

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HENRIQUE ALVES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO SAZONAL DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS  
AQUÁTICAS DO RIO NEGRO-AM

MANAUS

2015

HENRIQUE ALVES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO SAZONAL DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS  
AQUÁTICAS DO RIO NEGRO-AM

Dissertação apresentada à Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química Analítica, com ênfase em Química Ambiental.

Orientador: Dr. Ézio Sargentini Junior

MANAUS

2015

**“CARACTERIZAÇÃO SAZONAL DAS SUBSTÂNCIAS  
HÚMICAS AQUÁTICA DO RIO NEGRO-AM”**

Henrique Alves da Silva

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada em 06 de Abril de 2015

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Ézio Sargentini Júnior  
Universidade Federal do Amazonas  
Orientador



---

Prof. Dr. Luiz Fabricio Zara – Membro externo (UnB)



---

Prof.ª Dr.ª Tereza Cristina Souza de Oliveira – Membro (UFAM)  
Universidade Federal do Amazonas

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 06 de Abril de 2015.

Dedico ao meus pais e irmão, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida. Desejo poder ter sido merecedor do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **Dr. Ézio Sargentini Junior** por ter me recebido, orientado, pela grande amizade e por muitas vezes ter sido como um pai.

A **Me. Marcos Alexandre Bolson** pelas incontáveis ajudas, dedicação, amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao **Dr. Sergio Massayoshi Nunomura** por disponibilizar o RMN da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais CA-LTQPN, e pelas suas valiosas contribuições para interpretação dos resultados.

À **Ma. Sabrina Moraes** e ao **Me. Magno Muniz** pelas várias análises de RMN e tempo dedicado.

Ao **Dr. Jamal da Silva Chaar** e a **Ma. Relem Cativo** pelas análises de FT-IR.

Ao **Dr. Luiz Fabricio Zara** e suas alunas **Tania** e **Wilyane** pela grande ajuda com os tratamentos estatísticos e interpretação dos resultados.

Aos diversos amigos do **Laboratório de Química Analítica Ambiental**

Ao Grupo de Engenharia Ambiental do **Prof. Dr. André Henrique Rosa** em Sorocaba por terem me recebido tão bem tudo minha estadia, em especial a **Erik Sartori Jeunon Gontijo** pela amizade.

Aos meus amigos que sempre torcem para meu sucesso: **Sarah, Lorena, Débora, Jean, Marlon, Daniela, Carol** e **Bárbara**, muito obrigado pelo apoio e amizade.

E em especial à **Jucilene Lopes** por todo amor, carinho, compressão e amizade dedicados a mim nos momentos mais difíceis.

À **CAPES** pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
1      Introdução.....	12
2      Revisão bibliográfica.....	14
2.1    Substâncias Húmicas .....	14
2.2    Estrutura das Substâncias Húmicas .....	16
2.3    Substância Húmica Aquática.....	18
2.4    Composição Elementar das Substancias Húmicas .....	19
2.5    Espectroscopia no infravermelho .....	20
2.6    Espectroscopia de ressonância magnética nuclear .....	20
2.7    Interação do Metal com SHA .....	21
2.8    Estudo de Complexação .....	23
2.9    Sistema de Ultrafiltração .....	24
2.9.1    Cobre .....	25
2.9.2    Ferro .....	27
2.9.3    Alumínio.....	28
2.9.4    Zinco.....	29
3      Objetivos .....	30
3.1    Geral .....	30
3.2    Específico .....	30
4      Metodologia.....	31
4.1    Amostragem .....	31
4.2    Fluxograma da metodologia aplicada.....	31
4.3    Caracterização das amostras de água .....	32
4.4    Limpeza da resina XAD 8 .....	33
4.5    Extração das substâncias húmicas .....	33
4.6    Purificação dos extratos húmicos .....	33
4.7    Análise elementar .....	34
4.8    Teor de cinzas.....	34
4.9    Caracterização dos grupos ligantes das SHA .....	34
4.9.1    Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	34
4.9.2    RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ .....	34
4.9.3    Aromaticidade .....	35
4.10    Estudo de disponibilidade de metais das SHA utilizando sistema de ultrafiltração tangencial.....	35
4.10.1    Montagem do sistema de ultrafiltração tangencial.....	35

4.10.1.1	Teste dos diferentes Anéis de Vedação .....	37
4.10.2	Estudo de troca dos metais Fe, Zn e Al por íons de Cu <sup>2+</sup> .....	37
4.10.3	Trocas de metais originalmente complexados pela SHA para EDTA .....	38
5	Resultados e Discussão .....	40
5.1	Dados da amostragem .....	40
5.2	Extração, Teor de Cinzas e Razão H/C das SHA .....	41
5.3	Caracterização dos grupos ligantes das SHA .....	43
5.3.1	Análise espectroscópica no infravermelho com transformada de Fourier .....	43
5.3.2	Espectros de RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H .....	45
5.3.3	Aromaticidade E <sub>2</sub> /E <sub>3</sub> .....	51
5.4	Estudo de disponibilidade de metais das SHA .....	52
5.4.1	Sistema de Ultrafiltração Tangencial .....	52
5.4.2	Constantes de troca dos metais por íons de Cu .....	53
5.4.3	Troca de metais entre SHA e EDTA .....	56
6	Conclusão .....	59
7	Referências bibliográficas .....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas propostas para o processo de formação de SH. Adaptada de Stevenson, (1994). .....	15
Figura 2. Estrutura proposta para o ácido húmico por Schulten (1995).....	16
Figura 3. Diagrama representativo da estrutura em forma de “fita”, mostrando flexibilidade de macromolécula (SWIFT, 1989). ....	17
Figura 4. Diagrama representativo da estrutura da condensação da estrutura espiral ao acaso (SWIFT, 1989). ....	17
Figura 5. Esquema de complexação de metais pelo ácido húmico (adaptado de SANDRO, 1998).....	22
Figura 6. Esquema de complexos de esfera interna considerando forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (adaptado de SANDRO, 1998).....	22
Figura 7. Ponto de amostragem do rio Negro – AM (S 3°04’13.74” e W 60°08’26.92”). Fonte: INPE. ....	31
Figura 8. Fluxograma da metodologia aplicada. ....	32
Figura 9. Esquema do procedimento analítico utilizado para estudos de troca entre espécies metálicas originalmente complexadas por íons de Cu <sup>2+</sup> e EDTA. Adaptado de Burba et al., 2001. ....	36
Figura 10. Variação da cota do ano de 2012 em comparação com variação média entre os anos de 2002 a 2011. Fonte: Agência Nacional de Águas 2014.....	40
Figura 11. Espectros de FT-IR das amostras de SHA do rio Negro.....	43
Figura 12. Espectros Normalizados de FT-IR das amostras de SHA do rio Negro. ....	44
Figura 13. Análise de Cluster das transmitâncias dos períodos hidrológicos de enchente, cheia, vazante e seca. ....	45
Figura 14. Espectros RMN de <sup>13</sup> C (75,5 MHz, NaOD) das amostras de SHA do rio Negro. Os espectros foram calibrados usando a banda referente ao acril-éster dissolvido da resina XAD-8. ....	47
Figura 15. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz, D <sub>2</sub> O) das amostras de SHA do rio Negro. Os espectros foram calibrados usando a sinal de água como referência. ....	49
Figura 16. Comparativo da absorção e liberação de metais dos diferentes tipos de O-ring...52	
Figura 17. Adaptação do sistema de ultrafiltração. A) Selo de Nylon; B) Chapas de acrílico, parafusadas entre si, para manter o sistema fechado e pressionado. ....	53

Figura 18. Variação do $K_{troca}$ dos metais na SHA com adição de $Cu^{2+}$ . A, B e C mostram a variação de troca dos metais Fe, Al e Zn ao longo do período sazonal do rio Negro e D apresenta o comparativo entre os valores de $K_{troca}$ dos três metais .....	54
Figura 19. Comportamento cinético para a troca de metais entre as espécies SHA-metal para EDTA (1:1).....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da força iônica e pH na conformação dos ácidos húmicos e fúlvicos. (GHOSH; SCHNITZER, 1982; HAYES, 1985). .....	18
Tabela 2. Volumes das adições da solução de $\text{Cu}^{2+}$ ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizados nos experimentos de troca de metais originalmente complexados em 200 mL de SHA $100 \text{ mg L}^{-1}$ .....	38
Tabela 3. Dados físico-químicos das amostras de SHA do rio Negro. ....	40
Tabela 4. Teor de Cinzas das amostras de SHA nos diferentes períodos, análise elementar e razão H/C.....	42
Tabela 5. Teste Friedman para as transmitâncias enchente, cheia, vazante, seca. ....	44
Tabela 6. Atribuições dos picos para os espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ das amostras de SHA do rio Negro e as integrações de suas áreas (%). Deslocamentos químicos e suas atribuições foram adaptados de Rocha et al., (1999).....	48
Tabela 7. Atribuições dos picos para os espectros de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de SHA do rio Negro e as integrações de suas áreas (%). Deslocamentos químicos e suas atribuições foram adaptados de Rocha et al., (2000b).....	50
Tabela 8. Aromaticidade calculada através da equação de Peuravuori e Pihlaja (1997) para as amostras de SHA do rio Negro – AM. ....	52
Tabela 9. Constantes de troca entre íons $\text{Cu (II)}$ e as espécies metálicas das amostras de SHA. ....	55
Tabela 10. Valores de $k_1$ obtidos no estudo de troca de metais das amostras de SHA do rio Negro para EDTA.....	57

## RESUMO

Neste trabalho, foram caracterizadas amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA) do rio Negro coletadas nos meses de março, junho, setembro e dezembro de 2012. As caracterizações dos seus componentes químicos foram feitas utilizando das técnicas de Análise Elementar, RMN de  $C^{13}$  e  $^1H$ , FT-IR, UV-VIS e GFAAS. Foram realizados estudos de disponibilidade dos metais Cu, Fe, Al e Zn das diferentes amostras, utilizando a técnica de competição SHA-M/EDTA e estudos de troca de metais originalmente complexados por íons de  $Cu^{2+}$ , ambos utilizando o sistema de ultrafiltração tangencial. O período sazonal em estudo teve estações de cheia e seca mais acentuadas que a média dos dez anos anteriores. As análises estruturais das SHA, nos diferentes métodos, não sugerem uma variação estrutural significativa em todo o período estudado. Também não foram observadas variações significativas na disponibilidade e troca de metais por íons de cobre. Os resultados obtidos foram diferentes da literatura das SHA, que apontam haver diferença na sua estrutura em períodos diferentes.

Palavras chave: substâncias húmicas; disponibilidade de metais; rio Negro.

## ABSTRACT

In this work, Negro River's samples of aquatic humic substances collected in March, June, September and December of 2012, were characterized. The characterization of chemical components has been made through elementary analysis techniques,  $C^{13}$  and  $^1H$  NMR, FT-IR, UV-VIS and GFAAS. Studies of availability of metals Cu, Fe, Al and Zn of the different samples using the competition technique AHS-M/EDTA and metal exchange studies originally complexed by  $Cu^{2+}$ , both using tangential ultrafiltration system, were performed. The seasonal period under study has presented drought periods and full of the river more accentuated than the average of 10 years prior. The AHS structural analysis by the different methods do not suggest a significant structural variation throughout the study period. Significant variation in the metals availability and exchange by  $Cu^{2+}$  was also not noted. The results obtained were different from the AHS literature, which indicate there is a difference in the structure at different periods.

Keywords: humic substances; availability of metals; Negro river

## 1 INTRODUÇÃO

Substância húmica (SH) é o resultado de processos microbiológicos de decomposição da matéria orgânica, como resíduos de plantas e animais, formada por subestruturas de caráter alifático e aromático (STEVENSON, 1982). Sua estrutura é complexa e ainda não totalmente definida. As SH também estão presentes em meios aquáticos e são conhecidas como substâncias húmicas aquáticas (SHA). Sua origem pode ser alóctone, que são levados por pequenos cursos de água, águas subterrâneas, lixiviação e por erosão dos solos, sendo transportadas aos lagos, rios e oceanos, ou autóctone, que são derivadas dos constituintes celulares e da degradação de organismos aquáticos nativos (HAYES et al., 1989). A grande participação das substâncias húmica aquáticas nos processos de transporte, labilidade e complexação de espécies metálicas/pesticidas, justificam a importâncias do estudo de suas característica e comportamento no ambiente. (ROCHA; ROSA, 2003)

No estudo de suas características estruturais são empregados vários métodos químicos, físicos e espectroscópicos que são utilizados em estudos de macromoléculas e química orgânica. Contudo, há uma grande dificuldade na interpretação dos resultados, isto porque as SH têm natureza heterogênea e uma grande complexidade de reação inter e intramolecular (SWIFT, 1996).

A natureza das águas (rios, lagos ou mar) e a estação do ano determinam os diferentes processos de humificação de formação das substâncias húmicas aquáticas (THURMAN, 1985). Estudos da influência de fatores sazonais nos processos de formação das substâncias húmicas são de grande importância, sendo utilizados por exemplo em trabalhos do monitoramento ambiental que utilizam modelagem matemática, isso porque, as SH influenciam diretamente no comportamento de várias espécies presente no ambiente e são os principais complexantes orgânicos naturais (GOVEIA et al., 2011).

O rio Negro é um dos três maiores rios do mundo. Passa por seu leito mais água do que a que corre em todos os rios da Europa juntos. Um dos principais afluentes do Amazonas, responsável por 15% da água que ele despeja na Atlântico, o Negro drena uma área correspondente a 10% dos 7 milhões de quilômetros quadrados da Bacia Amazônica. O processo que dá origem à sua cor, alvo de especulações de cientistas por mais de 200 anos, só foi adequadamente explicado em 1980, quando o químico americano Jerry A. Leenheer realizou estudos em áreas de podzóis do rio Negro e conduziu experimentos em laboratório, foi definitivamente elucidada a origem das águas pretas. Desses estudos, concluiu-se que as águas pretas resultam de um processo de escoamento lateral de águas, que carrega grande

quantidade de ácidos orgânicos provenientes da decomposição de restos vegetais nos solos arenosos do médios e alto rio Negro. Estudos subsequentes confirmaram as ideias de Leenheer sobre a origem das águas pretas, relacionando a sua coloração às substâncias húmicas dissolvidas – substâncias orgânicas ácidas e coloridas, provenientes de decomposição. As substâncias húmicas representam aproximadamente metade da matéria orgânica solúvel das águas do rio Negro. A outra metade é constituída de ácidos orgânicos sem cor (ZEIDEMANN, 2001)

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Substâncias Húmicas

A primeira tentativa para isolar substâncias húmicas (SH) de solo foi de Franz Karl Achard em 1786, quando submeteu turfas a solventes alcalinos e obteve uma solução escura que precipitava por acidificação. O material precipitado, foi chamado de ácido húmico, e essa definição é usada até hoje. Em seu experimento, Achard também concluiu que a extração em turfas gerava uma grande quantidade desse material e que isso é devido ao seu alto estágio de decomposição (STEVENSON, 1982).

O termo “*húmus*” (do latim, equivalente ao solo) foi utilizado pela primeira vez por Nicolas Thédore de Saussure em seu trabalho intitulado de *Recherches chimiques sur la végétation*, (DE SAUSSURE, 1958) usando esse termo para descrever o material de cor escura que é originado do solo e que tem origem na decomposição vegetais, sendo pobre em oxigênio e hidrogênio, mas rico em carbono (STEVENSON, 1982).

Sua estrutura, até os dias de hoje, ainda não foi totalmente compreendida devido alta complexidade. Vários autores se propuseram a estudar suas vias de formação de estrutura química. Dentre esse autores destacam-se Kononova (1966), Schnitzer e Khan (1989), e Stevenson (1982, 1994). A Figura 1 mostra as principais rotas do processo de formação das SH.

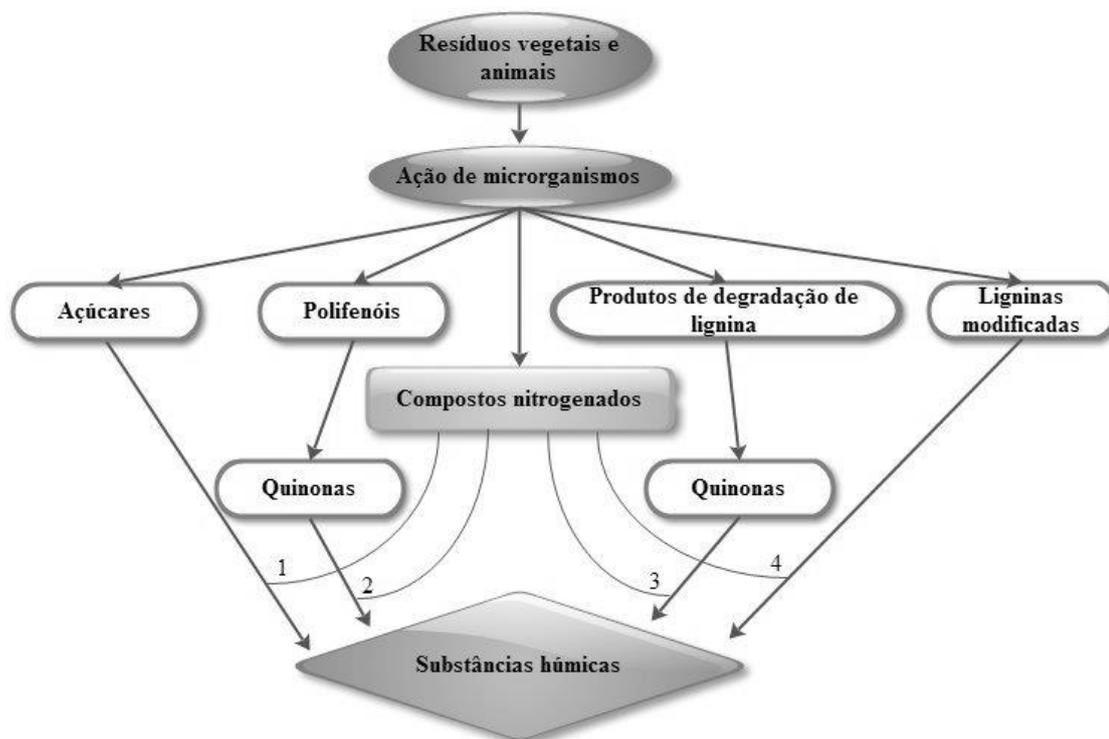


Figura 1. Rotas propostas para o processo de formação de SH. Adaptada de Stevenson, (1994).

