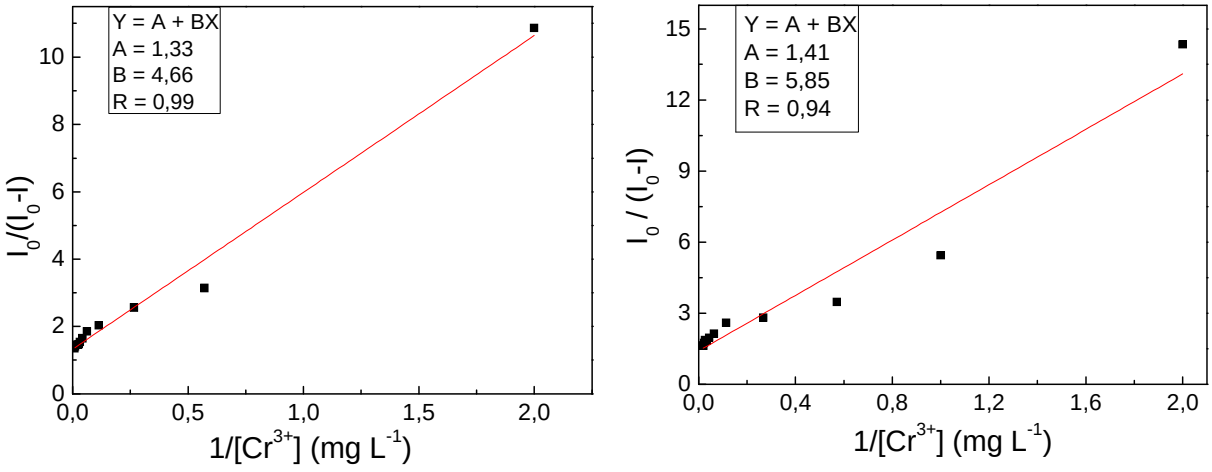
# ANEXO F

## Curvas de Supressão e da linearização da Intensidade de Fluorescência dos complexos SH-Cu(III)



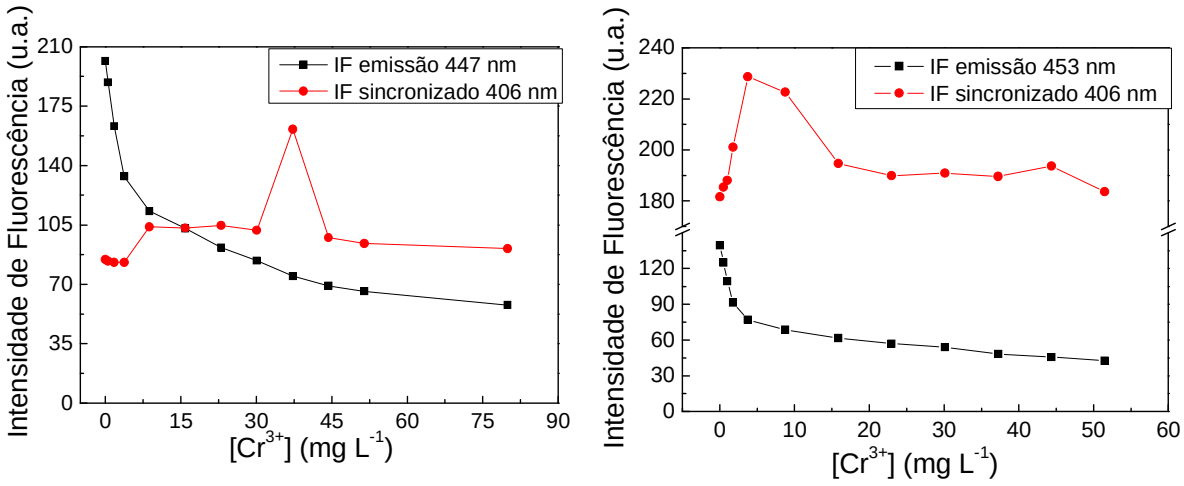

(a) (b)

**Figura 61.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH CAPRP (a) período de chuva e (b) período de seca.



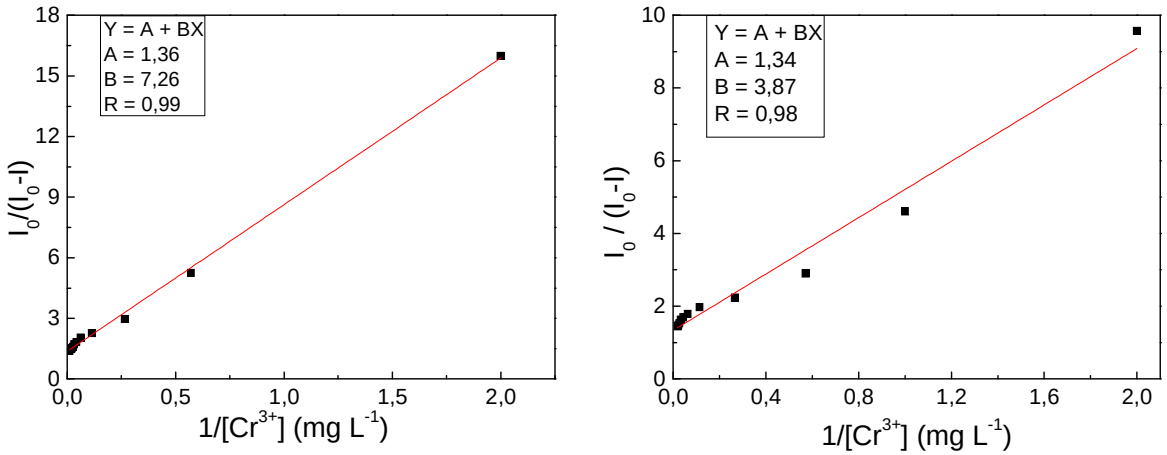

(a) (b)

**Figura 62.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.



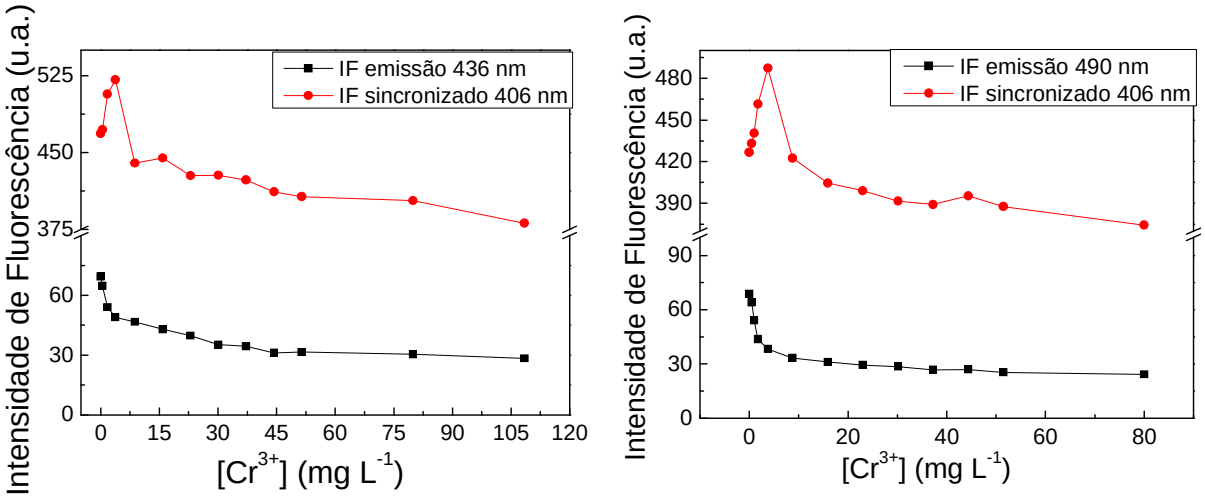

(a) (b)