Na rota de formação 1 propõe-se que a formação das SH tem origem no processo de condensação entre açúcares e aminoácidos através da polimerização, não havendo participação de enzimas, sendo esses dois originários da atividade microbiana. As rotas 2 e 3 mostram a teoria clássica da formação do húmus, que envolve quinonas no processo de formação. A rota 4 sugere que as SH são derivadas de ligninas modificadas (ROCHA; ROSA, 2000).

Segundo Cardoso, et al, (1992), em solos de áreas hidromórficas e aonde a drenagem não é suficiente, a rota da lignina é predominante. Já em alguns solos sobre florestas, a síntese das SH a partir de polifenóis é de grande importância. Em meios que apresentam baixa atividade biológica, a rota através da condensação de aminoaçúcares tem maior importância, já que assimilação biológica dos açúcares é mais rápida.

A via de condensação polimérica de polifenóis e quinonas tem sido a mais utilizada pelos pesquisadores da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas Aquáticas (STEVENSON, 1994)

## 2.2 Estrutura das Substâncias Húmicas

Pouco se conhece sobre a estrutura química das SH em razão da sua natureza heterogênea e complexa, ainda que haja grandes esforços de pesquisadores da área (POPPI; TALAMONI, 1992). As SH podem ser também fracionadas, por sua vez, em ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF). Os AH são definidos como a fração insolúvel em condições ácidas ( $\text{pH} < 2$ ), mas solúveis a valores de  $\text{pH}$  maiores, enquanto os AF representam a fração solúvel para todos os valores de  $\text{pH}$  (HAYES, 1985).

Schnitzer e Khan (1972) concluíram que a AF consiste em grupos fenólicos ligados a grupos ácidos benzeno carboxílicos por pontes de hidrogênio, formando uma estrutura polimérica com alta estabilidade. Já o AH apresenta modelo estrutural mais recente (Figura 2), proposto por Schulten (1995) sendo determinado pelos de estudos de pirólise, espectroscopia, degradação oxidativa e microscopia eletrônica. De acordo com Rice e Lin (1993), é possível descrever a natureza das substâncias húmicas usando o conceito de geometria fractal, ou seja, representação geométrica para sistemas altamente desordenados.

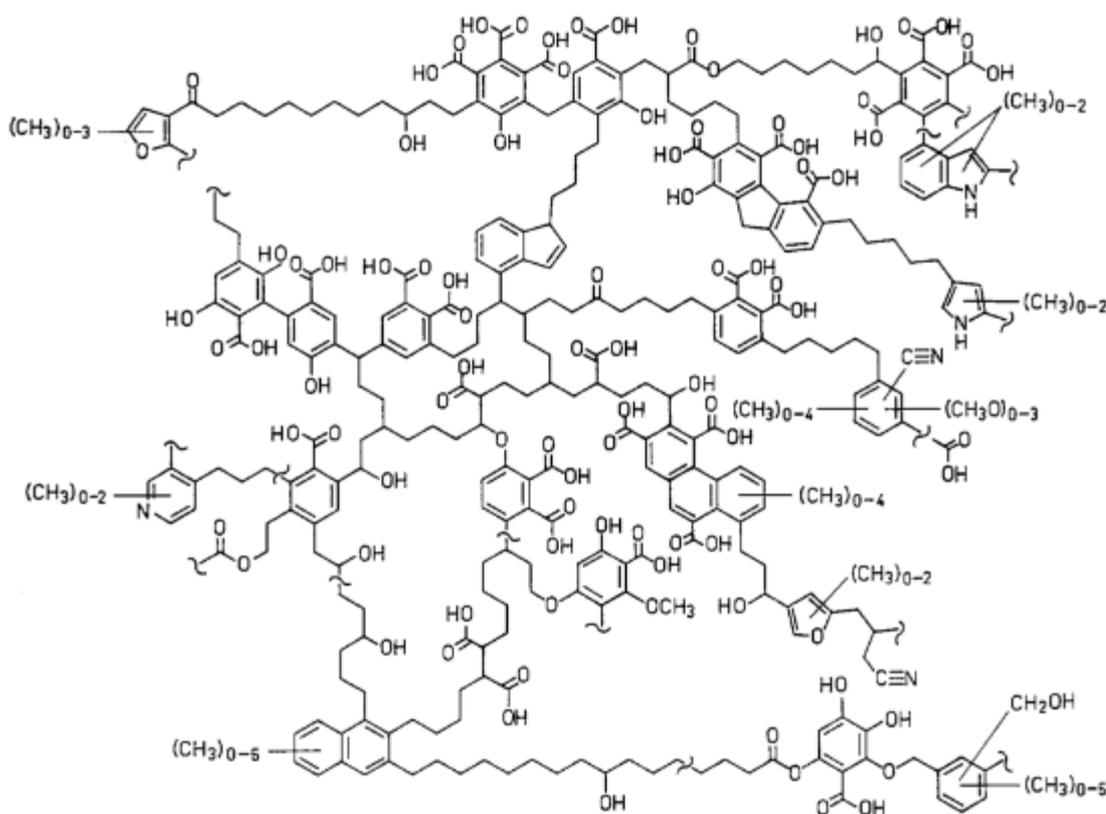


Figura 2. Estrutura proposta para o ácido húmico por Schulten (1995).

Segundo Hayes (1985) a macromolécula de substância húmica pode ser apresentada como uma fita (Figura 3), que em sua extensão apresentam cargas negativas e positivas. Sua estrutura é flexível, resultando em uma conformação próxima de uma esfera, apresentando em seu centro a maior densidade e menor densidade em seus limites (SWIFT, 1989)

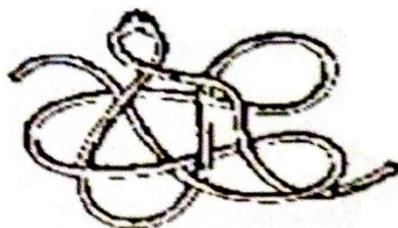


Figura 3. Diagrama representativo da estrutura em forma de “fita”, mostrando flexibilidade de macromolécula (SWIFT, 1989).

A Figura 4 mostra uma possível conformação espiral ao acaso em forma esférica da estrutura macromolecular da SH. Esse modelo pode ajudar a explicar ligações intermoleculares, cruzadas e irregularidades da estrutura química.

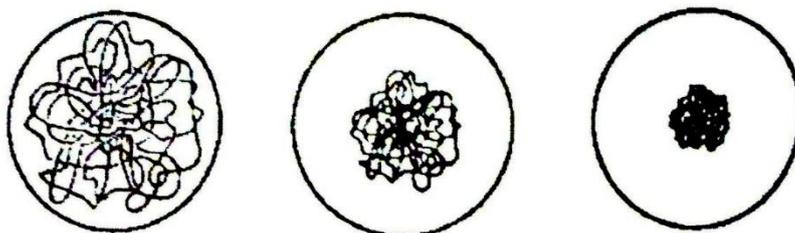


Figura 4. Diagrama representativo da estrutura da condensação da estrutura espiral ao acaso (SWIFT, 1989).

O tamanho da esfera dependerá de vários fatores, como por exemplo a extensão da “fita”, extensões das ramificações, da solvatação, concentrações de sais na solução, densidade de carga, ligações cruzas e ionização dos grupos ácidos (GHOSH; SCHNITZER, 1982; HAYES, 1985).

Ghosh e Schnitzer (1982) estudaram os efeitos provocados pelo pH e a força iônica na conformação das macromoléculas de ácido húmico e fúlvico, através de estudos de pressão de superfície e viscosimetria. As influências dessas duas variáveis na estrutura dos AH e AF são mostrados da Tabela 1.

Tabela 1. Efeito da força iônica e pH na conformação dos ácidos húmicos e fúlvicos. (GHOSH; SCHNITZER, 1982; HAYES, 1985).

Ácidos		Conc. do eletrólito (mol L <sup>-1</sup> )				pH		
		0,001	0,005	0,010	0,050	2,0	3,5	6,5
Fúlvico	Baixa							
	Alta							
Húmico	Baixa							
	Alta							

A tabela mostra grande influência que o pH e a força iônica têm sobre a estrutura das macromoléculas dos ácidos húmico e fúlvico. Essa variação da conformação estrutural implica diferentes interações entre a matriz húmica e cátion metálicos.

### 2.3 Substância Húmica Aquática

Em geral, as substâncias húmicas aquáticas (SHA) podem ser consideradas como misturas polidispersas e heterogênea, constituídas de moléculas orgânicas refratárias, sendo o resultado da degradação e condensação biológica e química da matéria orgânica, mesmo que tenham origens e métodos de extração diferentes, podendo ter uma variabilidade da sua estrutura e composição (ABBT-BRAUN; LANKES; FRIMMEL, 2004). Os sistemas aquáticos ricos em matéria orgânica dissolvida (MOD), como águas superficiais e subterrâneas, apresentam como característica cor marrom-amarelada. Essa cor é atribuída à presença das substâncias húmicas aquáticas sendo o principal constituinte do carbono orgânico dissolvido nessas águas (DITTMAR; KOCH, 2006; MOPPER et al., 1991).

As SHA foram definidas por Thurman e Malcolm (1981) como a parte amorfa e não específica, retirada da matéria orgânica dissolvida em pH 2,0, sendo está adsorvida em coluna de resina XAD-8 apresentando altos valores de coeficientes de distribuição.

As diferentes nomenclaturas para as frações de SH (AH, AF) também são aceitas para as SHA pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), mesmo essa sendo baseada na química do solo.

## **2.4 Composição Elementar das Substancias Húmicas**

A composição elementar de uma substância química é sua principal característica. O primeiro passo para a obtenção da fórmula molecular e estrutural de uma substancia está na determinação de sua composição elementar. No entanto, quando se trata de matérias que não possuem uma estequiometria definida, como por exemplo o carvão, querogênio e substancias húmicas, os mesmos conceitos não podem ser utilizados e uma única fórmula estrutural não existe para esse materias (RICE; MACCARTHY, 1991).

A análise elementar também pode ser empregada para fazer a identificação de possíveis alterações na composição químicas das SH extraídas do solos ante aos diferentes manejos, tratamentos e adição de lodo do esgoto tratado (NARIMOTO, 2006; SANTOS, 2006; SENESI et al., 1989). Valores elevados da razão atômica H/C sugerem estruturas mais alifáticas, enquanto que valores baixos podem ser devidos a estruturas mais aromáticas.

No processo decomposição da matéria orgânica, parte do carbono é liberada na forma  $\text{CO}_2$ , sendo esse processo acompanhado pela conversão de C e N em tecido microbiano. O teor de nitrogênios dos resíduos da decomposição de orgânicos, refletidos pela razão C/N, são utilizados para mensurar a magnitude dos processos de mineração e imobilização, sendo esses opostos entre si. Quando a razão C/N valores acima de 30 significa dizer que há baixas reservas de N mineral, e isso pode ser atribuído aos processos de imobilização por microrganismos. A razões de C/N menos que e 20 apontam haver um aumento no teor de N mineral, sugerindo por tanto predominância do processo de mineralização (STEVENSON, 1982).

O grau de incorporação do nitrogênio, que indica o estado de humificação nas diferentes estruturas húmicas, podem ser calculados através da razão C/N, obtidos pelos valores de composição elementar. Também utiliza-se esses valores para determinar a taxa de degradação de resíduos orgânicos no solo e compostos orgânicos originários de resíduos vegetais (SILVA et al., 2004).

A análise de composição elementar é empregada para terminar porcentual elementar de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre de compostos orgânicos e organometálicos,

através de cromatografia gasosa. Na maioria das vezes, amostras de 1,0 mg são pesadas em recipientes de estanho, onde são introduzidas em um tubo vertical feito de quartzo, ficando mantidas a temperatura de 1.030 °C, com constante fluxo de gás hélio. A combustão das amostras acontece quando a amostra chega ao tubo de quartzo e o gás hélio é enriquecido temporariamente por oxigênio, ocorrendo a rápida combustão da amostra. Os gases obtidos passam sobre  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , com o intuito de que a combustão tornasse quantitativa e sobre cobre, tudo isso à 650 °C, para que possa ser removido o excesso de oxigênio e provocar a redução dos óxidos de nitrogênio para  $\text{N}_2$ . Após essas etapas, a mistura gasosa passa através de uma coluna cromatográfica mantida aproximadamente a 100 °C. As várias substâncias formadas ( $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) são separadas e eluídas até chegar o detector de condutividade térmica (FAUSTINO, 2007; STEVENSON, 1982).

## **2.5 Espectroscopia no infravermelho**

Os espectros de infravermelho são utilizados para caracterizar diferentes ligações químicas entre átomos, através de deformações vibracionais e rotacionais, que absorvem energia em específicas frequências de ressonância, de acordo com as características químicas dos átomos envolvidos.

No estudo de substâncias húmicas essa técnica é utilizada para observar o arranjo estrutural, natureza, reatividade dos diferentes grupos funcionais que contêm oxigênio, a presença de proteínas e carboidratos, além do grau de pureza da amostra em relação a contaminantes inorgânicos, como por exemplo a presença de metais, sais e argilas (STEVENSON, 1982). Os espectros de SHA apresentam pequenas diferenças quando comparados aos espectros de SH e AH, entretanto sua feição geral é bastante parecida.

## **2.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear**

O princípio das diferentes técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) baseiam-se na emissão de ondas radiofrequentes (MHz), e absorção dessas ondas por átomos que tenham spin nuclear ( $I$ ) diferente de zero, estando todos sobre o efeito de campo magnético. Seu conceito aparenta ser simples, porém principalmente em análises de

experimentos multidimensionais, essa técnica pode ser bastante complexa. O uso dessa técnica nos estudos com substâncias húmicas, principalmente estão voltados a quantificação e identificação dos seus diferentes grupos funcionais. Essa técnica tem sido aplicada com sucesso em avaliações qualitativas da MO em sistemas de manejo de solos diferentes (ABREU JR. et al., 2009).

Por causa de variabilidade de seus métodos analíticos, a técnica de RMN é utilizada em vários outros campos de pesquisa além da química, mostrando-se capaz de resolver várias questões químicas da matéria, tornando-se uma das técnicas mais importantes para os químicos (NOVOTNY, 2004).

Os ácidos húmicos isolados de solos tropicais com predominância de minerais de argila tem considerável teor de Fe, um metal paramagnético, e isso pode ocasionar o alargamento dos sinais, alteração no tempo de relaxação e conseqüentemente na intensidade relativa dos sinais. Esse problema pode ainda ser agravado pelo fato de que para isolar ácidos húmicos de amostras de solo é necessário a utilização de ácidos que podem resultar na degradação de minerais de Fe, aumentando ainda mais sua concentração na amostra de ácido húmico (CANELLAS; SANTOS, 2005).

Na análise dos espectros de RMN de  $C^{13}$  das SH, as faixas de deslocamentos químico e suas atribuições não são bem conhecida. Não existe da literatura de húmicos um consenso quanto a escolha das faixas de deslocamentos químicos observas suas atribuições (ESTEVES; OTERO; DUARTE, 2009; FUKUSHIMA et al., 1995; OLIVEIRA, 2007; ROCHA et al., 2000a; YAMAMOTO et al., 2010), essa falta de consenso prejudica a comparação dos diferentes resultados.

## **2.7 Interação do Metal com SHA**

Os ácidos húmicos apresentação excelente capacidade de complexação por metais. A principal explicação para esse fato é o alto teor de oxigênio presente em sua estrutura na forma de grupos fenólicos e carboxílicos (BURBA; ROCHA; KLOCKOW, 1994; BURBA; ROCHA; SCHULTE, 1993). A presença de desses grupos químicos no AH faz com o que ocorram a formação de ligações químicas simples e polidentadas com as espécies metálicas em solução (Figura 5) (SOARES-PRADO, 1998).

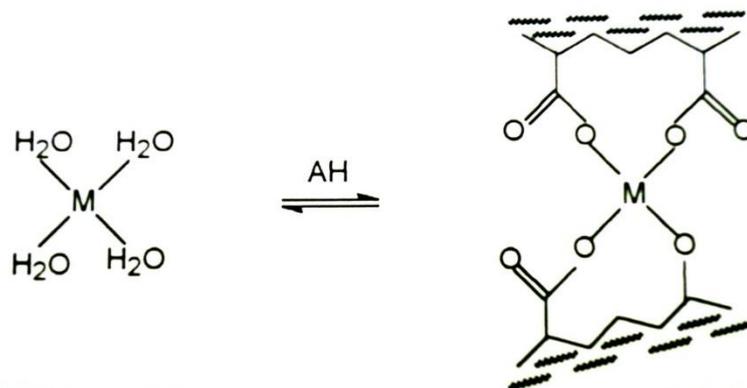


Figura 5. Esquema de complexação de metais pelo ácido húmico (adaptado de SANDRO, 1998).

Metais complexados pelo ácido húmico, podem não estar somente em sua forma dissociada, sendo possivelmente adsorvidos em complexos de esferas internas na região das macromoléculas através das forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio como mostrado na Figura 6 (BURBA; WILLMER, 1992; SENESI; SPOSITO; MARTIN, 1986).

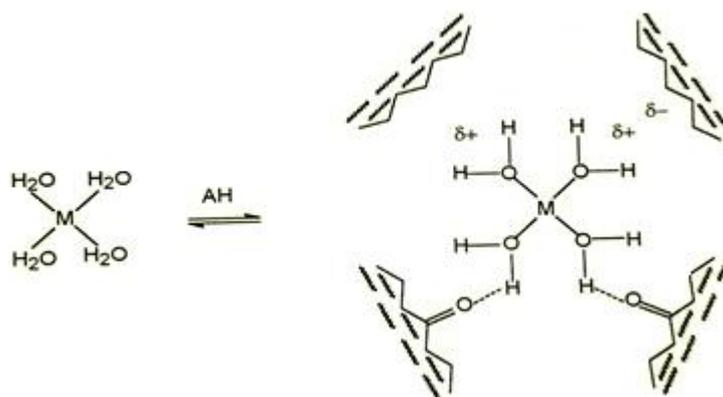


Figura 6. Esquema de complexos de esfera interna considerando forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio (adaptado de SANDRO, 1998).

Para conhecer o efeito tóxico de um metal no ambiente aquático, é preciso primeiro entender e caracterizar as diferentes espécies químicas do metal. Assim que uma espécie metálica chega no ambiente aquático, poderão ocorrer uma série de situações que afetarão o transporte e o destino do metal. Alguns exemplos dessas situações são os processos de oxidação e redução, precipitação e dissolução, absorção e dessorção, e a complexação (STUMM; MORGAN, 1995). O conhecimento desses processos e a biodisponibilidade de metais são de grande importância, uma vez que por exemplo, nos Estados Unidos, o padrão de qualidade da água baseia-se na fração solúvel dos metais, embora já se saiba que a

toxicidade e a biodisponibilidade deles são diretamente associados a presença de substâncias complexantes e quelantes (ALLEN; HANSEN, 1996). Portanto para conhecer os efeitos de toxicidade dos metais é de grande importância contar com metodologias que auxiliem no estudo desses diferentes processos.

A complexação de metais pesados também facilita o sequestro destes pelas plantas por vários mecanismos (metais essenciais), previne a precipitação e acumulação desses íons no corpo sedimentado e influencia na eficiência da remoção de metais pesados no tratamento de água.

## **2.8 Estudo de Complexação**

Quando um metal chega no ambiente aquático natural, como por exemplo através da ação do homem, sua toxicidade é reduzida. Essa redução é devido à presença de ligantes metálicos no meio. A capacidade de complexão desse ligantes é muitas vezes referida como sendo a capacidade de complexação da água. A fração da matéria orgânica dissolvida, com massa molar de 1 kDa à 10 kDa tem maior afinidade pelos compostos orgânicos e espécies metálicas (BURBA; ROCHA; KLOCKOW, 1994).

As substâncias húmicas aquáticas têm grande influência na complexação de metais nos ambientes aquáticos, causada por suas propriedades polieletrólíticas (ROCHA et al., 2000b). Uma grande quantidade de fatores afetam a estabilidade dos complexos SHA-Metal formados, alguns exemplos desses fatores são: pH do meio aquático, concentração, características estruturais das SHA, concentração do íon metálico, quantidade de átomos envolvidos na ligação, tempo de complexação e muitos outros (ARAÚJO; ROSA; ROCHA, 2002; ROCHA et al., 2003).

No estudo de complexação de metais pelas SHA, são utilizados diversos tipos de cálculos e modelos de complexação. Esses estudos de complexação de espécies metálicas pelas SHA são possíveis através da adição de complexantes específicos, como por exemplo o DTAP, EDTA e Cu, e a utilização de novas metodologias, visto que esses métodos de análise têm como princípio o estudo da alteração do equilíbrio químico entre a SHA e as espécies metálicas originalmente complexadas. As interações entre a matéria orgânica aquática e os metais, podem ser caracterizadas através do estudo das constantes de estabilidade das espécies metálicas com as frações húmicas de diferentes tamanhos (VAN DEN BERGH; JAKUBOWSKI; BURBA, 2001).

As substâncias húmicas formam misturas altamente complexas com íons metálicos, devido a sua característica polifuncional, e esses complexos macromoleculares formados são dificilmente caracterizados por simples constantes de estabilidade termodinâmicas (BUFFLE, 1989).

Preferivelmente, para fazer a caracterização dos complexos de SH-metal em soluções com constantes de estabilidade termodinâmica condicionais, considera-se os ligantes SH-metal segundo o modelo de distribuição contínua (DE WIT et al., 1990) ou o modelo de ligante discreto (MARINSKY; EPHRAIM, 1986). Estes modelos oferecem uma caracterização termodinâmica bastante confiável para os complexos de SH-metal formados através de solução de SH isoladas (MARINSKY; EPHRAIM, 1986).

Através de alguns estudos de hidrocolóides ricos em orgânicos (BUFFLE; LEPPARD, 1995) pode se concluir que a estabilidade global das espécies reais de SH-metal, em água naturais, está intrinsecamente ligado a fatores termodinâmicos e cinéticos sobrepostos por um complicado processo de transformação. Nesse caso, a chamada disponibilidade de espécies SH-metal pode ser considerada como um parâmetro substituto mais apropriado para sua caracterização (VAN DEN BERGH; JAKUBOWSKI; BURBA, 2001).

Segundo Buffle e Leppad (1989) as espécies aquáticas de SH-metal e sua estabilidade condicional e disponibilidade, respetivamente, podem ser avaliadas por algumas ferramentas analíticas combinado métodos eficientes de diferenciação (ex. troca iônica, sorção, ultrafiltração) e métodos de determinação (ex. espectroscopia atômica).

No experimento de troca de espécies SH-metal com EDTA com o tempo controlado, sob condições padronizadas, utiliza a ultrafiltração tangencial de fluxo rápido para fazer a diferenciação analítica dos complexos EDTA-metal formados, sendo essa a base desse procedimento. A cinética e o rendimento de EDTA-troca são utilizados para fazer a caracterização operacional da estabilidade cinética e da disponibilidade das espécies SH-metal (VAN DEN BERGH; JAKUBOWSKI; BURBA, 2001).

## **2.9 Sistema de Ultrafiltração**

Uma das metodologias mais citadas na literatura para extração e concentração da matéria orgânicas dissolvida é o sistema de ultrafiltração (AIKEN et al., 1985). Geralmente, também utiliza-se esse método para dividir a matéria orgânica em diferentes tamanhos

moleculares, através de membranas de filtração com porosidade variadas (ASTER; BURBA; BROEKAERT, 1996; BURBA; SHKINEV; SPIVAKOV, 1995; ROCHA et al., 1999, 2000b). Esse apresenta grandes vantagens, não sendo destrutivo e não precisar da adição de reagentes, assim, diminuindo possíveis alterações na amostra (KILDUFF; WEBER JR., 1992).

O sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial de estagio simples (UF-FT) foi desenvolvido por Burba et al. (2001), sendo esse sistema capaz de determinar a concentração de metais livres. Esse método quando comparado ao sistema de ultrafiltração convencional apresenta alguns benefícios como diminuição dos efeitos de entupimento e/ou polarização das membranas, e a possibilidade de trabalhar com sistemas abertos, redução do volume filtrado e tempo de filtração, diminuindo os efeitos de deslocamentos no equilíbrio da solução e maior agilidade na filtração (ROCHA; ROSA, 2003).

Informações cinéticas e termodinâmicas fornecidas são fornecidas através do sistema de ultrafiltração tangencial, que podem ser utilizadas para caracterizar, através de reações de troca de ligante/ou de metal, as espécies metálicas ligadas na matéria orgânica (BURBA; VAN DEN BERGH; KLOCKOW, 2001).

### **2.9.1 Cobre**

Em processo metabólicos e em baixas concentrações o cobre é essencial, pois nos processos síntese de tecido conjuntivo, neurotransmissão, metabolismo celular do ferro na defesa de radicais livre, atua com cofator enzimático (SORENSEN, 1991). Porém em altas concentrações ele pode ser tóxico para várias espécies aquáticas (MATSUO; WOOD; VAL, 2005; MCGEER et al., 2000). Existem várias formas tóxicas do cobre, como por exemplo o  $\text{CuOH}^+$ ,  $\text{CuCO}_3\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ , e na forma monovalente de  $\text{Cu}^+$ , que pode ser transportada por membranas biológicas (PAQUIN et al., 2000).

Segundo vários estudos, nos peixes de água doce, exposição ao cobre pode causar várias alterações na regulação iônica (LAURÉN; MCDONALD, 1985; MATSUO; WOOD; VAL, 2005). A inibição das enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, presente nas brânquias do peixes, pode ser associada toxicidade de cobre, causando uma diminuição do influxo de sódio na membrana apical dos peixes (GROSELL; WOOD, 2002; WOOD, 1992). A presença de cobre em elevadas concentrações pode ainda afetar o transporte paracelular, visto que o cobre compete com íon  $\text{Ca}^{2+}$  nas junções paracelulares, afetando assim permeabilidade da membrana branquial, e consequentemente causado o aumento do efluxo de íons (LAURÉN;

MCDONALD, 1985; MCGEER et al., 2000). Quando concentração crítica do metal nas brânquias é atingida, devido ao seu acúmulo, ocorre a intoxicação (DI TORO et al., 2000, 2001; PAQUIN et al., 2000) e conseqüentemente leva à morte dos peixes, muito provavelmente causa pela grande perda de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (LAURÉN; MCDONALD, 1985; MATSUO; WOOD; VAL, 2005; WOOD, 1992).

A biodisponibilidade de metais está relacionada intrinsecamente a sua toxicidade. Essa biodisponibilidade de cobre está correlacionada, nós ambientes aquáticos, a diversas condições ambientais, como por exemplo ao teor de carbono orgânico dissolvido (DOC), concentração de cálcio e pH (DE SCHAMPHELAERE; JANSSEN, 2004; DI TORO et al., 2000, 2001; LEE, 2000; PAQUIN et al., 2000, 2002; PLAYLE; DIXON; BURNISON, 1993a, 1993b). Águas com baixa dureza, apresentação maior toxicidade pelo cobre, a razão para isso poder está na competição de sítios ligantes, no epitélio branquial dos peixes, como íons de cálcio (MATSUO; WOOD; VAL, 2005; PLAYLE; DIXON; BURNISON, 1993a). Nas junções paracelulares das brânquias, seus sítios de ligação apresentam maior afinidade por íons de cobre que por íons de cálcio, entretanto, em águas com que apresentam alta dureza por íon de cálcio, a competição com íons de cobre ajuda na interação do cálcio nos sítios brânquias em detrimento ao cobre (MATSUO, 2004).

Alguns estudos mostram que a presença da matéria orgânica dissolvida e particulada, no ambiente aquático, podem reduzir a toxicidade de metais. Ela atua como uma espécie de proteção, formando complexos organometálicos com metais e assim reduzido a teor de íons metálicos livre para interagir com as espécies aquáticas (DE SCHAMPHELAERE; JANSSEN, 2004; WOOD et al., 2003). Isso acontece porque a ligação entre a matéria orgânica dissolvida e os íons de cobre é mais estável, quando comparada à ligação que acontece entre as brânquias dos peixes e os íons de cobre (MATSUO; WOOD; VAL, 2005; MATSUO et al., 2004; MCGEER et al., 2002; PLAYLE; DIXON; BURNISON, 1993a, 1993b).

O pH das águas pode aumentar a toxicidade de cobre, uma vez em pH mais ácidos, o complexo formado pela matéria orgânica dissolvida e os íons de cobre, torna-se menos estável, fazendo assim que mais íons de cobre estejam disponíveis para interagir com a branquial dos peixes (DI TORO et al., 2001; MENEZES, 2005; PLAYLE; DIXON; BURNISON, 1993a; WOOD, 1992).

Segundo Sampaio (2000), a origem do cobre na região da amazônica pode ser através da ação do homem, ou pela lixiviação de solos que contenham grandes quantidades de metais. Por esse motivo a composição da água está diretamente ligada ao tipo de solo e dos sedimentos da bacia hidrográfica. Na Amazônica as águas apresentam teor de cobre abaixo da média

mundial encontrada (DAMOUS et al., 2002). Diversas atividades do homem resultam na contaminação dos rios por Cu, como por exemplo a construção civil, minerações, despenho de resíduos industriais, poluição urbana, tintas e peças automobilísticas (DAMOUS et al., 2002; HORBE et al., 2005; LEE, 2000; SAMPAIO, 2000; SANTANA, 2007).

As atividades de mineração na Amazônia são limitadas a algumas poucas regiões, porém seus efeitos são facilmente percebidos. As principais formas de mineração na região amazônica são a extração de minérios de cobre (DAMOUS et al., 2002).

Segundo Santana (2007), o crescimento da indústria e descargas urbanas também são grandes fontes de cobre na região de Amazônia. Pequenos cursos d'água, próximo ao polo industrial de Manaus, por exemplo o "Igarapé do 40", já foram registradas concentrações de cobre próximos  $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$  (SAMPALIO, 2000). O limite máximo de concentração de cobre estabelecido para águas de Classe I, pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), resolução 357/2005, é de  $9,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Água de Classe I, são águas que passaram um por tratamento simplificado, e são destinadas para o consumo humano, à irrigação de hortaliças e frutas, à proteção de comunidades aquáticas e a à proteção das comunidades aquáticas em terras indígenas.

### **2.9.2 Ferro**

O ferro e suas ligas metálicas tem diversas aplicações em vários tipos de construções metálicas, e seus compostos são utilizados para muitos fins. Alguns exemplos da utilização de seus compostos são, por exemplo, o sulfato ferroso que é empregado como fungicida e usado na tinturaria; o cloreto e nitrato de ferro que são empregados como mordentes, c; a hematita e a limonita usadas como abrasivos, adsorventes e pigmentos; na fabricação de tintas de caneta a indústria utiliza o principalmente os composto "azul-de-tumbull" e o "azul-da-Prússia" (MARQUES, 2014).

Ferro é um componente essencial da hemoglobina a mioglobina e facilita seu transporte, transição para o armazenamento do tecido, e o uso celular de oxigênio (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006). Ele também um papel importante no citocromos dentro das mitocôndrias, media a transferência de elétrons na cadeia de transporte de elétrons. O Citocromo P450 no fígado e intestino degradam compostos endógenos e toxinas ambientais. O Ferro também faz parte das enzimas heme (heme é um conjunto de proteínas envolvidas nos processos biológicos fundamentais como respiração, fotossíntese e transporte de

oxigênio) (LAYER et al., 2010) como por exemplo a catase, xantina oxidase, e glutathione peroxidase e atua como cofator enzimático para aconitase, NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, e  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase. O ferro é absorvido como ferro ferroso através do DMT1 (*divalente metal transporter 1*) localizado na membrana apical do enterócito (COOK; FINCH, 1979). O Ferro heme também podem ser absorvidos pela proteína HCP1 (*heme carrier protein*) na membrana apical depois que o ferro é liberado pela ação da lisossomal heme oxigenase. Uma quantidade considerável do ferro no corpo é reciclada pelo colapso das células vermelhas diariamente devido seu envelhecimento e às perdas sanguíneas.

### 2.9.3 Alumínio

O Alumínio é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, sendo o terceiro em abundancia, antecedido pelo oxigênio e silício. No solo está presente nas formas de diversos óxidos e hidróxidos incluindo o ferro, como por exemplo a gibbsita e caulinita em minerais de argila. É encontrado também como íon trocável, precipitado ou adsorvido em compostos hidroxilados complexos e associados a minerais orgânicos (MCBRIDE, 1994; SHUMAN, 1990; SOON, 1993).

A presença de alumínio, em suas diferentes formas, no solo pode provocar a sua fitotoxidez em regiões de solos ácidos, diminuir a capacidade de troca de cátions e influenciar em vários aspectos físicos do solo (GOLDBERG, 1989).

Solos com alto teores de argilominerais 2:1 e pobres em óxidos de ferro e alumínio, sofrem menor degradação quando comparados a solos de regiões tropicais, que apresentam menor predominância da fração argila de argilominerais do tipo 1:1 e menor presença de óxidos de ferro e alumínio (TROECH; HOBBS; DONAHUE, 1980). Na degradação do solo, óxidos de ferro, como por exemplo goethita e hematita, e os óxidos de alumínio, por exemplo a gibbsita, tem grande importância, uma vez que esses óxidos são diretamente relacionados a agregação do solo, sendo considerados agentes desorganizadores à nível microscópico, uma suas concentrações aumentam, as partículas do solo apresentam uma organização mais casual, e por isso, sua estrutura tende a ser granular (RESENDE, 1985). A importância do alumínio na agregação de Latossolos foi estudada e confirmada por Ferreira et al. (1999a, 1999b).

#### 2.9.4 Zinco

Devido ao seu alto potencial de oxidação, o Zn não é encontrado na forma de elemento livre, sendo encontrado principalmente na forma de sulfeto ZnS. Suas ligas ou encanamentos não devem mais ser utilizados. Os íons de Zn (II) participam dos processos enzimáticos de mais de 80 enzimas. Seu consumo diário é recomendado de Zn é de 2 a 15 mg e de 15 mg para mulheres em período de amamentação. Na maioria do processo celulares mostram alguma influência do Zinco. A baixa ingestão de zinco por elevar a diversas perturbações, como por exemplo, perda do apetite, queda de cabelos, alteração no crescimento, alterações no comportamento sexual, feridas da pele e etc. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a concentração máxima de Zn em água potável é de 2 mg L<sup>-1</sup> (ROCHA; HIRCHE, 1994).

A principais utilizações do zinco na indústria são; na produção de inseticidas; pigmentos para pinturas; produtos farmacêuticos; cosméticos; e para fins elétricos, sendo portanto encontrados em diversos resíduos industriais. Presença de zinco na dieta é essencial para o metabolismo humano, uma vez que ele faz parte de ampla variedade de compostos enzimáticos e que atua na atividade de insulina. A quantidade de zinco nos tecidos humanos estão entre 10 a 100 mg L<sup>-1</sup>. Os glóbulos brancos do sangue, apresentam cerca de 3 % zinco. O ser humano elimina em média 10 mg de zinco pelas fezes e 0,4 mg na urina (BATALHA, 1998).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Caracterizar amostras de substâncias húmicas aquáticas do rio Negro em diferentes períodos, através das proporções dos seus principais grupos ligantes e suas disponibilidades de metais.