**Figura 63.** Curvas de supressão de fluorescência naa s modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH NRP (a) período de chuva e (b) período de seca.



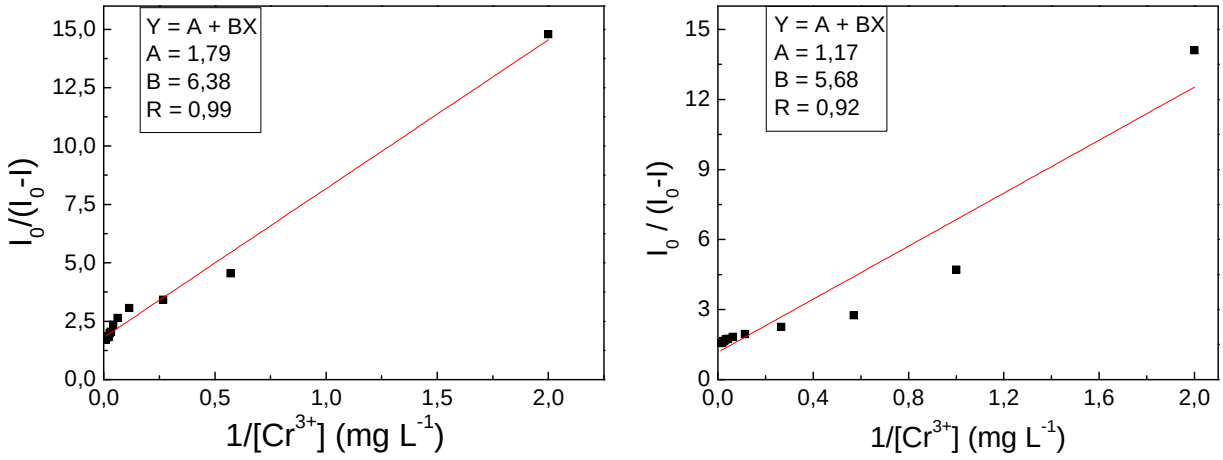

(a) (b)

**Figura 64.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.




(a) (b)

**Figura 65.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(III) para a SH RGRANDE (a) período de chuva e (b) período de seca.

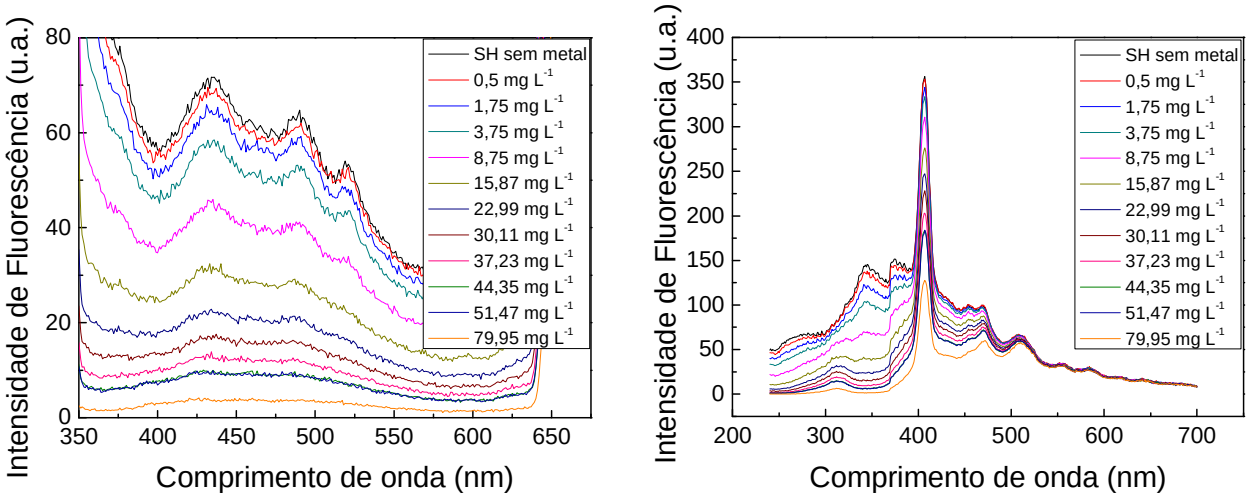



(a) (b)

**Figura 65.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência no modo emissão para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cr(III) (a) período de chuva e (b) período de seca.