#### **3.2 Específico**

- Coletar quatro amostras de água durante os períodos de cheia e vazante do rio Negro-AM;
- Obter as amostras de SHAs anidra;
- Caracterizar seus principais grupos ligantes SHA;
- Fazer os estudos de disponibilidade de metais utilizando o sistema de ultrafiltração tangencial.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Amostragem

Foram coletadas amostras de água do rio Negro nos finais dos meses de março, junho, setembro e dezembro de 2012 que correspondem, respectivamente, aos períodos hidrológicos de enchente, cheia, vazante e seca. O ponto de coleta das amostras situa-se entre as confluências das bacias do Tarumã-Açu e Tarumã-Mirim, aproximadamente 20 Km da cidade de Manaus (Figura 7).

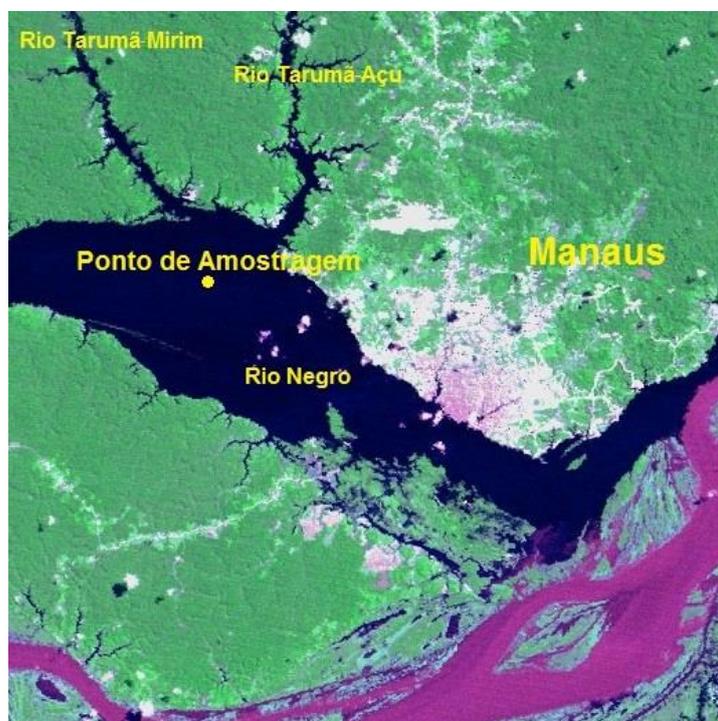


Figura 7. Ponto de amostragem do rio Negro – AM (S 3°04'13.74" e W 60°08'26.92"). Fonte: INPE.

Em cada amostragem foram coletados 200 L de água, acondicionando-os em garrações de plástico e em temperatura ambiente.

### 4.2 Fluxograma da metodologia aplicada

A Figura 8 mostra o fluxograma da metodologia aplicada. Após a coleta das amostras e obtenção de seus parâmetros físico-químicos no momento da coleta, foram utilizadas várias técnicas para verificar as características estruturais das amostras de SHA e foram feitos

estudos de complexação entre as SHA e Metal. Na caracterização estrutural utilizou-se as seguintes técnicas: Análise elementar CH e Teor de Cinzas; Aromaticidade utilizando a razão  $E_2/E_3$ ; RMN de  $C^{13}$  e  $H^1$ ; FT-IR Determinação de metais totais. Para o estudo de complexação das SHA com metais utilizou-se as seguintes técnicas: Deslocamento de metais originalmente complexados pela SHA para EDTA; Troca de metais originalmente complexados pela SHA por íons de  $Cu^{2+}$ .

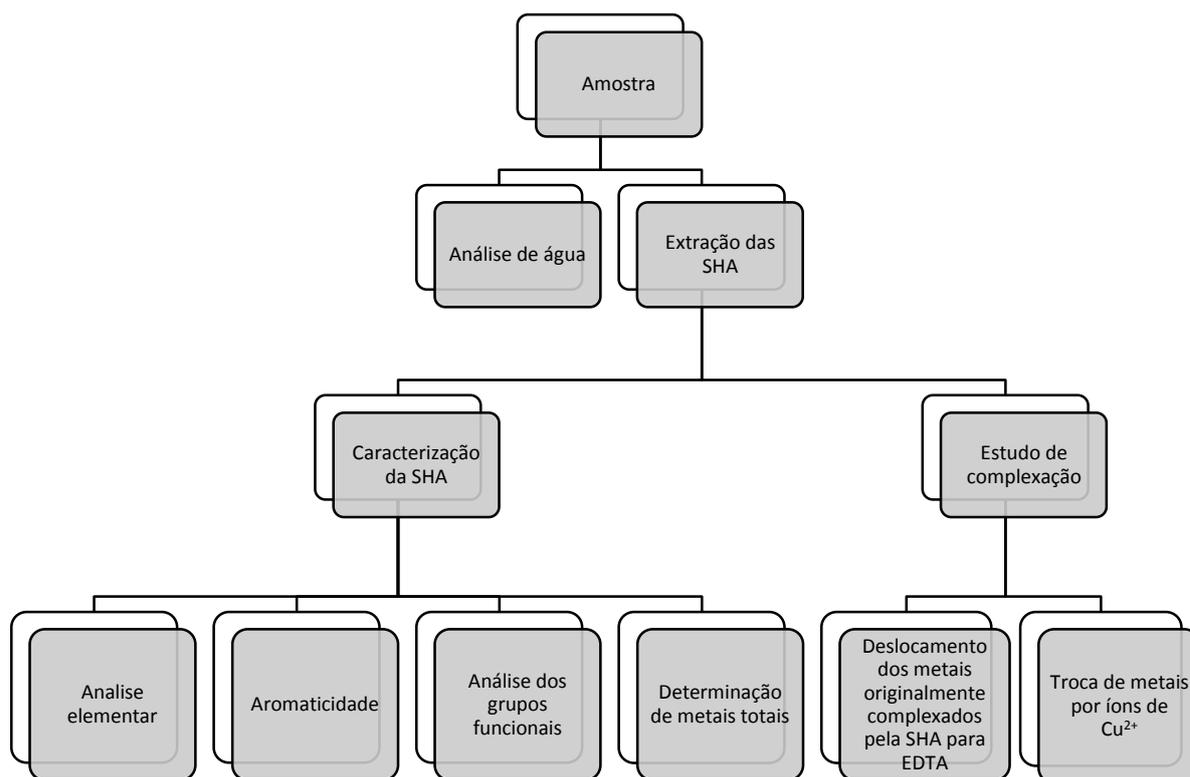


Figura 8. Fluxograma da metodologia aplicada.

### 4.3 Caracterização das amostras de água

Para caracterização físico-químicas das amostras, foram feitas medidas de pH, condutividade e temperatura no momento da coleta.

#### **4.4 Limpeza da resina XAD 8**

A resina macroporosa XAD 8, utilizada para a extração das SHA, foi previamente limpa por bateladas sucessivas com soluções de ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e metanol, respectivamente, conforme recomendado pela *International Humic Substances Society* (IHSS).

#### **4.5 Extração das substâncias húmicas**

Para extração, foi utilizado o procedimento recomendado pela IHSS (THURMAN; MALCOLM, 1983). As amostras foram filtradas em sistema de filtração por gravidade com papel de filtro Whatman 42 e, em seguida, acidificadas com solução de ácido clorídrico  $6,0 \text{ mol L}^{-1}$  até pH 3,0. As amostras foram percoladas por gravidade através de colunas de vidro (2 cm de diâmetro interno e 25 cm de altura) empacotadas com resina XAD 8, com fluxo de  $3 \text{ mL min}^{-1}$ . Com a saturação da resina, verificada pelo escurecimento, foram percoladas sucessivamente com 300 mL de solução de ácido clorídrico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , para a remoção de impurezas, e hidróxido de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  para eluição das SHA retidas pela resina com vazão de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Após cada eluição, a resina foi recondicionada, percolando 500 mL de ácido clorídrico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , para continuar o processo de extração.

#### **4.6 Purificação dos extratos húmicos**

Antes de fazer as caracterizações da substância húmica aquática, fez-se diálise para remoção do excesso de sais dissolvidos. As membranas de diálise (Samless cell 16 x 100 clear) foram preparadas segundo o procedimento descrito por (TOWN; POWELL, 1992). Após tratamento por 10 minutos com solução de bicarbonato de sódio 2 % (m/v) e solução de EDTA dissódico dihidratado  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ , as membranas foram lavadas com água deionizada ( $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e estocadas em refrigerador.

Os extratos húmicos foram purificados utilizando-se membrana de diálise contra água deionizada até teste negativo para cloretos (teste com solução de nitrato de prata  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ) (CAMPANELLA et al., 1995). Após a remoção de excesso de sais dissolvidos por diálise, os extratos húmicos foram liofilizados conforme procedimento descrito por Pitombo (1989). O material liofilizado foi pesado e mantido no dessecador.

#### **4.7 Análise elementar**

Foi determinado a composição elementar das SHA em relação ao conteúdo de carbono, hidrogênio em equipamento para análise elementar CHNSO – CE Instrumensts, Perkin-Elmer, EA 1110.

#### **4.8 Teor de cinzas**

Amostras de aproximadamente 10 mg dos extratos liofilizados foram calcinadas a 800 °C em mufla marca QUIMIS, modelo Q-318524, durante 4 h. Foi calculado o teor de matéria orgânica pela diferença de massa após a calcinação, considerando-se resíduo final a matéria inorgânica (GRIFFITH; SCHNITZER, 1975)

#### **4.9 Caracterização dos grupos ligantes das SHA**

##### **4.9.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier**

As análises de infravermelho foram feitas em um espectrômetro com transformada de Fourier, marca Bomem MB-102. Para a análise foram feitas pastilhas do material húmico liofilizado na proporção de 1-100 (1 mg de amostra e 100 mg de KBr). Foram feitas 16 varreduras com 2 cm<sup>-1</sup> de resolução e espectros obtidos na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

##### **4.9.2 RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H**

Nos espectros RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos em 75,5 MHz por um espectrômetro BRUKER ULTRASHIELD 300 usando as seguintes condições experimentais: As amostras foram preparadas utilizando 100 mg de SHA dissolvidos em 2 mL de NaOD 0,5 mol L<sup>-1</sup>; tempo de aquisição 0,20 s; tempo total, 62 h; sweep width, 24414 Hz; e resolução, 3*k*, onde *k* é um parâmetro experimental que representa o melhor nível para a obtenção do espectro de RMN. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, das mesmas amostras, foram obtidos em 300 MHz usando as seguintes condições experimentais: Tempo de aquisição 0,58 s; tempo total de 37 min; sweep width, 7002 Hz; números de scans, 1400; e resolução de 4*k*. Em todas as análises de

RMN de  $^1\text{H}$  foram utilizadas o procedimento de pré-saturação para reduzir o sinal proveniente da água.

### **4.9.3 Aromaticidade**

Para o estudo de aromaticidade foi utilizada a equação I. Essa equação foi desenvolvida por Peuravuori e Pihlaja (1997) que propuseram uma relação entre a aromaticidade e a razão  $E_2/E_3$  (absorbância em 250 e 365 nm) para o material húmico. As análises foram realizadas em espectrômetro de UV-VIS marca THERMO, modelo Aquamate.

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

## **4.10 Estudo de disponibilidade de metais das SHA utilizando sistema de ultrafiltração tangencial**

### **4.10.1 Montagem do sistema de ultrafiltração tangencial**

Este experimento consiste na separação por filtração em membrana de 1 kDa, entre espécies metálicas livres e complexadas. As SHA apresentam tamanhos moleculares superiores a 1 kDa e seus complexos ficam retidos na membrana, enquanto que os íons metálicos são filtrados. A concentração do metal livre será igual à concentração determinada no filtrado e o metal complexado será obtido por diferença da concentração total. O procedimento é capaz de fornecer parâmetros de complexação como, constantes de troca, estabilidade dos complexos e afinidade de espécies metálicas por SH (BURBA; SHKINEV; SPIVAKOV, 1995; ROCHA; ROSA, 2003; ROMÃO; ROCHA, 2005).

Para os estudos de troca dos metais, originalmente complexados, de Fe, Zn e Al, por íons de  $\text{Cu}^{2+}$  e EDTA, utilizou-se o procedimento analítico adotado por Burba et al. (2001), ilustrado na Figura 8.

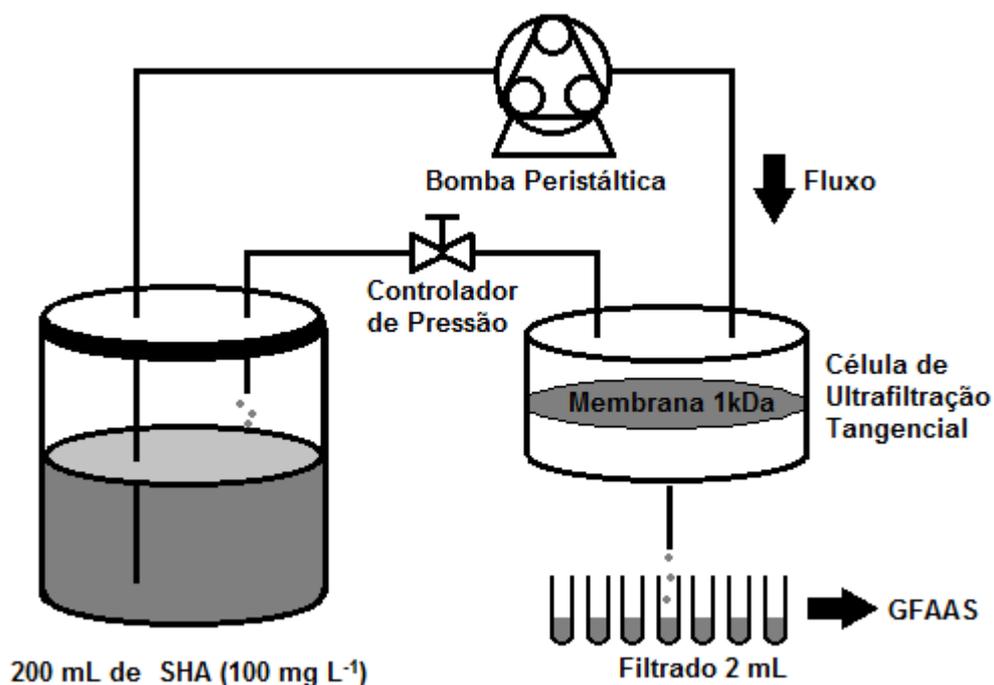


Figura 9. Esquema do procedimento analítico utilizado para estudos de troca entre espécies metálicas originalmente complexadas por íons de  $\text{Cu}^{2+}$  e EDTA. Adaptado de Burba et al., 2001.

O sistema de ultrafiltração foi montado utilizando uma célula Sartorius Ultrasart X, equipado com membrana de porosidade de 1 kDa e 47 mm de diâmetro (Polyethersulfone, Gelman Pall-Filtron OMEGA), uma bomba peristáltica de múltiplos canais (Isma-tec modelo MC-MS/CA8), equipada com tubos Tygon®, controlador de pressão, agitador magnético e recipiente para adição da amostra. A amostra é aspirada do seu recipiente pela bomba peristáltica, em velocidade máxima para evitar o entupimento da membrana, e a pressão é controlada com o ajuste do regulador de pressão fazendo o controle da filtração. A vedação da célula de ultrafiltração Sartorius Ultrasart X, originalmente, é feita através de um O-ring de borracha, não sendo apropriado na determinação e quantificação de metais traço, visto que eles podem absorver e liberar metais ao sistema. Sendo assim, foi necessário testar alguns O-ring disponíveis no mercado. Testou-se também a utilização de um selo de nylon para substituir o O-ring, utilizando chapas de acrílico para efetivar a vedação.

#### **4.10.1.1 Teste dos diferentes Anéis de Vedação**

Testou-se a absorção e liberação de metais (Fe, Cu) com alguns tipos de O-ring (anel de vedação) de silicone, borracha e Tygon®. Colocou-se, separadamente, os diferentes tipos de O-ring em erlenmeyers de 50 mL, em seguida adicionou-se solução de Fe e Cu 50 ppb, a cada erlenmeyers, até que os O-ring fossem cobertos, e em erlenmeyer separado foi feito um branco. Feito isso, os erlenmeyers foram deixados em repouso por um período de 24 horas. Após esse período coletou-se 2 mL de cada erlenmeyers e quantificaram-se os metais utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS).

#### **4.10.2 Estudo de troca dos metais Fe, Zn e Al por íons de Cu<sup>2+</sup>**

Os metais Fe, Zn e Al foram comparados através das constantes de troca dos metais com íons Cu<sup>2+</sup>. Essas constantes foram obtidas com o auxílio do sistema de ultrafiltração tangencial, adicionando 200 mL, ao recipiente de amostra, solução de SHA 100 mg L<sup>-1</sup>. Primeiramente filtrou-se a primeira alíquota (2 mL), corresponde ao tempo zero, antes da adição da solução de Cu<sup>2+</sup>. Essa alíquota contém uma pequena quantidade de Cu<sup>2+</sup> livre originalmente na amostra de SHA, além de outras substâncias (ex. proteínas, lipídios) ligadas naturalmente com tamanho molecular menor que 1 kDa. Após a coleta da primeira alíquota, foi adicionado solução de Cu a solução SHA, ajustando a concentração inicial de Cu<sup>2+</sup> a 1 mg L<sup>-1</sup>, feito isto esperou-se 10 minutos, para que o equilíbrio de troca fosse alcançado, e coletou-se 2 mL do filtrado. Foram feitas sucessivas adições de Cu<sup>2+</sup> até que a concentração final atingisse 40 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 2), respeitando-se o tempo de equilíbrio de troca e fazendo a coleta de 2 mL a cada adição. (BURBA; VAN DEN BERGH; KLOCKOW, 2001; NIFANT'ÉVA et al., 2001). As amostras foram analisadas em GFAAS marca PERKIN ELMER, modelo SIMAA 6000.

Tabela 2. Volumes das adições da solução de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizados nos experimentos de troca de metais originalmente complexados em 200 mL de SHA  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

Adições	Volume ( $\mu\text{L}$ )	$\text{Cu}^{2+}$ adicionado (mg)	Concentração de $\text{Cu}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1	200	0,20	1,00
2	170	0,17	1,85
3	314	0,31	3,41
4	581	0,58	6,32
5	1074	1,07	11,69
6	1987	1,97	21,62
7	3674	3,67	39,98

Para o cálculo das constantes  $K_{\text{troca}}$  utilizou-se as seguintes equações:



$$K_{\text{troca}} = \frac{[\text{Cu-SHA}][M]}{[M-\text{SHA}][\text{Cu}]} \quad (\text{III})$$

Onde  $[M]_{\text{livre}}$  e  $[\text{Cu}]_{\text{livre}}$  são determinadas nos filtrados obtidos por ultrafiltração.