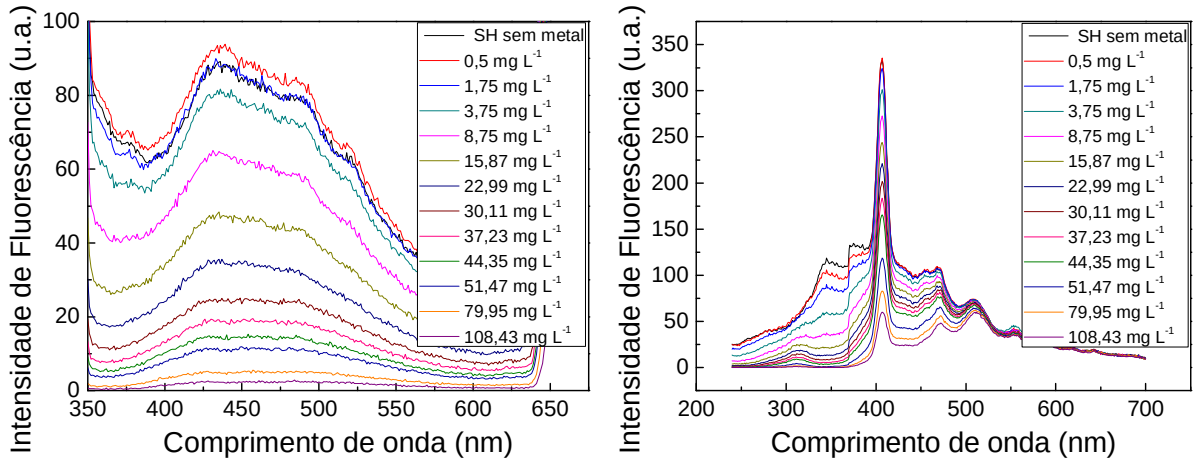
# ANEXO G

## Gráficos que mostram a supressão da fluorescência das substâncias húmicas com a adição do cromo(VI)



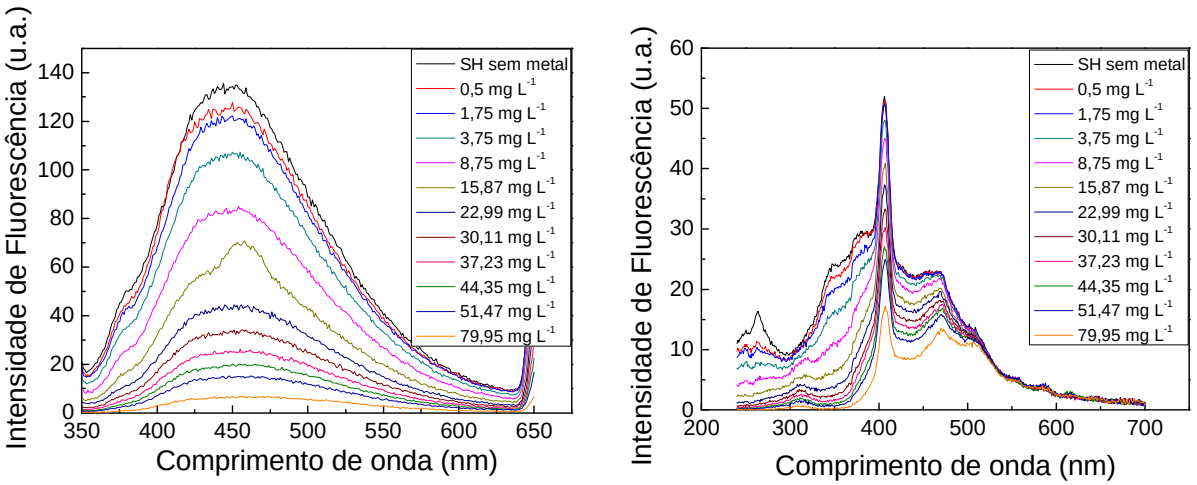

(a) (b)

**Figura 67.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).



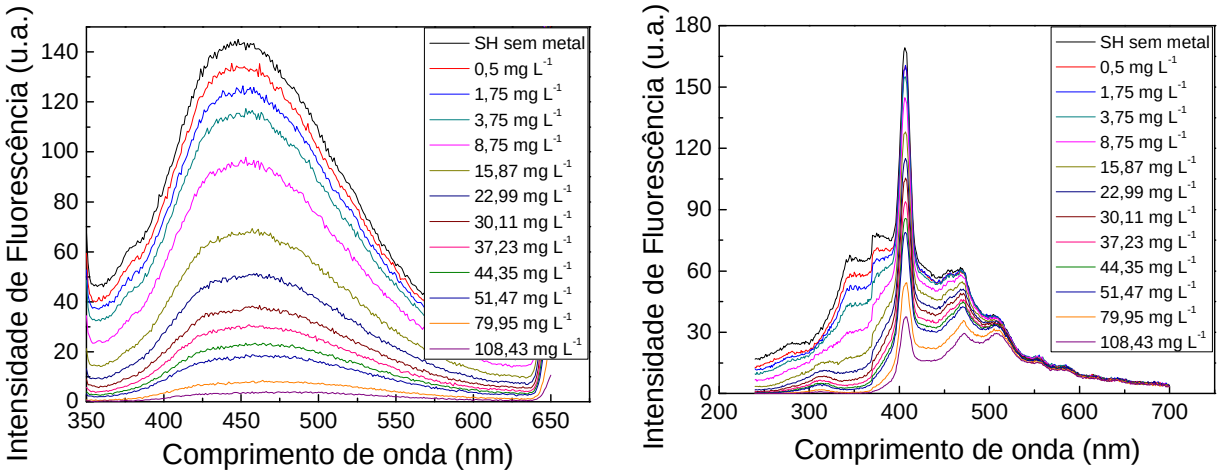

(a) (b)

**Figura 68.** Espectros de fluorescência da SH CAPRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).



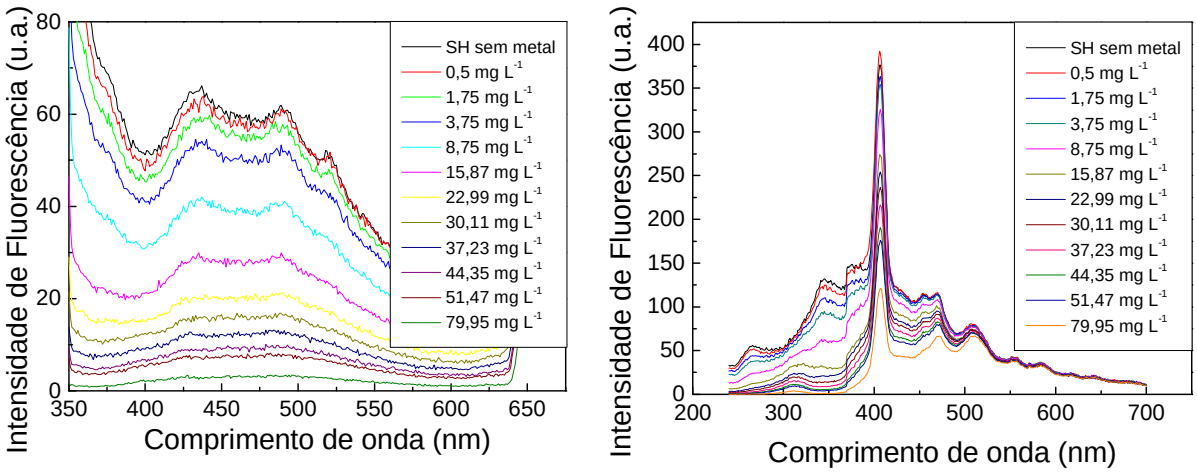

(a) (b)

**Figura 69.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).



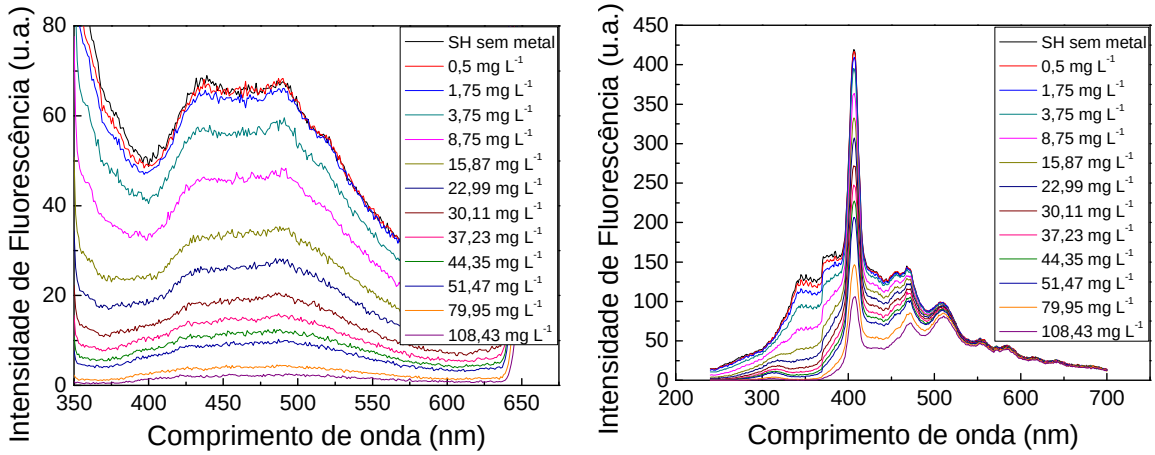

(a) (b)

**Figura 70.** Espectros de fluorescência da SH NRP extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).




(a) (b)

**Figura 71.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de chuva no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).




(a) (b)

**Figura 72.** Espectros de fluorescência da SH RGRANDE extraída em período de seca no modo (a) emissão e (b) sincronizado obtidos na titulação da SH com cromo(VI).

# ANEXO H

## Curvas de Supressão e da linearização da Intensidade de Fluorescência dos complexos SH-Cr(VI)

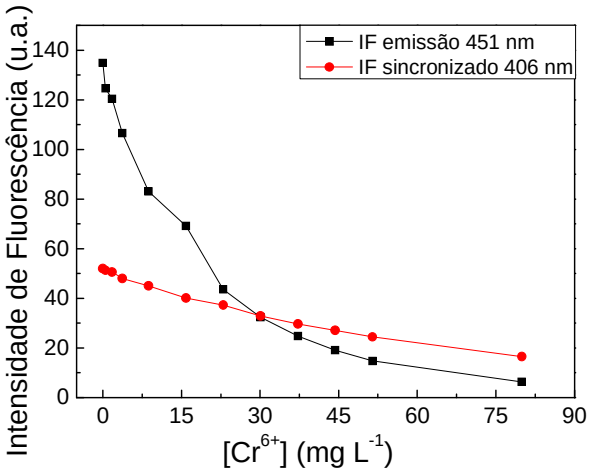
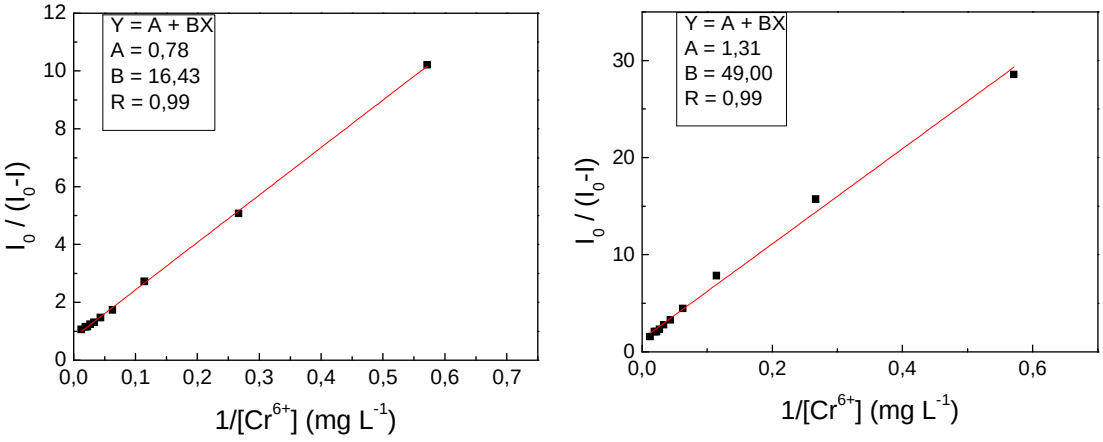



**Figura 73.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH CAPRP extraída em período de chuva.




(a) (b)

**Figura 74.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.

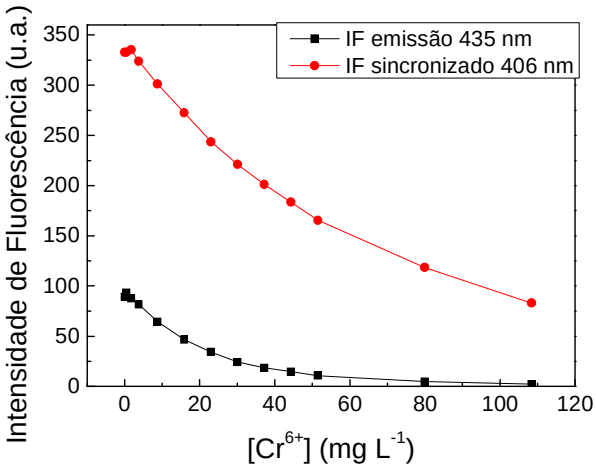
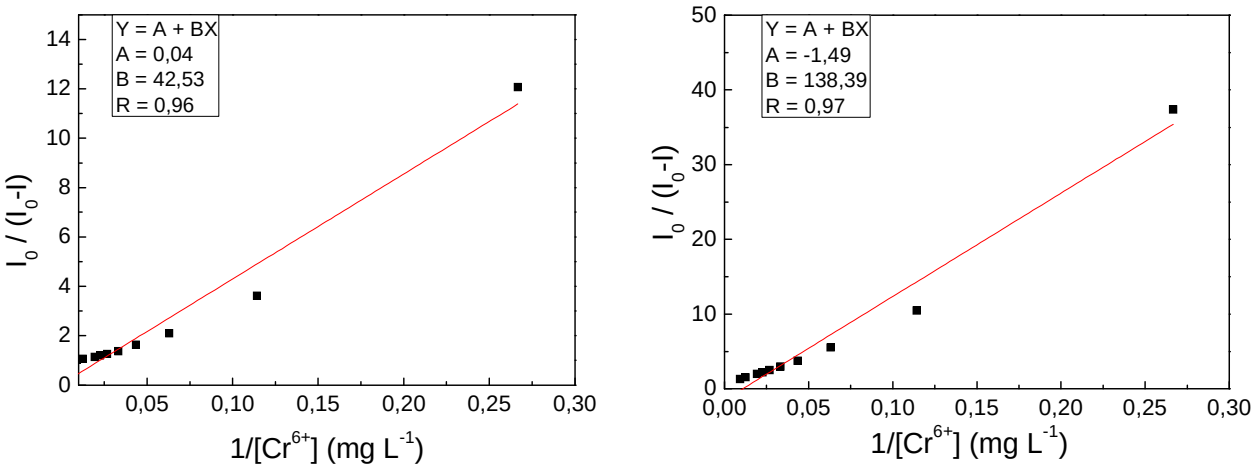



**Figura 75.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH CAPRP extraída em período de seca.




(a) (b)

**Figura 76.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH CAPRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.