A concentração de metal complexado é obtida pela seguinte formula:

$$[M-\text{SHA}] = C_{\text{mt}} - [M] \quad (\text{IV})$$

Onde  $C_{\text{mt}}$  é concentração de metal originalmente complexado pela SHA determinada nas amostras no tempo zero, ou seja, antes da adição de íons de  $\text{Cu}^{2+}$ .

A concentração de Cu complexada  $[\text{Cu-SHA}]$  é dada por:

$$[\text{Cu-SHA}] = C_{\text{Cu add}} - [\text{Cu}] \quad (\text{V})$$

Onde  $C_{\text{Cu add}}$  é o somatório da concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  na amostra aberta incluindo a massa adicionada para cada intervalo de tempo.

Plotando os dados no gráfico, sendo o eixo das abscissas a razão  $\text{Cu}^{2+}_{\text{livre}}/\text{Cu-SHA}$  e no eixo das ordenadas  $M_{\text{livre}}/M-\text{SHA}$ , calcula-se a regressão linear e obtém-se a equação reduzida de reta ( $y = bx + a$ ), onde o valor do coeficiente angular ( $b$ ) é a constante de troca  $K_{\text{troca}}$  (BURBA; VAN DEN BERGH; KLOCKOW, 2001).

#### 4.10.3 Trocas de metais originalmente complexados pela SHA para EDTA

O experimento de troca de metais por EDTA foi feito similarmente ao experimento de troca por  $\text{Cu}^{2+}$ . Adicionou-se 200 mL da amostra de SHA ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) ao sistema de ultrafiltração, submeteu-se a agitação e coletou-se uma alíquota do filtrado (2 mL) no tempo

zero. Em seguida adicionou-se 2 mL da solução de EDTA 10 g L<sup>-1</sup>, regulando-se assim a concentração EDTA/SHA em 1:1. As coletas foram feitas nos tempos de (5, 10, 20, 60, 120, 240, 360, 480, 720, 1440 e 1680 min). As análises foram feitas em GFAAS (BURBA; VAN DEN BERGH; KLOCKOW, 2001).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dados da amostragem

Na Tabela 3 são mostrados os dados físico-químicos das amostras no momento da coleta e a Figura 9 mostra uma comparação entre os valores de cotas mensais do ano de coleta (2012) com a média dos valores de cotas mensais nos dez anos anteriores.

Tabela 3. Dados físico-químicos das amostras de SHA do rio Negro.

Amostra RN	Temperatura (°C)	Hora	pH	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
Enchente	30,2	09:41	5,1	12
Cheia	30,0	10:00	5,5	12
Vazante	31,4	09:50	5,0	14
Seca	33,0	11:00	4,9	11

Os baixos valores condutividade medidos são característicos das chamadas “águas pretas” que possuem baixo teor de íons livres. Os valores de condutividade medidos são corroborados pelos valores encontrados por Fadini e Jardim (2001), Oliveira (2007) e Sargentini (2008). O pH ácido do rio Negro é causado pelo elevado aporte de substâncias húmicas de origem de áreas de solos podzólicos hidromórficos.

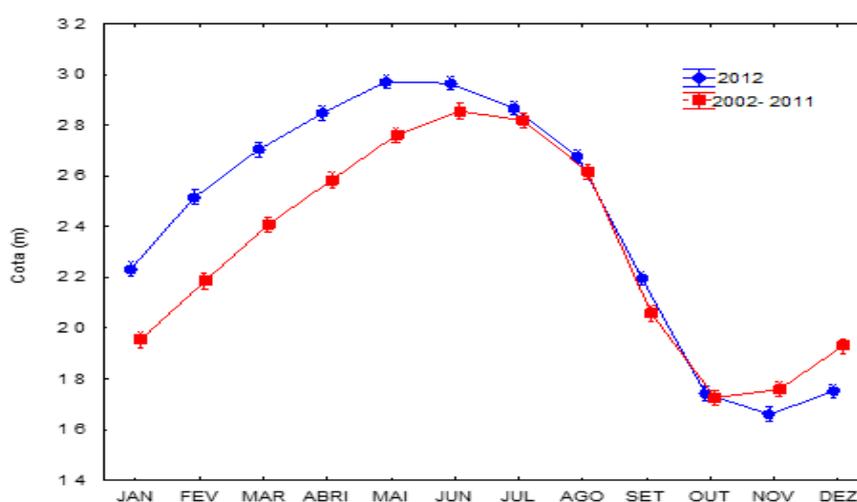


Figura 10. Variação da cota do ano de 2012 em comparação com variação média entre os anos de 2002 a 2011. Fonte: Agência Nacional de Águas 2014.

Esse ano apresentou períodos de cheia e seca mais acentuados que a média dos dez anos anteriores, atingindo o auge da cheia no mês de maio e o ápice da seca no mês de novembro. Segundo Oliveira (2007), nos períodos de enchentes, várzeas, igarapés e floresta são alagados pelo rio Negro. Com o início das vazantes, no mês de junho, a água retira-se da floresta, e entre os meses de outubro e fevereiro as águas de igarapés permanecem em seus pequenos canais.

## **5.2 Extração, Teor de Cinzas e Razão H/C das SHA**

A extração das SHA através da resina XAD-8 é a mais adequada quando se trata de grandes volumes de água, sendo de baixo custo e manuseio simples. Porém, é conhecido que durante o processo de extração, alguns resíduos do processo de fabricação da resina podem ser adsorvidos pelas SHA, podendo causar algumas alterações nas amostras. O processo de extração das SHA para cada amostra, incluindo as etapas de purificação e liofilização, leva cerca de um mês para ser concluído. As massas das SHA extraídas para os meses de março, junho, setembro e dezembro de 2012 foram; 2,22, 1,17, 1,02 e 2,58 g respectivamente.

O grau de pureza ou teor de compostos inorgânicos podem ser estimados através do teor de cinzas. A presença de compostos de cálcio, magnésio e sílica podem elevar o teor de cinzas (SLOBODA et al., 2009). Segundo Huffman e Stuber (1985), compostos de fósforo nem sempre são volatilizados durante a queima, e por isto, podem estar incluídos nas cinzas.

A grande maioria dos resultados de teor de cinzas, expressos na literatura, são para as frações ácido húmico e ácido fúlvico de substâncias húmicas, purificadas através das técnicas com resinas de troca aniônica (IR-400) e catiônica (IR-120) (ROSA; ROCHA; FURLAN, 2000) que podem elevar o teor de cinzas, dificultando assim a comparação dos resultados obtidos. Entretanto, essa comparação, pode ser feita com valores de teor de cinzas obtidos por Sargentini (2001) e Leenheer (1980), que encontram os respectivos teores de cinzas de 34,9 % e 28,5 % para amostras de SHA do rio Negro, utilizando extração por resina macroporosa XAD-8, conforme podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Teor de Cinzas das amostras de SHA nos diferentes períodos, análise elementar e razão H/C.

Amostras	COD (mg L <sup>-1</sup> )	Teor de Cinzas %	Composição Elementar %		H/C
			H	C	
			Enchente	35,94	
Cheia	26,77	15,93	3,89	40,84	1,14
Vazante	34,78	14,54	3,54	43,27	0,97
Seca	23,98	14,53	4,32	42,99	1,20
SHA Sargentini 2001	nd	34,9	5,60	39,60	1,70
SHA Leenheer 1980	nd	28,5	4,70	47,90	1,18

nd = não disponível.

Os teores de cinzas obtidos no presente trabalho, são em geral, cerca de duas vezes menor que os valores obtidos por Sargentini e Leenheer. Essas diferenças podem estar associadas aos métodos de purificação das amostras, como por exemplo, a diferente eficiência na etapa de diálise.

A razão molar H/C, em geral é usada para estimar o grau de aromaticidade de das substâncias húmicas. Valores pequenos para a razão sugerem uma estrutura mais aromática. A porcentagem de C e H, encontrados para as amostras de SHA, são similares aos valores encontrados em vários estudos de SHA do rio Negro, que variam entre: 42-49 % para C e 4,1-5,2 % para H (LEENHEER, 1980; OLIVEIRA, 2007; ROCHA et al., 2000a; SARGENTINI JR et al., 2001; ZÚÑIGA, 2006).

Segundo Rocha e Rosa (2003) esses dados podem ser utilizados na identificação de característica e mudança estruturais da MO em estudo, como por exemplo, é conhecido que o conteúdo de hidrogênio está relacionado com o grau de saturação, isto é, um aumento no teor de hidrogênio indica maior número de carbonos alifáticos.

Ao ordenar os meses de coleta, através das razões H/C, em ordem decrescente de alifacidade obtém-se: dezembro>junho>março>setembro conforme demonstrado na Tabela 3. Esses resultados sugerem não haver uma relação entre os períodos sazonais e o caráter alifático das SHA, visto que os meses não se encontram em ordem cronológica direta ou inversa. Entretanto, várias pesquisas (OLIVEIRA, 2007; ROCHA; ROSA, 2003; ZÚÑIGA, 2006) mostram haver essa relação, sugerindo que nos meses de cheia do rio Negro, as SHA apresentam estruturam com maior caráter alifático e nos meses de vazante menor caráter alifático.

### 5.3 Caracterização dos grupos ligantes das SHA

#### 5.3.1 Análise espectroscópica no infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho tem sido amplamente utilizada por diversos autores para caracterizar os grupamentos orgânicos presentes da estrutura da SHA (BURBA et al., 1998; OLIVEIRA, 2007; PICCOLO; NARDI; CONCHERI, 1996; ROCHA et al., 2000c; STEVENSON, 1982). Na Figura 10 são apresentados os espectros obtidos na região do infravermelho das quatro amostras de SHA. Os espectros obtidos apresentaram bandas largas e comuns características das SHA, atribuídas às superposições de absorções individuais e similaridades entre os grupos funcionais presentes nas estruturas das SHA.

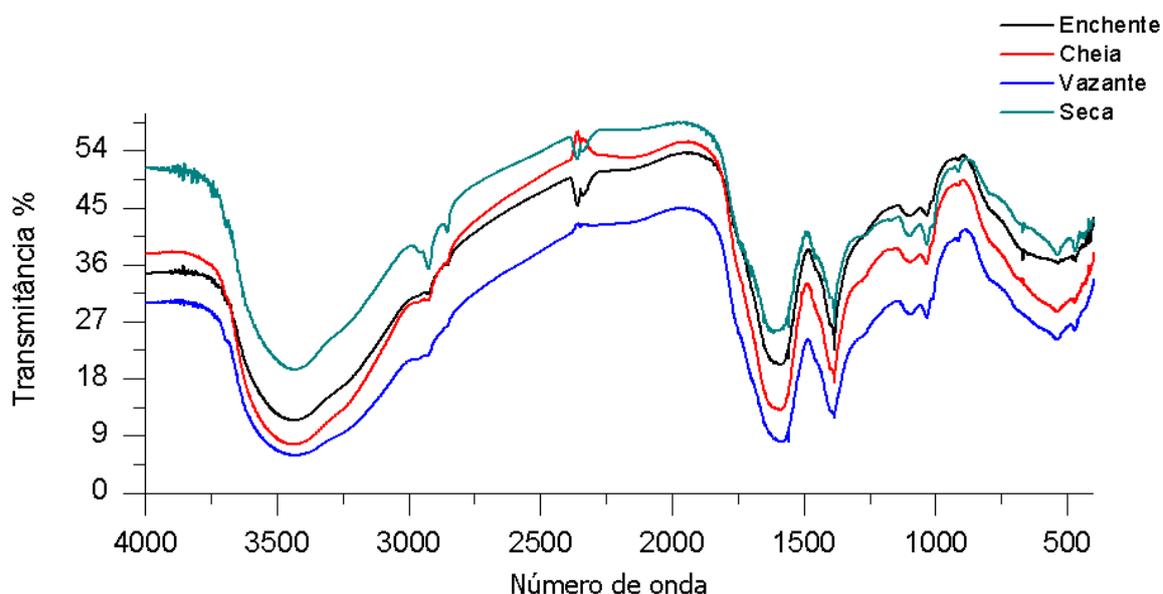


Figura 11. Espectros de FT-IR das amostras de SHA do rio Negro.

Os espectros de infravermelho das diferentes amostras de SHA do rio Negro apresentaram todas bandas intensas e largas. A banda em distinta em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a presença de estiramento OH de grupos carboxílicos, alcoólicos, fenólicos e da água ligada. Em  $2900\text{ cm}^{-1}$  observou-se banda atribuídas aos metilenos alifáticos ou estiramentos C-H, que em geral ficam superpostas à banda larga produzida pelo estiramento OH. Na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$  foram observadas bandas características da vibração de estiramentos C=C de anéis aromáticos conjugados com C=O e/ou  $\text{COO}^-$ , essas bandas indicam a aromaticidade de SHA. Essas bandas podem ser causadas também por vibrações do estiramento C=O do grupo COOH, sendo que nesse caso o H está ligado ao grupo OH em posição orto, e ao estiramento

anti-simétrico do grupo carboxilato. As bandas observadas na região de 1370 e 1440  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos grupos C-H alifáticos e vibrações ácidos carboxílicos ou do grupo OH (RICCA et al., 2000; SLOBODA et al., 2009; STEVENSON, 1982).

Comparando-se as bandas encontradas nos espectros, nas diferentes amostras, observa-se uma similaridade entre elas, sugerindo a princípio, não haver uma diferença entre seus espectros, embora alguns apresentem picos mais intensos. As quatro amostras apresentaram espectros de SHA similares aos encontrados por Oliveira (2007) e Zúñiga (2006), que também não conseguiram associar com clareza as diferenças nos espectros de FT-IR com a variação da sazonalidade.

A comparação entre os diferentes espectros de FT-IR é uma tarefa bastante complicada já que os espectros são resultados de sobreposição de vários sinais, e devido à natureza complexa das SHA, seus sinais são largos e intensos o que prejudica a identificação de estruturas com sinais mais fracos, assim dificultando a comparação entre os diferentes espectros. Entretanto, pode ser aplicado o teste não-paramétrico de Friedman (Tabela 5) para comparação da igualdade entre os espectros normalizados (Figura 12).

Tabela 5. Teste Friedman para as transmitâncias enchente, cheia, vazante, seca.

	<b>Média</b>	<b>Soma</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Pad.</b>
<b>Enchente</b>	2,8327	5291,5000	0,6929	0,2227
<b>Cheia</b>	2,1962	4102,5000	0,6355	0,2500
<b>Vazante</b>	1,3991	2613,5000	0,6091	0,2553
<b>Seca</b>	3,5720	6672,5000	0,7351	0,1866

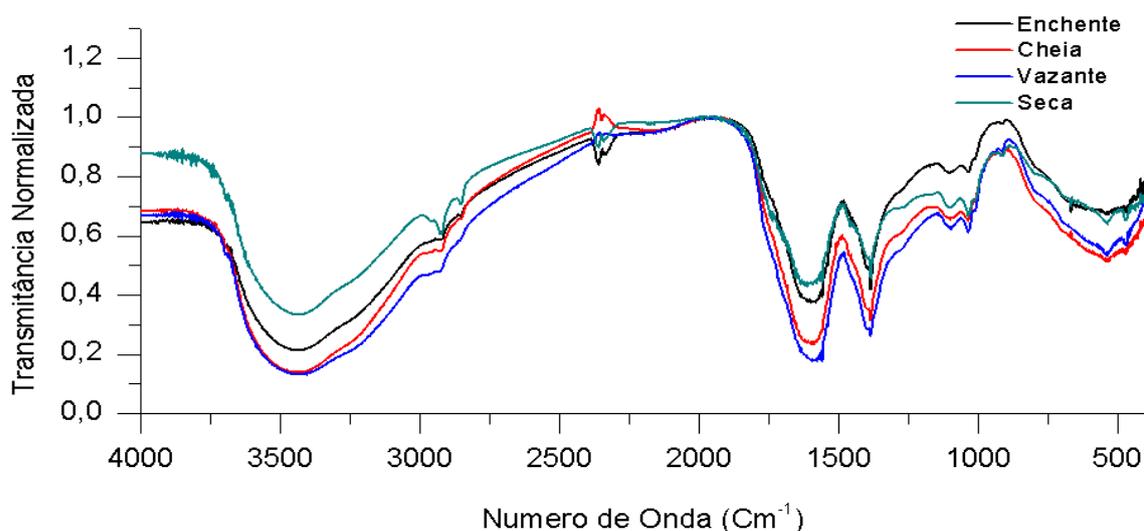


Figura 12. Espectros Normalizados de FT-IR das amostras de SHA do rio Negro.

O teste de Friedman dos espectros de FT-IR apresentou valor de  $p$  menor que 0,05, indicando assim que os espectros são diferentes, quando comparados utilizando os valores de transmitância normalizados. Apesar da diferença entre as transmitâncias, a partir da Análise de Cluster (Figura 13) é possível observar que os períodos de cheia e vazante apresentaram maior similaridade em relação às transmitâncias. Já o período de seca foi o que mais se diferenciou dos demais.