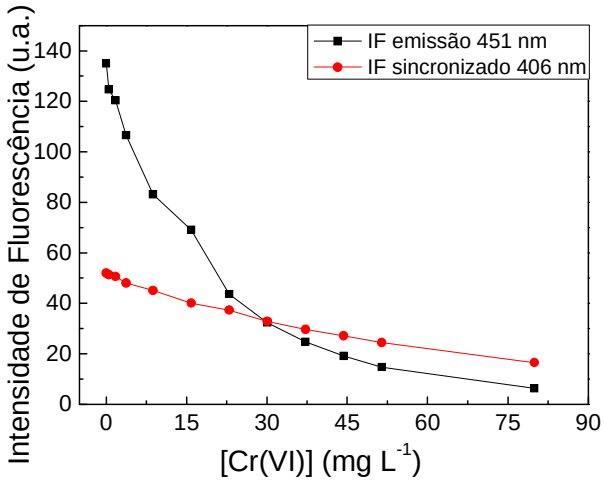
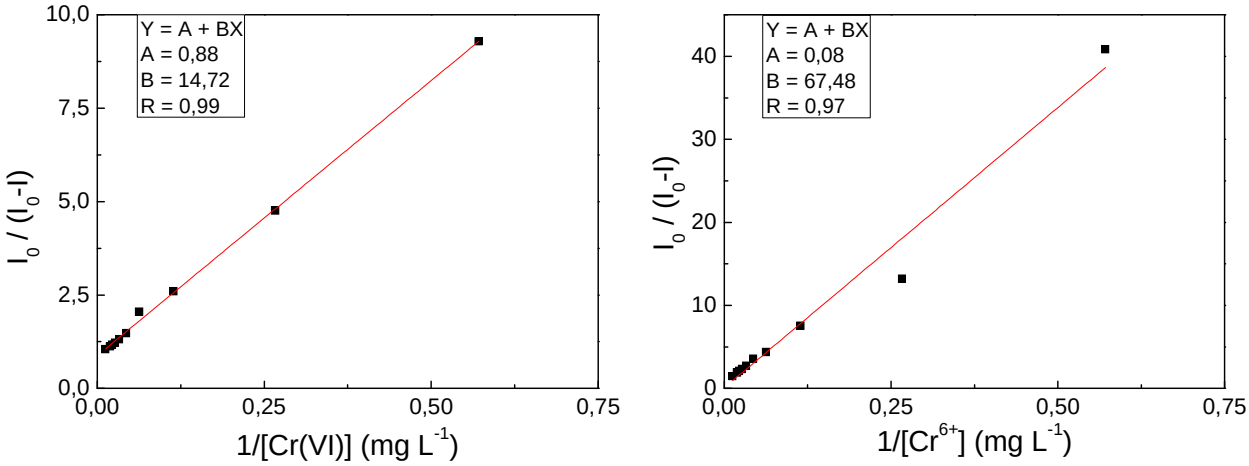



**Figura 77.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH NRP extraída em período de chuva.




(a) (b)

**Figura 78.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.

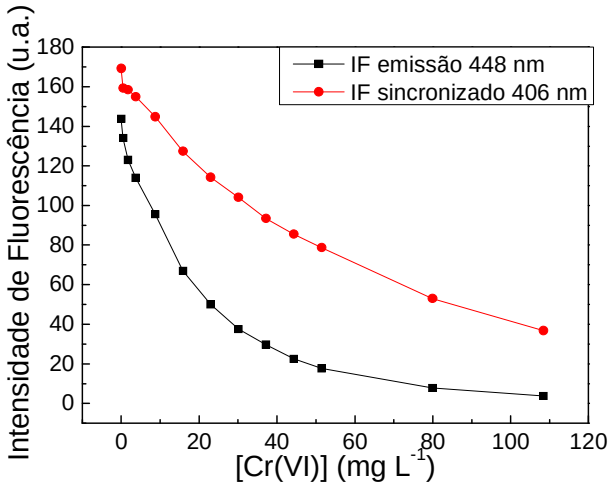
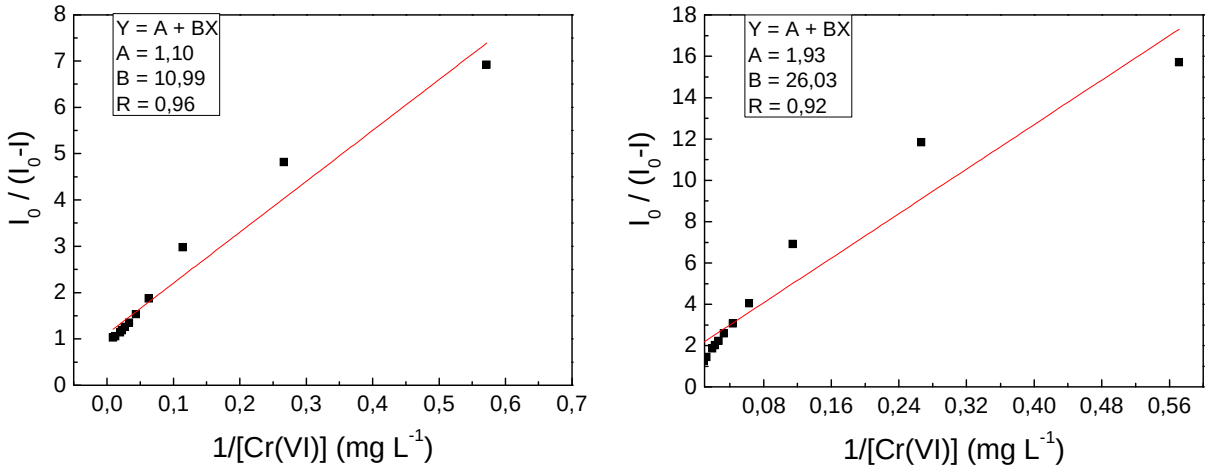



**Figura 79.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH NRP extraída em período de seca.




(a) (b)

**Figura 80.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH NRP-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.

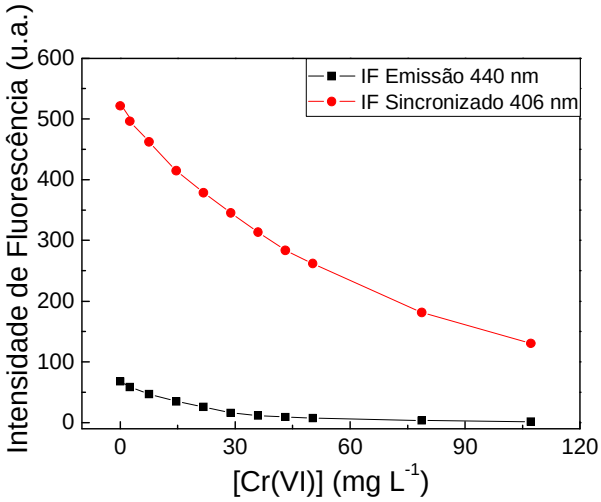
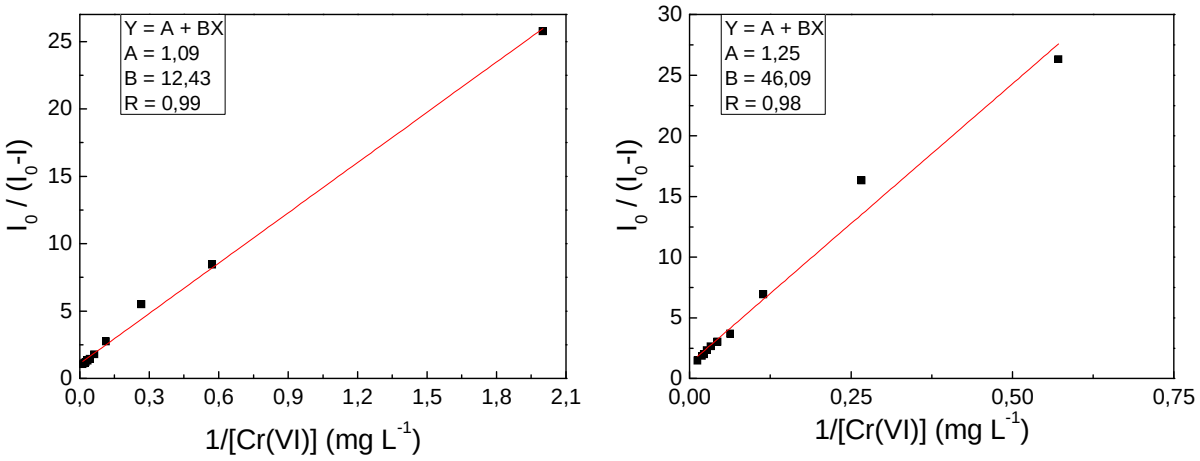



**Figura 81.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RGRANDE em período de chuva.




(a) (b)

**Figura 82.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.

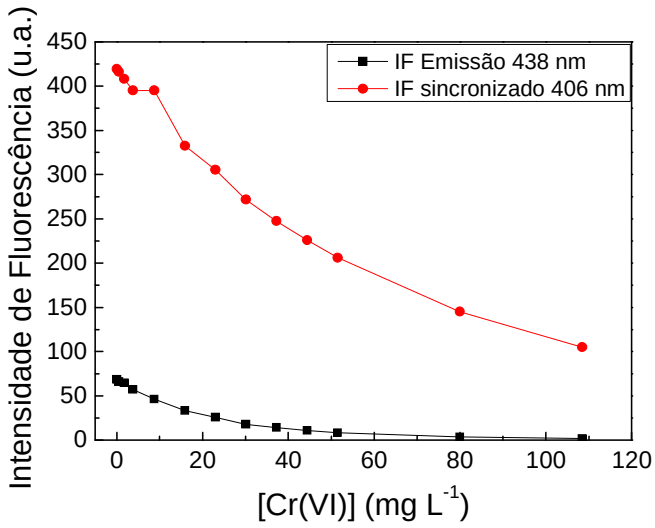
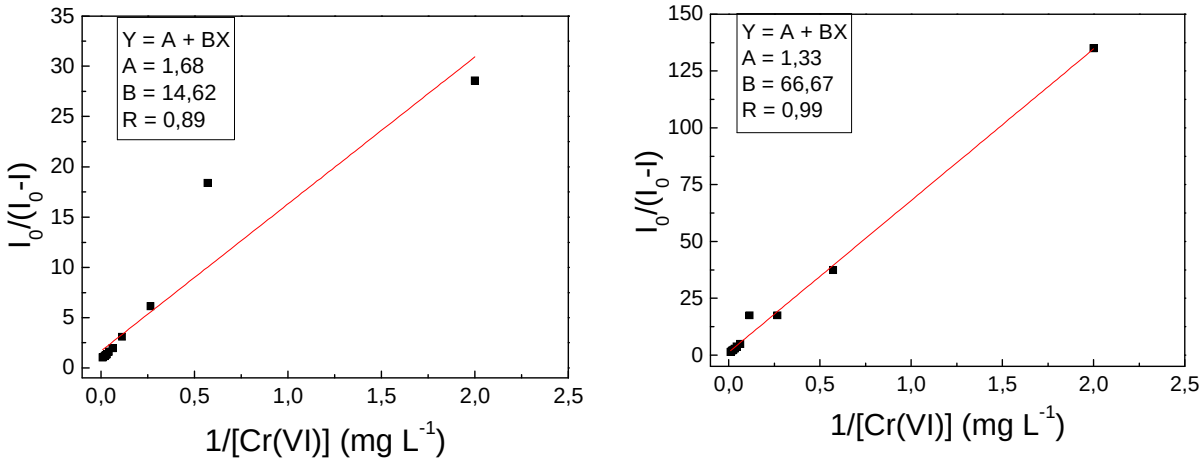



**Figura 83.** Curvas de supressão de fluorescência nas modalidades emissão e sincronizado para o complexo SH-Cr(VI) para a SH RGRANDE em período de seca.

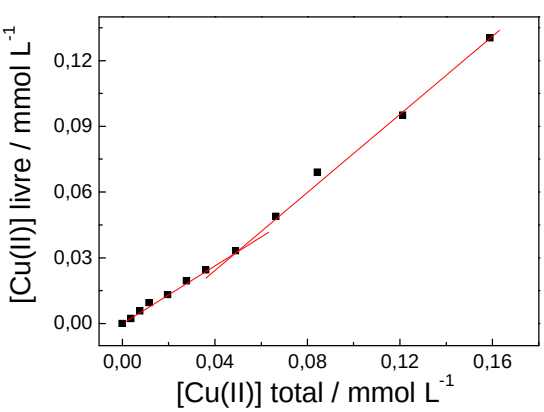



(a) (b)

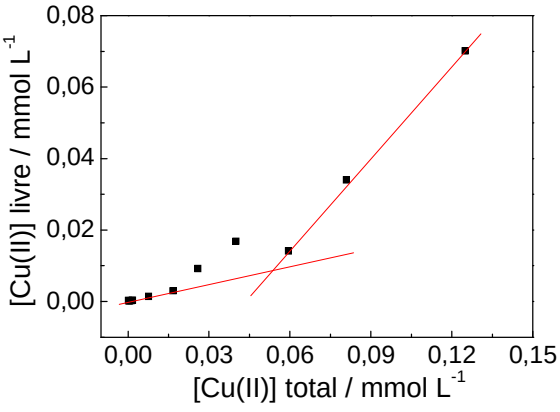
**Figura 84.** Curva de linearização da intensidade de fluorescência para o cálculo de $K_C$ utilizando o modelo Stern-Volmer (Lakowicz, 1999) para o complexo SH RGRANDE-Cr(VI) no modo a) emissão e b) sincronizado.