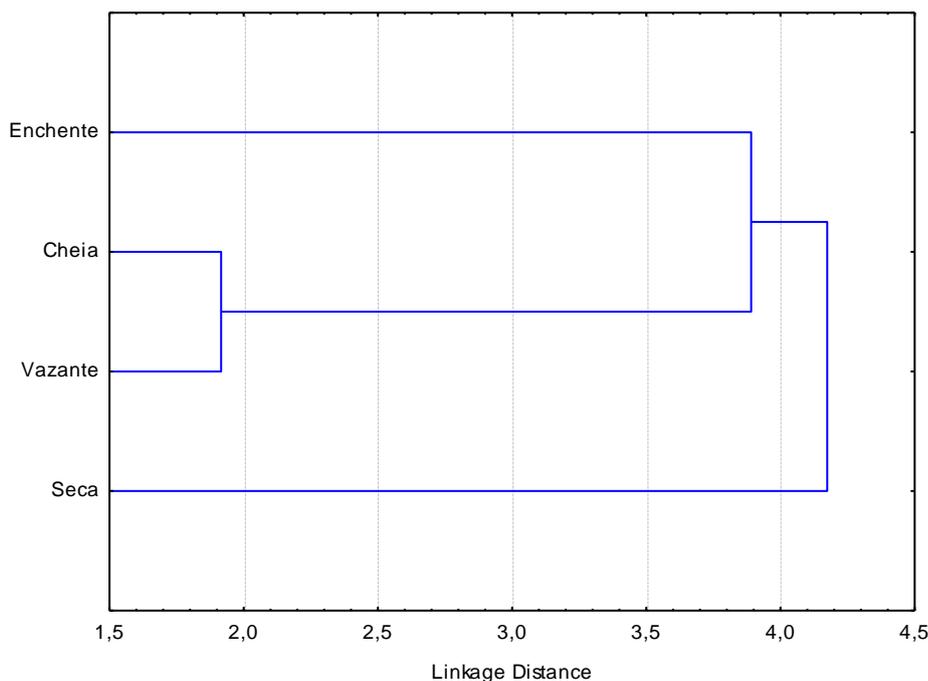


Figura 13. Análise de Cluster das transmitâncias dos períodos hidrológicos de enchente, cheia, vazante e seca.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software Statistica*, versão 7.1 (STATSOFT, INC. 2005). A explicação para a maior similaridade entre o período de cheia e vazante ainda é incerta e precisa de maiores estudos, entretanto, um bom palpite para explicar a similaridade desses espectros pode estar no regime de chuva da região, uma vez que nesses períodos hidrológicos as chuvas são escassas e por isso podem interferir no aporte de carbono ao rio.

### 5.3.2 Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$

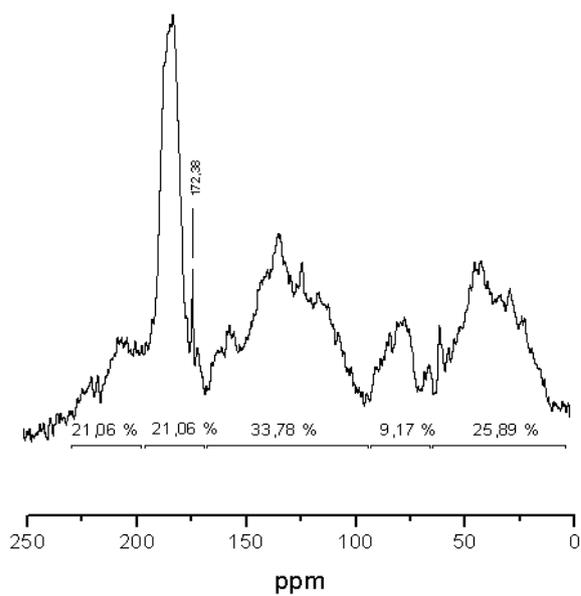
A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica apropriada para a caracterização de substâncias húmicas (WILSON, 1989). Em geral, ambas, RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , são usadas para comparar diferenças na concentração dos principais grupos funcionais entre

amostras de substância húmica (WERSHAW et al., 1990). Os vários picos no espectro são atribuídos aos grupos funcionais de carbono específicos, apesar de haver algumas sobreposições de sinais de ressonância, o que pode ser devido à larga variedade de grupos funcionais, que são diferentes em um material complexo, como as substâncias húmicas. Dessa forma, é possível fazer medidas diretas do teor de carbonos carboxílicos, aromáticos e alifáticos fazendo a integração das suas regiões específicas, levando em conta qualquer possível sobreposição das regiões (BORTIATGNSKI, 1996).

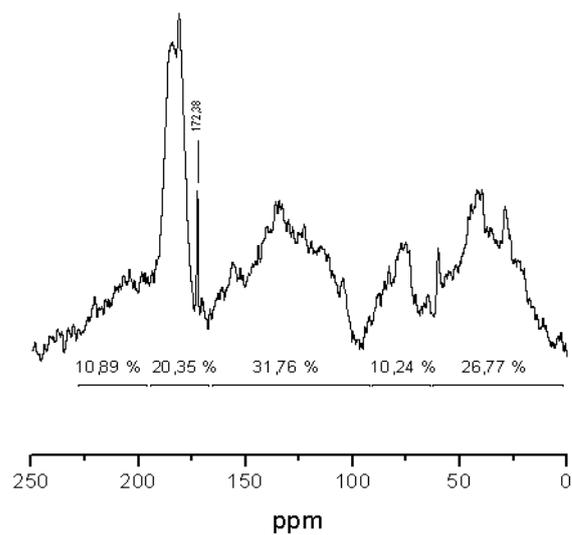
No presente trabalho, escolheu-se utilizar as mesmas regiões de ressonância utilizadas por Rocha et al., (1999), que em seu trabalho, ao fazer a caracterização da SHA do rio Negro, utilizou as regiões de ressonância para os espectros de RMN de  $C^{13}$ . Para os espectros de RMN de  $H^1$  escolheu-se utilizar as mesmas regiões definidas por Rocha et al., (2000a). Esses dois trabalhos foram escolhidos como referência por apresentarem regiões de ressonância mais coerentes as diferentes bandas espectrais obtidas nesse trabalho.

A Figura 11 mostra os espectros de RMN de  $C^{13}$  obtidos das amostras de SHA, em diferentes períodos sazonais e os valores dos deslocamentos químicos estão apresentados na Tabela 5.

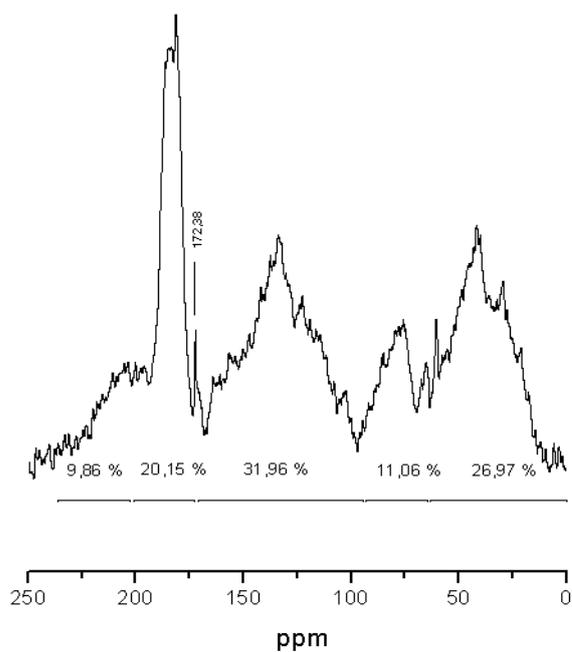
RMN de  $^{13}\text{C}$  RN 23/03/12



RMN de  $^{13}\text{C}$  RN 29/06/12



RMN de  $^{13}\text{C}$  29/09/12



RMN de  $^{13}\text{C}$  20/12/12

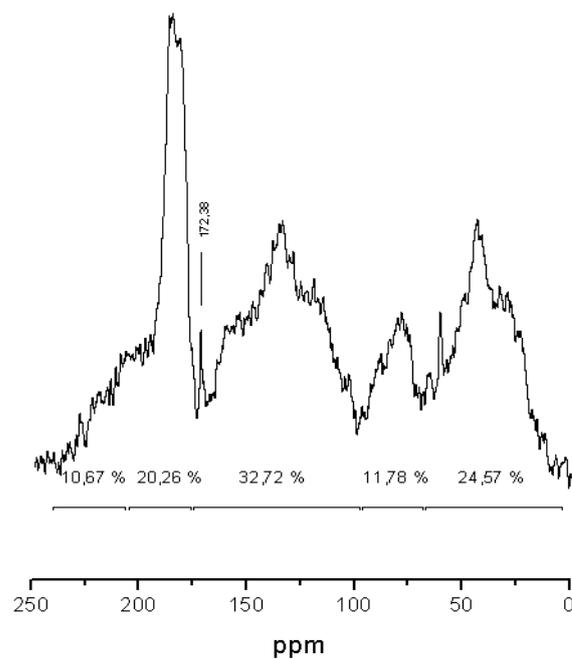


Figura 14. Espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz, NaOD) das amostras de SHA do rio Negro. Os espectros foram calibrados usando a banda referente ao acril-éster dissolvido da resida XAD-8.

Tabela 6. Atribuições dos picos para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das amostras de SHA do rio Negro e as integrações de suas áreas (%). Deslocamentos químicos e suas atribuições foram adaptados de Rocha et al., (1999).

ppm	Atribuições	Integração %				Média
		RN Enchente	RN Cheia	RN Vazante	RN 29/12/12	
<b>0-65</b>	Parafinas	25,06	25,98	26,40	23,62	25,27
<b>65-100</b>	Hidroxilas, Éteres	10,11	11,32	11,13	12,15	11,18
<b>100-165</b>	Olefinas, Aromáticos	32,93	32,69	31,68	34,09	32,85
<b>165-190</b>	Carboxílicos	20,58	20,52	20,59	18,71	20,10
<b>190-230</b>	Cetonas	11,32	9,48	10,19	11,43	10,61

A região alifática 0 a 65 ppm apresenta uma banda larga sem resolução, que indica que os componentes alifáticos são provavelmente cadeias de comprimento curto ou são altamente ramificadas. A média das integrais obtidas para essa região, durante o período sazonal, mostra que 25,27 % do carbono presente tem ligações do tipo  $\text{sp}^3$ .

A região dos carbonos alifáticos oxigenados, que representa uma variedade de grupos alcoóis, éteres e ésteres, atribuído entre 65 a 100 ppm, exibe uma quantidade relativamente pequena de sinais. A média da integração, para toda região dos carbonos alifáticos oxigenados, mostra que 11,18 % dos carbonos estão nessa região.

A região dos grupos aromáticos e olefinas (100 a 165 ppm) apresentou um valor médio de integração de 32,85 %, portanto, contendo a maior porcentagem de carbonos. A região que vai de 165 a 190 ppm é relacionada aos grupos carboxílicos, carbonos de amidas e ésteres, correspondendo na média para o período sazonal, a 20,10 % dos carbonos. A região de carbonos de cetonas e aldeídos, que vai de 190 a 230 ppm, apresentou o menor valor porcentual, 10,61 %.

As comparações dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das amostras de SHA através dos valores de integração obtidos, para os mesmos deslocamentos químicos, sugerem não haver diferença significativa na proporção dos grupos funcionais nos períodos de cheia e seca.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  servem com um auxiliar na identificação dos grupos funcionais das amostras de SHA.

Na Figura 12 são apresentados os espectros de RMN de  $\text{H}^1$  para as amostras sazonais de SHA do rio Negro e os resultados dos valores dos deslocamentos químicos estão apresentados na Tabela 6.

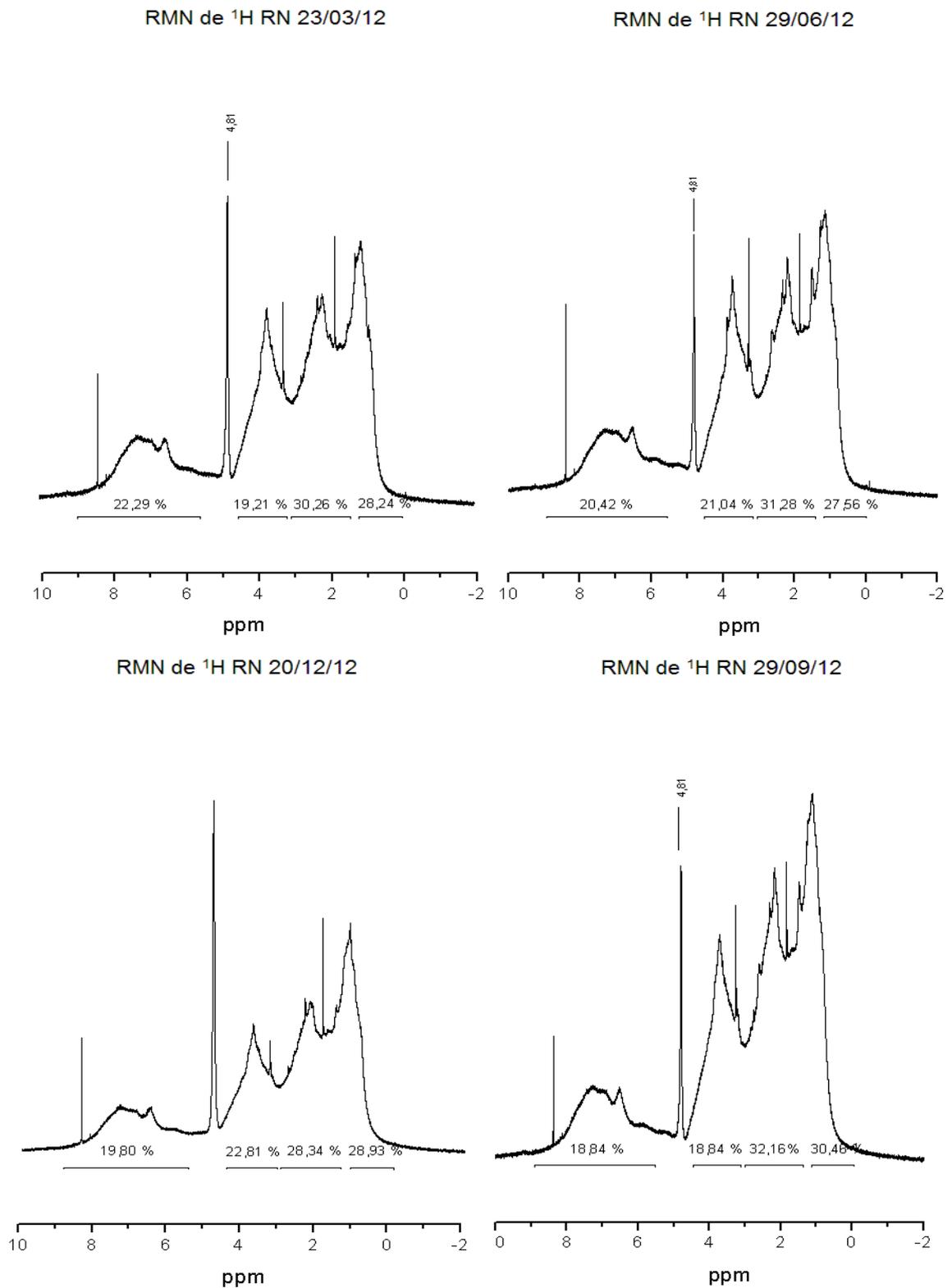


Figura 15. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) das amostras de SHA do rio Negro. Os espectros foram calibrados usando a sinal de água como referência.

Tabela 7. Atribuições dos picos para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de SHA do rio Negro e as integrações de suas áreas (%). Deslocamentos químicos e suas atribuições foram adaptados de Rocha et al., (2000b).

ppm	Atribuições	Integração %				Média
		RN 03/12	RN 06/12	RN 09/12	RN 12/12	
0-1,6	C-CH <sub>n</sub> (n = 2;3)	28,24	27,56	30,48	28,93	28,80
1,6-3,0	(O)-CO-CH <sub>n</sub>	30,26	31,28	32,16	28,34	30,51
	Prótons alifáticos ligados a átomos de C					
3,3-4,5	$\alpha$ em um anel de benzeno; O-CH <sub>n</sub> ; N-, CH <sub>n</sub> (n = 1;2)	19,21	21,04	18,84	22,81	20,48
5,5-9,0	Olefinas e Aromáticos	22,29	20,42	18,84	19,80	20,34

Os sinais na região de 0–1,6 ppm são atribuídos a prótons metílicos de hidrocarbonetos, prótons metilênicos e prótons alifáticos,  $\beta$ -substituídos. A região entre 1,6-3,0 ppm e relacionada a prótons alifáticos  $\alpha$ -substituídos. Os picos entre 3,3-4,5 ppm são típicos de prótons de carbonos ligados a heteroátomos de oxigênio e nitrogênio. O pico na região de 3,6 ppm, corresponde a prótons de carbonos alifáticos ligados diretamente com oxigênio, e valor médio de integração para toda a região (3,3 a 4,5) foi de 20,48 %, sugerindo uma significativa presença de componentes como açúcares ou outro material polihidróxido ou poliéter. Essa afirmação é corroborada pelos espectros de RMN de  $\text{C}^{13}$  que mostraram sinais entre a região de 60 a 80 ppm, que é característica de carbonos oxigenados, sugerindo assim, a presença de estruturas como açúcares ou algum material polihidróxido que também contém grupos carboxílicos, aromáticos e grupos alquil. O pico amplo na região de 5,0 ppm é atribuído ao resquício do sinal de  $\text{H}_2\text{O}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os picos na região que vai de 5,5 a 9,0 ppm são atribuídos prótons de grupos aromáticos e olefinas, representando 20,34 % da média para o período sazonal de prótons.

As variações encontradas nos diferentes deslocamentos químicos para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são equivalentes às encontradas para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , esse comportamento já era esperado, visto que são espectros das mesmas amostras e, portanto, a princípio, os prótons estão ligados aos diferentes grupos funcionais que tem a razão carbono e hidrogênio fixa. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  auxiliam da confirmação da presença dos diferentes grupos.

Esses resultados são diferentes do resultados obtidos por Oliveira (2007) que investigando amostra de SHA, no mesmo ponto de coleta desse trabalho, por RMN de  $^{13}\text{C}$  apontou haver diferença na estrutura das SHA nos diferentes períodos de coleta, obtendo como por exemplo valores de integração para o deslocamento químico entre 0-65 (grupos C-alquil, metoxil e N-alquil) de 53,1 % para o mês de março e 36,9 % para o mês de dezembro. Zúñiga (2006) também sugeriu haver uma relação dos espectros de RMN de  $\text{C}^{13}$  e os períodos sazonais, mostrando que as SHA dos períodos de vazante (junho à novembro) e de início cheia (dezembro à fevereiro) do rio Negro, apresentam um aumento na proporção de grupo aromáticos.