# ANEXO I

## Capacidade Complexante das SH com o Cu(II) por meio do SUFT

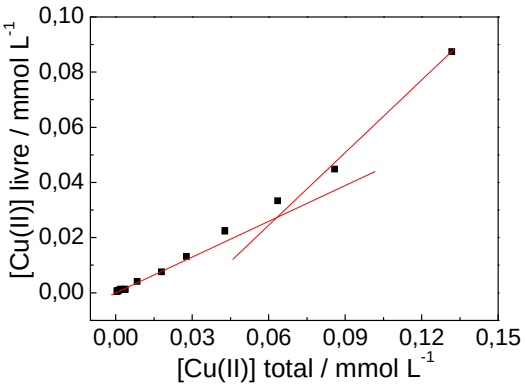



(a)

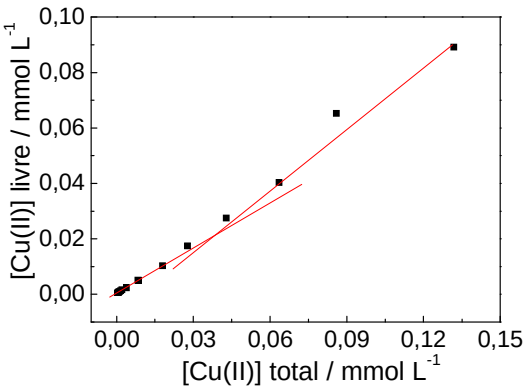



(b)

**Figura 85.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH CAPRP coletada a) período de chuva e b) período de seca.

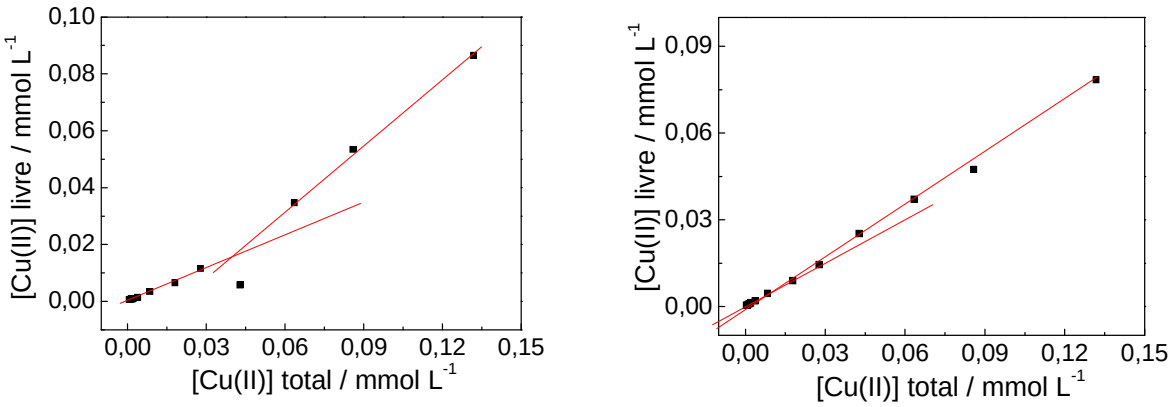



(a)




(b)

**Figura 86.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH RTURARG coletada a) período de chuva e b) período de seca.

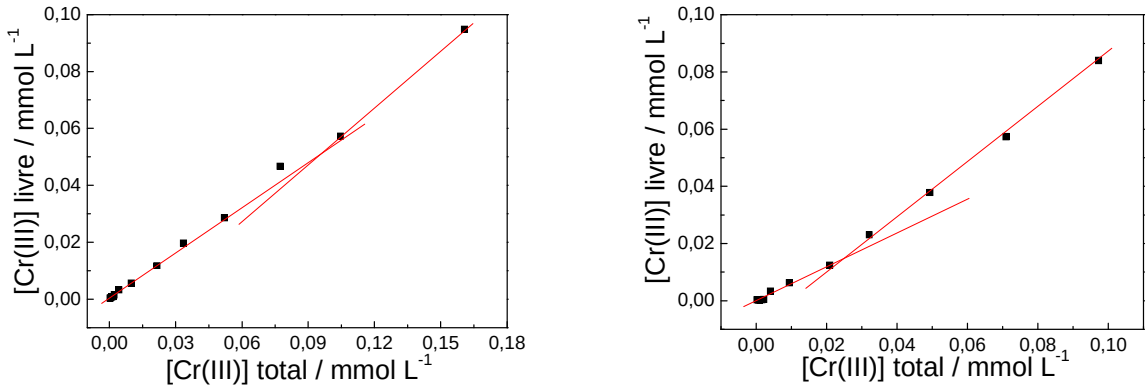



(a) (b)

**Figura 87.** Curva para determinar a capacidade de complexante da SH RGRANDE coletada a) período de chuva e b) período de seca.