A comparação entre os espectros mostrou-se tarefa bastante complicada, já que na maioria das vezes é preciso fazer pequenas correções nos espectros gerados (correções de fase e base) que geram diferenças significativas nos valores de integração dos diferentes deslocamentos químicos.

### 5.3.3 Aromaticidade $E_2/E_3$

As substâncias húmicas possuem grupos cromóforos, que absorvem fortemente abaixo da região de 280 nm. Esse comprimento de onda está associado a transições eletrônica do tipo  $\pi-\pi$ , característica de compostos como ácidos benzoicos, derivados da anilina e outros correlatos que são encontrados na estrutura das SH. Devido à alta complexidade de sua estrutura, a técnica de espectrofotometria no UV-Visível torna-se limitada, isso porque essa técnica não é capaz de diferenciar os diferentes grupos cromóforos da SH, sendo assim o que é observado é uma sobreposição dos diferentes grupos (STEVENSON, 1982).

Apesar das limitação da técnica Peuravuori e Pihlaja (1997) propuseram, para o estudo da SHA, que razão entre as absorbâncias lidas nos comprimentos de onda de 250 ( $E_2$ ) e 365 ( $E_3$ ) podem ser utilizadas para estimar a aromaticidade das SHA, através da equação I, entretanto seu coeficiente de correlação é  $r = 0,84$  e, devido a isso, pequenas diferenças na aromaticidade podem não ser observadas.

$$\text{Aromaticidade} = 52,509 - 6,780 \cdot E_2/E_3 \quad (\text{I})$$

A Tabela 7 mostra os valores de aromaticidade encontrados para as mostra de SHA do rio Negro.

Tabela 8. Aromaticidade calculada através da equação de Peuravuori e Pihlaja (1997) para as amostras de SHA do rio Negro – AM.

Amostra	Aromaticidade
RN 03/12	27,630
RN 06/12	27,368
RN 09/12	26,714
RN 12/12	28,560

Os quatro meses de coleta não apresentaram uma grande diferença nos valores de aromaticidade, o que reforça a ideia de não haver uma diferença significativa nas estruturas das SHA estudadas. Esses resultados são corroborados ao fazer o comparativo dos valores de integração encontrado nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os deslocamentos químicos da região aromática.

## 5.4 Estudo de disponibilidade de metais das SHA

### 5.4.1 Sistema de Ultrafiltração Tangencial

Na investigação da disponibilidade de metais foi utilizado o sistema de ultrafiltração tangencial e os resultados dos testes feitos com os diferentes tipos de O-ring (anel de vedação) estão apresentados na Figura 13. O branco é o resultado da análise de Fe e Cu antes da adição do O-ring.

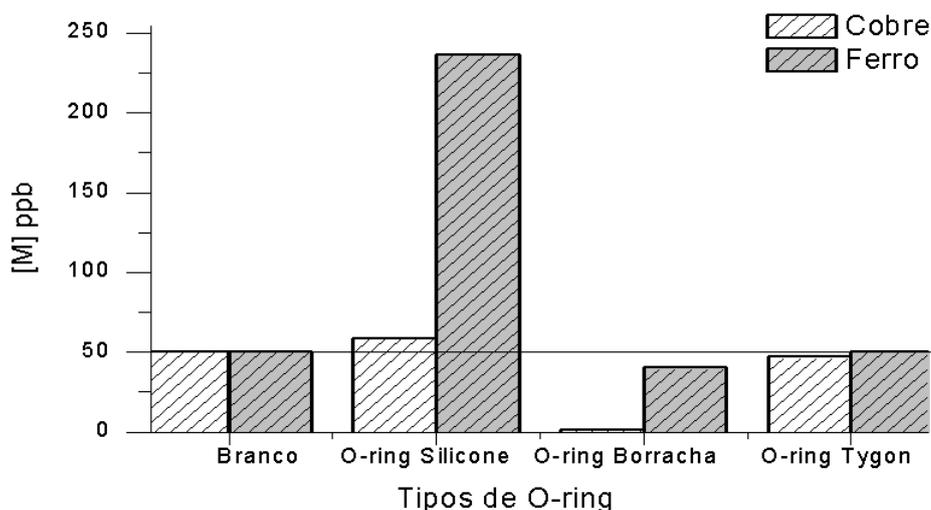


Figura 16. Comparativo da absorção e liberação de metais dos diferentes tipos de O-ring.

Os resultados mostram que dois dos três O-ring testados absorveram e liberaram metais. O O-ring de silicone liberou quantidade significativa de ferro 186,0 ppb e 8,1 ppb de Cu. O O-ring de borracha absorveu Fe e Cu em quantidade significativa (absorção de 49,3 ppb para cobre e 10,2 ppb para ferro). Dentre os três O-ring, o de Tygon® inicialmente seria o O-ring escolhido. Entretanto, com O-ring de Tygon®, não foi possível vedar a célula de ultrafiltração, já que esse foi adaptado de tubos Tygon® e por isso sua junção apresentou vazamentos provocados pela alta pressão interna da célula de ultrafiltração durante o funcionamento do sistema. Para solucionar o problema de vedação foi fabricado um selo de nylon (Figura 9A) com intuito de substituir o O-ring. O selo de nylon foi colocado dentro da célula de ultrafiltração que foi pressionada entre duas chapas de acrílico parafusadas entre si, conforme a Figura 14B.

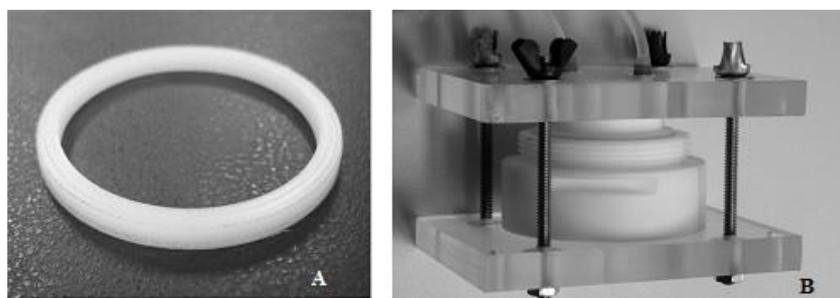


Figura 17. Adaptação do sistema de ultrafiltração. A) Selo de Nylon; B) Chapas de acrílico, parafusadas entre si, para manter o sistema fechado e pressionado.

Escolheu-se o nylon por se tratar de um polímero inerte. Após a adaptação da célula resolveu-se o problema de vazamento, absorção e liberação de metais.

#### **5.4.2 Constantes de troca dos metais por íons de Cu**

A Figura 15 mostra a variação do comportamento de troca dos metais Fe, Al, Zn com os diferentes períodos

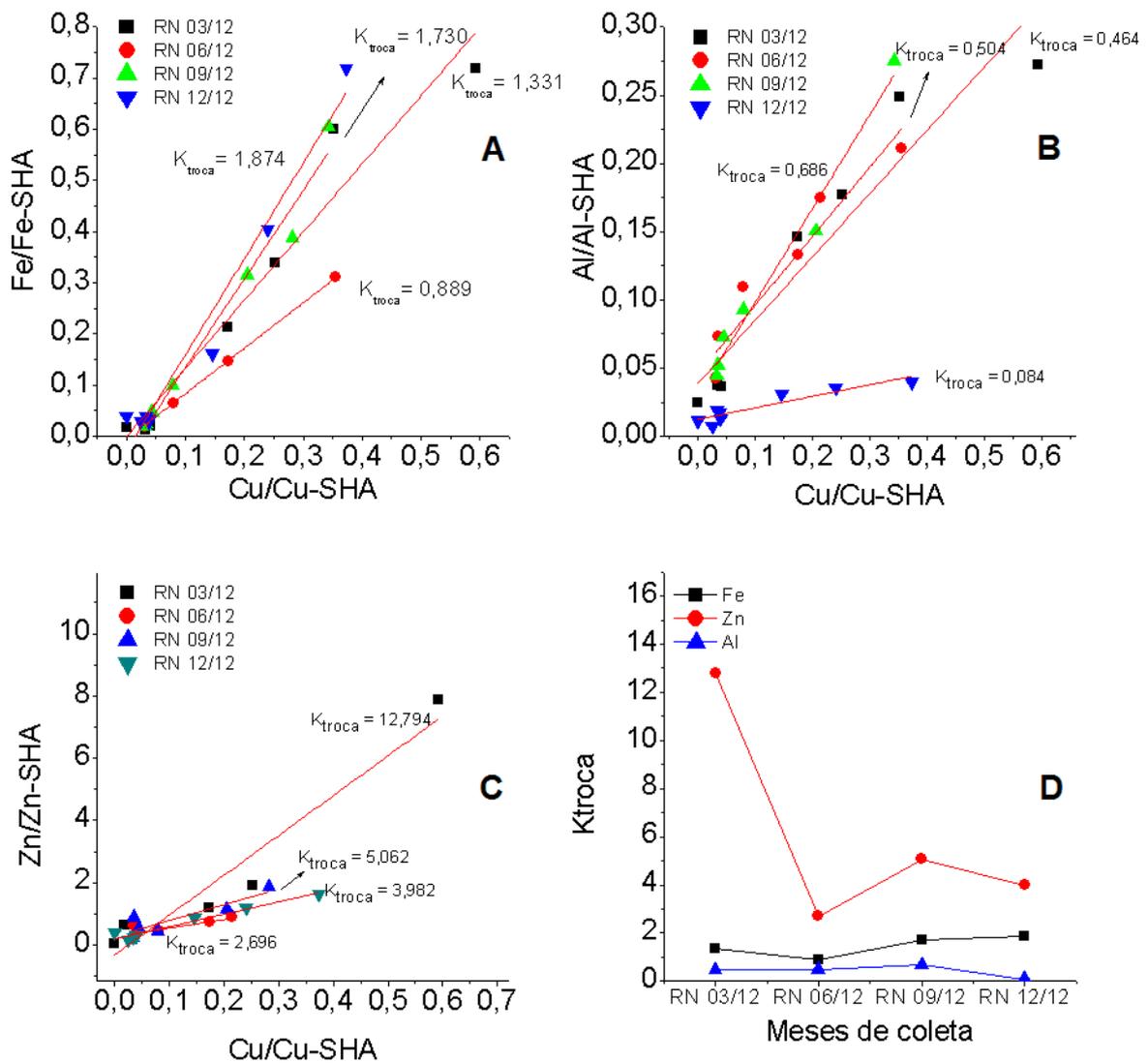


Figura 18. Variação do  $K_{troca}$  dos metais na SHA com adição de  $Cu^{2+}$ . A, B e C mostram a variação de troca dos metais Fe, Al e Zn ao longo do período sazonal do rio Negro e D apresenta o comparativo entre os valores de  $K_{troca}$  dos três metais

Os resultados das constantes de troca dos complexos, apresentados da na Tabela 8 sugerem a seguinte ordem de estabilidade dos metais:  $Al > Cu > Fe >> Zn$ .

Tabela 9. Constantes de troca entre íons Cu (II) e as espécies metálicas das amostras de SHA.

Amostra	K <sub>troca</sub>		
	Fe	Zn	Al
Enchente	1,331	12,795	0,464
Cheia	0,889	2,696	0,505
Vazante	1,730	5,062	0,686
Seca	1,874	3,982	0,084
Média	1,456	6,134	0,435
Desvio	0,442	4,545	0,253

O valor da constante de troca é inversamente proporcional à estabilidade de complexo M-SHA segundo a equação III. Ao determinar as constantes de troca entre íon Cu (II) e os íons de Fe, Al e Zn, originalmente complexados pela SHA, observa-se que as médias das constantes de troca obtidas para os íons de Fe e Zn são maiores que 1, o que significa dizer que os complexos Fe-SHA e Zn-SHA possuem menor estabilidade que os complexos de Cu-SHA. Já a média dos valores de K<sub>troca</sub> para complexo Al-SHA sugere que se trata de complexo mais estável que o complexo Cu-SHA.

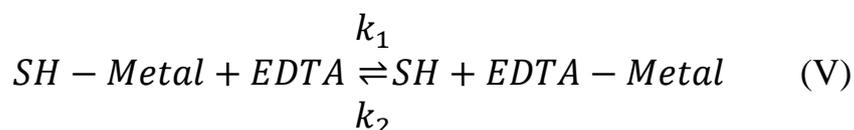
Esses resultados, com exceção os resultados para ferro, estão de acordo com o observado por Burba et al, (2001) quando na caracterização *on-site* de águas naturais foram determinados valores de K<sub>troca</sub> << 1 para os complexos formados entre SHA e espécies metálicas trivalentes.

O valor de K<sub>troca</sub> para Zn da amostra RN 03/12 é cerca de 3 vezes maior que a média dos demais resultados e Al da amostra RN 12/12 apresentou um valor de K<sub>troca</sub> cerca de 7 vezes menor que a média dos demais resultados para Al. As razões para essas diferenças ainda são incertas e requerem um maior número de amostragem para uma melhor avaliação.

Analisando a Figura 10D, não é observado variações expressivas nos valores de K<sub>troca</sub>, dos metais nos diferentes períodos sazonais, exceto no K<sub>troca</sub> de Zn para o mês de março. Portanto não foi possível associar variações das constantes de troca dos metais com os períodos de cheia e vazante do rio Negro, sendo necessário um maior número de repetições dos experimentos em períodos sazonais em anos consecutivos.

### 5.4.3 Troca de metais entre SHA e EDTA

No presente trabalho escolheu-se fazer o estudo cinético de troca dos metais Fe e Al, originalmente complexo pelas SHA para EDTA, utilizando como parâmetro de comparação dos valores  $k_1$  obtidos. Através dos valores de  $k_1$ , é possível comparar as forças que atuam sobre as espécies metálicas SH-Metal, e como essas forças possivelmente variam com o período sazonal. Valores  $k_1$  mais altos significam uma maior velocidade de troca de metais da espécie SHA-Metal para EDTA, sugerindo assim, uma menor interação em a espécie metálica e a SHA. Segundo Bergh (2001) a troca entre as espécies SH-metal para EDTA é regida pela equação V e os valores podem ser obtidos através da equação VI.



$$\ln\left(\frac{1}{(1-x)}\right) = k_1 t \quad (VI)$$

Onde  $x$  é a fração molar da espécie EDTA-Metal em um tempo  $t$  para uma reação de cinética de primeira ordem.

Além disso, é bem conhecido que o EDTA e muitos íons metálicos formam complexos 1:1 com alta estabilidade termodinâmica (ex.  $\log k_1$  para Al (III): 16,1; Fe (III): 24,2 (MANTOURA; DICKSON; RILEY, 1978)), e geralmente várias ordens de grandeza maiores que aquelas para as SH.

A Figura 16 mostra os gráficos de comportamento cinético de primeira ordem para os metais Fe e Al nas diferentes coletas.

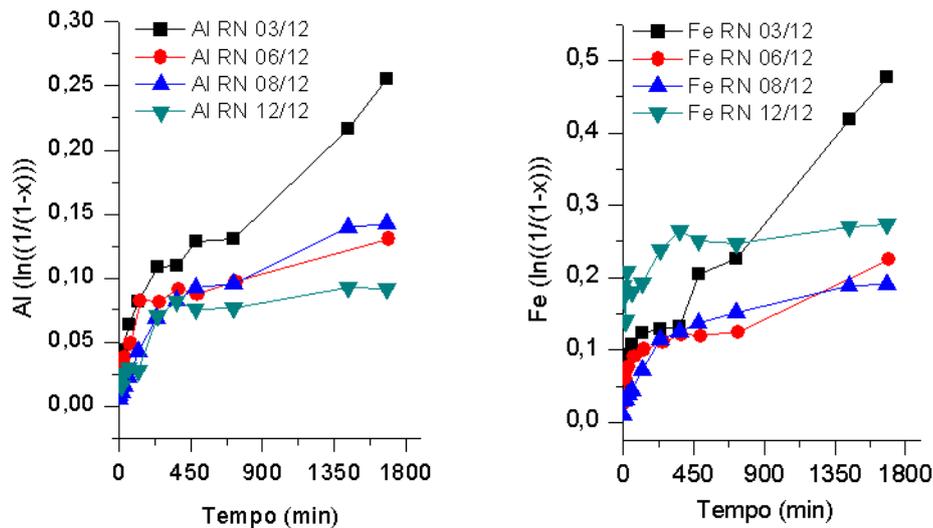


Figura 19. Comportamento cinético para a troca de metais entre as espécies SHA-metal para EDTA (1:1).

Tabela 10. Valores de  $k_1$  obtidos no estudo de troca de metais das amostras de SHA do rio Negro para EDTA.

Amostra	Valores de $k_1$ ( $s^{-1}$ )	
	Fe	Al
Enchente	$2,35 \times 10^{-04}$	$12,2 \times 10^{-05}$
Cheia	$0,93 \times 10^{-04}$	$6,04 \times 10^{-05}$
Vazante	$1,00 \times 10^{-04}$	$8,09 \times 10^{-05}$
Seca	$0,59 \times 10^{-04}$	$4,49 \times 10^{-05}$

O mês de março exibiu a maior disponibilidade de Fe e Al, e o mês de setembro para Fe, apresentando valores cerca de 10 vezes maior em relação aos outros meses de coletas (Tabela 9).

Através dos valores de  $k_1$  é possível sugerir a seguinte variação de troca de Fe da SHA para EDTA, com relação os meses de coleta, em março > setembro >> junho > dezembro; e para Al em março >> setembro > junho > dezembro. As ordens de disponibilidade de metais nas coletas se mantiveram as mesmas para Fe e Al, entretendo, associar essas diferenças de disponibilidade de metais com a sazonalidade, torna-se bem difícil, já que os resultados parecem sugerir não haver uma coerência entre os valores de  $k_1$  e os períodos de maior seca (setembro) e maior cheia (março).

Fazer a correlação entre disponibilidade de espécies metálicas e sazonalidade, através do estudo cinético, mostrou-se tarefa bem complexa e que requer um maior período de coleta e número de repetição dos experimentos.