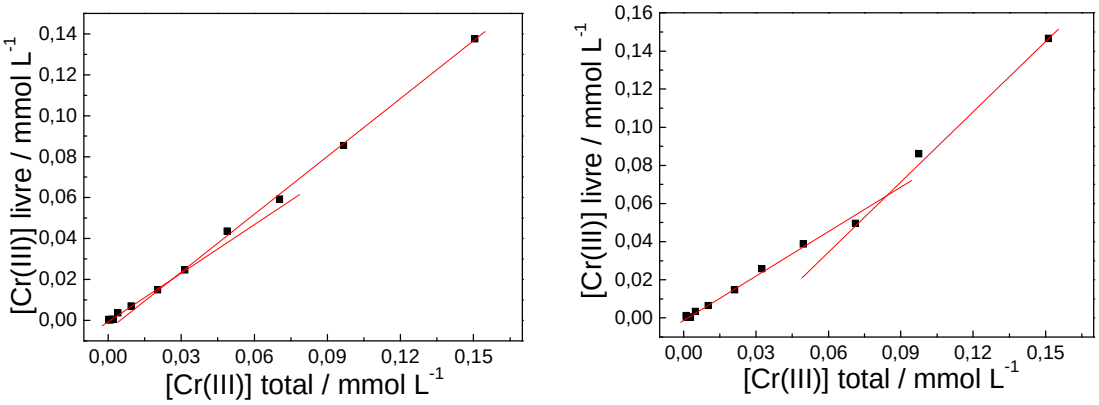
# ANEXO J

## Capacidade Complexante das SH com o Cr(III) por meio do SUFT



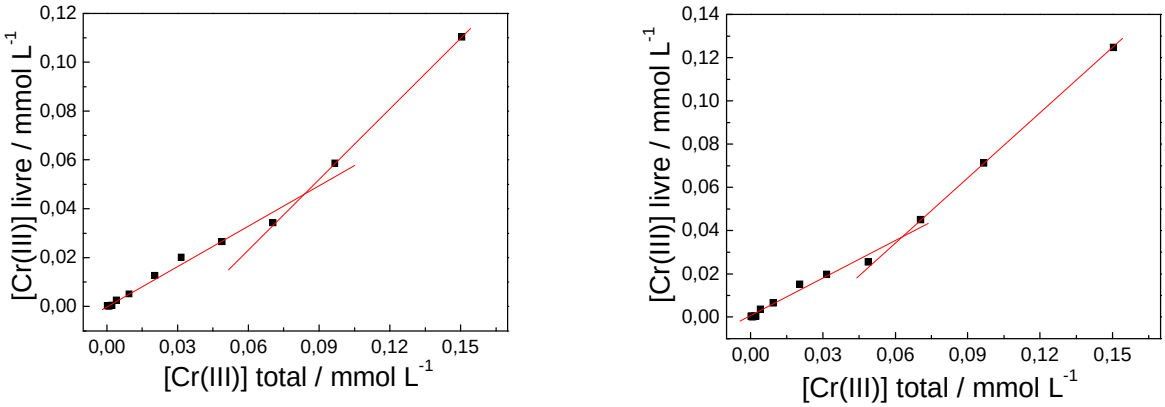

(a) (b)

**Figura 88.** Determinação da Capacidade Complexante da SH CAPRP coletada a) período de chuva e b) período de seca.




(a) (b)

**Figura 89.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RTRUARG coletada a) período de chuva e b) período de seca.

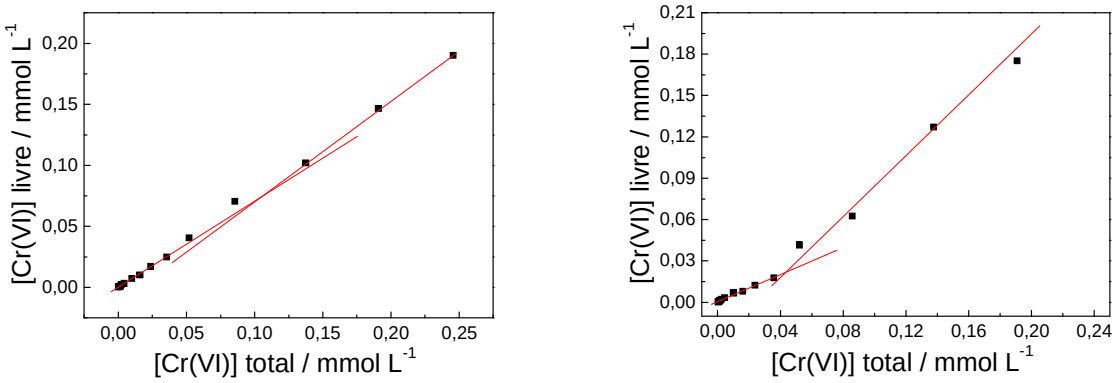



(a) (b)

**Figura 90.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RGRANDE coletada a) período de chuva e b) período de seca.

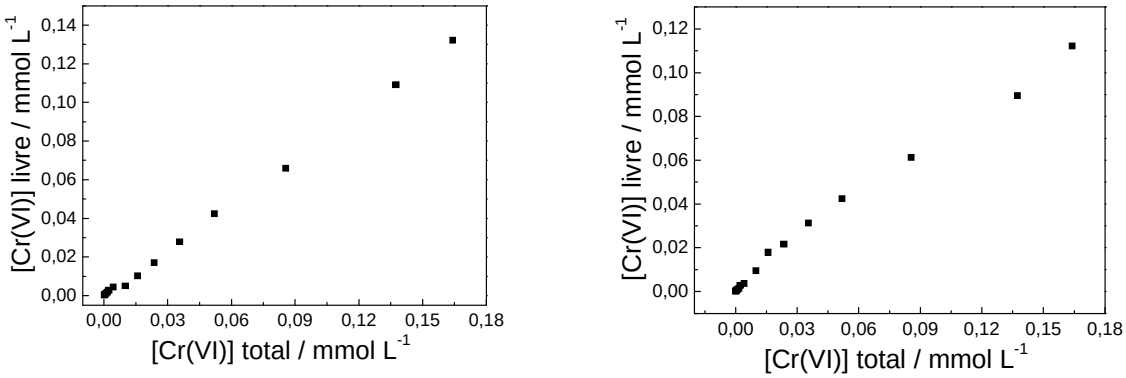
# ANEXO K

## Capacidade Complexante das SH com o Cr(VI) por meio do SUFT



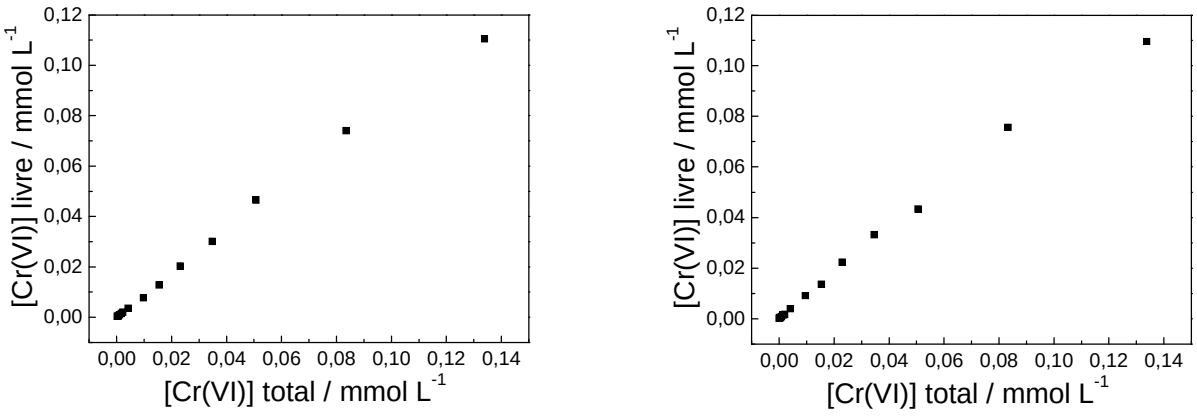

(a) (b)

**Figura 91.** Determinação da Capacidade Complexante da SH CAPRP coletada a) período de chuva e b) período de seca.




(a) (b)

**Figura 92.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RTRUARG coletada a) período de chuva e b) período de seca.




(a) (b)

**Figura 93.** Determinação da Capacidade Complexante da SH RGRANDE coletada a) período de chuva e b) período de seca.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, _____/_____/____

_____
Assinatura