## 6 CONCLUSÃO

Os espectros de FT-IR não apontaram uma diferença estrutural significativa nos diferentes períodos sazonais estudados. Esses resultados também foram observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , porém a comparação entre os diferentes deslocamentos químicos, nos espectros de RMN é bastante difícil, já que quase sempre é necessário fazer correções de base e fase, dos espectros, manualmente e a presença de metais paramagnéticos nas amostras podem alargar os deslocamentos químicos de maneiras diferentes amostras.

A análise de componente elementar não apresentou uma relação entre os valores obtidos para razão H/C e o período sazonal, embora estudos anteriores mostraram haver uma diferença nessa razão para diferentes períodos

A constante de troca de metais, originalmente complexados pelas SHA, por íons de  $\text{Cu}^{2+}$ , mostraram que os complexos de Fe-SHA e Zn-SHA possuem menor estabilidade que o complexo Cu-SHA, e o complexo Al-SHA maior estabilidade. Os metais estudados apresentaram a seguinte ordem de estabilidade durante todo o período sazonal:  $\text{Al} > \text{Cu} > \text{Fe} > \text{Zn}$  para todo o período amostrado. A variação dos valores de  $K_{\text{troca}}$  para os metais estudados não mostrou relação com o período sazonal, já que as variações não seguem uma tendência com os períodos de seca e cheia.

A troca dos metais Fe e Al, originalmente complexados pelas SHA para EDTA, apresentaram a seguinte ordem de disponibilidade de metais com relação aos meses de coleta: Para Fe; março > setembro >> junho > dezembro; Para Al; março >>> setembro > junho > dezembro. Não foi possível correlacionar esses resultados com o período sazonal, visto que não houve coerência entre os resultados obtidos e os períodos de seca e cheia.

Embora a literatura aponte uma correlação entre sazonalidade e a estrutura das SHA, não foi possível observar essa correlação direta no presente trabalho, dificultando assim, comparar a variação da estrutura das SHA com a disponibilidade de metais, fazendo-se necessário um maior número de repetições dos experimentos em períodos sazonais em anos consecutivos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBT-BRAUN, G.; LANKES, U.; FRIMMEL, F. H. Structural characterization of aquatic humic substances - The need for a multiple method approach. **Aquatic Sciences - Research Across Boundaries**, v. 66, n. 2, p. 151–170, 1 jun. 2004.

ABREU JR., C. H. et al. Métodos analíticos utilizado em química do solo. In: ALLEONI, L. R. F.; MELO, V. DE F. (Eds.). . **Química e Mineralogia do Solo**. 1. ed. Viçosa: SBCS, 2009. p. 539.

AIKEN, G. R. et al. **Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation, and characterization**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1985.

ALLEN, H. E.; HANSEN, D. J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environment Research**, v. 68, n. 1, p. 42–54, 1996.

ARAÚJO, A. B.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C. Distribuição de metais e caracterização das constantes de troca entre espécies metálicas e frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1103–1107, 2002.

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

BATALHA, B.-H. L. Controle da qualidade da água para consumo humano : Bases conceituais e operacionais. **CETESB**, 1998.

BORTIATGNSKI, J. M. No. In: GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A.; CLARK, S. B. (Eds.). . **Humic and fulvic acids: Isolation, Structure, and Environmental**. [s.l.] American Chemical Society, 1996. p. 57–77.

BUFFLE, J. Complexation reactions in aquatic systems; Analytical approach. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 17, n. 2, p. 230–230, 1989.

BUFFLE, J.; LEPPARD, G. G. Characterization of aquatic colloids and macromolecules. 1. Structure and behavior of colloidal material. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n. 9, p. 2169–2175, 1995.

BURBA, P. et al. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species : a concise overview Part 1 . Analytical fractionation by means of sequential-stage ultrafiltration. **Talanta**, v. 45, p. 977–988, 1998.

BURBA, P.; ROCHA, J. C.; KLOCKOW, D. Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances : Investigations by means of an ion exchange-based flow procedure. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 349, p. 800–807, 1994.

BURBA, P.; ROCHA, J. C.; SCHULTE, A. Cellulose TETPA: a chelating collector designed for multielement preconcentration in flow systems. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 346, n. 3, p. 414–419, 1993.

BURBA, P.; SHKINEV, V. M.; SPIVAKOV, B. Y. On-line fractionation and characterization of aquatic humic substances by means of sequential-stage ultrafiltration. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 351, p. 74–82, 1995.

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

BURBA, P.; WILLMER, P. G. Analytical fractionation of labile metals in selected groundwater humic substances by means of chelating ion-exchanger. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 342, n. 1-2, p. 167–171, 1992.

CAMPANELLA, L. et al. Study of humic fractions from water of an Antarctic Lake. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 49–60, 1995.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. **Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. 1. ed. Campos dos Goytacazes: UENF, 2005.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. Microbiologia do solo. **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, v. 360, 1992.

COOK, J. D.; FINCH, C. A. Assessing iron status of a population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, n. 10, p. 2115–2119, 1979.

DAMOUS, N. R. et al. Baseline studies on water and sediments in the copper mining region of Salobo-3A, Carajas - Amazon, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 140–150, 2002.

DE SAUSSURE, P. T. Recherches chimiques sur la végétation Paris. In: ADRIANI, M. J. et al. (Eds.). **Die Mineralische Ernährung der Pflanze / Mineral nutrition of plants**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1958. p. 243–279.

DE SCHAMPHELAERE, K. A. C.; JANSSEN, C. R. Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1115–1122, 2004.

DE WIT, J. C. M. et al. Analysis of ion binding on humic substances and the determination of intrinsic affinity distributions. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 189–207, jan. 1990.

DI TORO, D. M. et al. Background and rationale for the Biotic Ligand Model (BLM) of the acute toxicity of copper. In: DI TORO, D. M. et al. (Eds.). **The Biotic Ligand Model. International Copper Association**. New York: International Copper Association, Ltd, 2000. p. 1–6.

DI TORO, D. M. et al. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 20, n. 10, p. 2383–2396, 2001.

DITTMAR, T.; KOCH, B. P. Thermogenic organic matter dissolved in the abyssal ocean. **Marine Chemistry**, v. 102, n. 3-4, p. 208–217, dez. 2006.

ESTEVEES, V. I.; OTERO, M.; DUARTE, A. C. Comparative characterization of humic substances from the open ocean, estuarine water and fresh water. **Organic Geochemistry**, v. 40, n. 9, p. 942–950, 2009.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Science of The Total Environment**, v. 275, n. 1-3, p. 71–82, jul. 2001.

FAUSTINO, A. S. **Estudos físico-químicos do efluente produzido por fossa séptica biodigestora e o impacto do seu uso no solo**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2007.

FERREIRA, M. M.; FERNANDES, B.; CURI, N. Influência da mineralogia da fração argila nas propriedades físicas de Latossolos da região sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 1, p. 515–524, 1999a.

FERREIRA, M. M.; FERNANDES, B.; CURI, N. Mineralogia da fração argila e estrutura de Latossolos da região sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 507–514, 1999b.

FUKUSHIMA, M. et al. Chromium(III) binding abilities of humic acids. **Analytica Chimica Acta**, v. 317, p. 195–206, 1995.

GHOSH, K.; SCHNITZER, M. A scanning electron microscopic study of effects of adding neutral electrolytes to solutions of humic substances. **Geoderma**, v. 28, n. 1, p. 53–56, jul. 1982.

GOLDBERG, S. Interaction of aluminum and iron oxides and clay minerals and their effect on soil physical properties: A review. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, n. 11-12, p. 1181–1207, 1989.

GOVEIA, D. et al. Caracterização estrutural das substâncias húmicas aquáticas extraídas dos rios Itapanhaú e Ribeira de Iguape. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 753–758, 2011.

GRIFFITH, S. M.; SCHNITZER, M. Analytical Characteristics of Humic and Fulvic Acids Extracted from Tropical Volcanic Soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 39, p. 861, 1975.

GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **The Journal of experimental biology**, v. 205, p. 1179–1188, 2002.

HAYES, M. H. B. Extraction of humic substances from soil. In: AIKEN, G. R. et al. (Eds.). **Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization**. New York: John Wiley & Sons, 1985. v. 21p. 329–362.

HAYES, M. H. B. et al. **Humic Substances II**. Chichester: John Wiley & Sons, 1989.

HORBE, A. M. C. et al. Contribuição à hidroquímica de drenagens no Município de Manaus - AM. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 2, p. 119–124, 2005.

HUFFMAN JR, E. W. D.; STUBER, H. A. Analytical methodology for elemental analysis for humic substances. In: **Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization**. [s.l.: s.n.].

KILDUFF, J.; WEBER JR., W. J. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes. **Environmental Science and Technology**, v. 26, p. 569–577, 1992.

KONONOVA, M. M. **Soil organic matter: Its nature, its role in soil formation and in soil fertility**. 1. ed. New York: [s.n.].

LAURÉN, D. J.; MCDONALD, D. G. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 155, p. 635–644, 1985.

LAYER, G. et al. **Structure and function of enzymes in heme biosynthesis** **Protein Science** Braunschweig, 2010.

LEE, C. M. Assessing the effects of copper in the environmental. In: DI TORO, D. M. et al. (Eds.). . **The Biotic Ligand Model**. New York: International Copper Association, Ltd, 2000. p. 1–6.

LEENHEER, J. A. Origin and nature of humic substances in the waters of the Amazon River Basin. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 3, p. 513–523, 1980.

MANTOURA, R. F. C.; DICKSON, A.; RILEY, J. P. The complexation of metals with humic materials in natural waters. **Estuarine and Coastal Marine Science**, v. 6, n. 4, p. 387–408, abr. 1978.

MARINSKY, J. A.; EPHRAIM, J. A unified physicochemical description of the protonation and metal ion complexation equilibria of natural organic acids (humic and fulvic acids). 1. Analysis of the influence of polyelectrolyte properties on protonation equilibria in ionic media: fundamen. **Environmental science & technology**, v. 20, n. 4, p. 349–354, 1986.

MARQUES, M. **Aplicações do Ferro**. Disponível em: <<http://nautilus.fis.uc.pt/st2.5/index-pt.html>>. Acesso em: 2 jan. 2015.

MATSUO, A. Y. O. **Aspectos Ecofisiológicos e Ecotoxicológicos em espécies da ictiofauna do Rio Negro, Amazônia, com ênfase na regulação iônica**. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2004.

MATSUO, A. Y. O. et al. Physiological action of dissolved organic matter in rainbow trout in the presence and absence of copper: sodium uptake kinetics and unidirectional flux rates in hard and softwater. **Aquatic Toxicology**, v. 70, n. 1, p. 63–81, 18 out. 2004.

MATSUO, A. Y. O.; WOOD, C. M.; VAL, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 351–364, 2005.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. Oxford: Oxford University Press, 1994.

MCGEER, J. C. et al. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 231–243, 2000.

MCGEER, J. C. et al. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 1-2, p. 147–160, set. 2002.

MENEZES, A. C. **Toxicidade do cobre sobre tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) em pH 4 e pH 8.** [s.l.] INPA/UFAM, 2005.

MOPPER, K. et al. Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. **Nature**, v. 353, p. 60–62, 5 set. 1991.

NARIMOTO, K. M. **Técnicas espectroscópicas aplicadas à análise da matéria orgânica do solo em pomares de citros sob adição de lodo de esgoto.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

NIFANT'EVA, T. I. et al. Ultrafiltration and determination of Zn–and Cu–humic substances complexes stability constants. **Talanta**, v. 53, p. 1127–1131, 2001.

NOVOTNY, E. H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solo sob diferentes sistemas de preparo.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2004.

OLIVEIRA, L. C. DE. **Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg ( II ) em função do tamanho molecular.** [s.l.] UNESP, 2007.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. Iron. In: OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYER, L. D. (Eds.). **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirement.** Washington: The National Academies Press, 2006. p. 328–339.

PAQUIN, P. R. et al. The biotic ligand model: A model of the acute toxicity of metals to aquatic life. **Environmental Science & Policy**, v. 3, p. 175–182, 2000.

PAQUIN, P. R. et al. The biotic ligand model: a historical overview. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 1-2, p. 3–35, set. 2002.

PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 337, p. 133–149, 1997.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. **European Journal of Soil Science**, v. 47, n. September, p. 319–328, 1996.

PITOMBO, R. N. M. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. **Ciência e Cultura (SBPC)**, v. 41, n. 5, p. 427–431, 1989.

PLAYLE, R. C.; DIXON, D. G.; BURNISON, K. Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal-gill stability constants and modelling of metal accumulation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 50, p. 2678–2687, 1993a.

PLAYLE, R. C.; DIXON, D. G.; BURNISON, K. Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 50, p. 2667–2676, 1993b.

POPPI, N. R.; TALAMONI, J. Estudo dos ácidos húmico e fúlvico, extraídos de solos, por espectroscopia de infravermelho. **Química Nova**, v. 15, n. 4, p. 281–285, 1992.

RESENDE, M. Aplicações de conhecimentos pedológicos à conservação de solos. **Inf. Agropec.**, v. 11, p. 3–18, 1985.

RICCA, G. et al. Derivatization and structural studies by spectroscopic methods of humic acids from Leonardite. **Geoderma**, v. 98, n. 3-4, p. 115–125, dez. 2000.

RICE, J. A.; LIN, J. S. Fractal nature of humic materials. **Environmental Science & Technology**, v. 27, p. 413–414, 1993.

RICE, J. A.; MACCARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. **Organic Geochemistry**, v. 17, n. 5, p. 635–648, 1991.

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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 3, p. 169–175, 1999.

ROCHA, J. C. et al. Aquatic humus from an unpolluted Brazilian dark-brown stream: general characterization and size fractionation of bound heavy metals. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 2, n. 1, p. 39–44, 2000a.

ROCHA, J. C. et al. Substâncias húmicas sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 410–412, 2000b.

ROCHA, J. C. et al. Reduction of mercury (II) by tropical river humic substances (Rio Negro) — A possible process of the mercury cycle in Brazil. **Talanta**, v. 53, p. 551–559, 2000c.

ROCHA, J. C. et al. Reduction of mercury (II) by tropical river humic substances (Rio Negro) — Part II. Influence of structural features (molecular size, aromaticity, phenolic groups, organically bound sulfur). **Talanta**, v. 61, p. 699–707, 2003.

ROCHA, J. C.; HIRCHE, R. N. Determinação de metais totais e metais solúveis em amostras de água bruta e água tratada de represas de captação da estação de tratamento de água (ETA) de Araraquara-SP. **Eclética Química**, v. 19, p. 105–117, 1994.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas: Interação com espécies metálicas**. 1. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2003.

ROMÃO, L. P.; ROCHA, J. C. Utilização da ultrafiltração em fluxo tangencial na determinação das constantes de troca entre substâncias húmicas e íons Cu (II). **Revista de Fapese de Pesquisa e Extensão**2, v. 2, p. 25–36, 2005.

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

SAMPAIO, A. Q. **Caracterização física e química dos sedimentos na área do Distrito Industrial de Manaus (AM)**. [s.l.] Fundação Universidade do Amazonas, 2000.

SANTANA, G. P. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus - (AM). **Acta Amazonica**, v. 37, p. 111–118, 2007.

SANTOS, L. M. **Dinâmica da matéria orgânica e destino de metais pesados em dois solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

SARGENTINI, E. C. P. **Tratamento alternativo de água, usando extrato de sementes de Moringa oleifera Lam, como clarificante natural de água do Rio Negro, Amazonas**. [s.l.] Universidade do Estado do Amazonas, 2008.

SARGENTINI JR, É. et al. Substâncias húmicas aquáticas: Fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 339–344, 2001.

SCHNITZER, M.; KAHN, S. U. **Humic substances in the environment**. New York: [s.n.].

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Soil organic matter**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Ltd, 1989.

SCHULTEN, H. R. The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 351, n. 1, p. 62–73, 1995.

SENESI, N. et al. Chemical Properties of Metal-Humic Acid Fractions of a Sewage Sludge-Amended Aridisol. **Journal of Environment Quality**, v. 18, n. 2, p. 186–194, 1989.

SENESI, N.; SPOSITO, G.; MARTIN, J. P. Copper(II) and iron(III) complexation by soil humic acids: An IR and ESR study. **Science of The Total Environment**, v. 55, p. 351–362, nov. 1986.

SHUMAN, L. M. Comparison of exchangeable Al, extractable Al, and Al in soil fractions. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 70, n. 3, p. 263–275, 1990.

SILVA, W. T. L. DA et al. **Humidification degree of fermentated urban residues determined by chemical and spectroscopic methods**International meeting of international humic substances society. **Anais...**São Paulo: 2004

SLOBODA, E. et al. Influência das características das substâncias húmicas aquáticas na eficiência da coagulação com o cloreto férrico. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 976–982, 2009.

SOARES-PRADO, A. G. **Estudo da interação de metais em matrizes húmicas. Um proposta ambiental**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 1998.

SOON, Y. K. Fractionation of extractable aluminum in acid soils: A review and a proposed procedure. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 24, n. 13-14, p. 1683–1708, 1993.

SORENSEN, E. M. B. **Metal Poisoning in Fish**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions**. 2. ed. New York: Wiley & Sons, 1982.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: Genesis, composition, reaction**. 2. ed. Canada: John Wiley & Sons, 1994.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters**. 3. ed. New York: Wiley & Sons, 1995.

SWIFT, R. S. Molecular weight, size, shape and charge characteristics of humic substances: Some basic consideration. In: HAYES, M. H. B. et al. (Eds.). . **Humic Substances II**. New York: John Wiley & Sons, 1989. p. 450–465.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: KLUTE, A.; PAGE, A. L. (Eds.). . **Methods of soil analysis: Chemical methods**. Ann Arbor,: American Society of Agronomy, 1996. p. 1011–1069.

THURMAN, E. M. No Title. In: AIKEN, G. R. et al. (Eds.). . **Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 689.

THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. Preparative isolation of aquatic humic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 4, p. 463–466, 1981.

THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. Structural study of humic substances: New approaches and methods. In: CHRISTMAN, R. F.; GJESSING, E. T. (Eds.). . **Aquatic and Terrestrial Humic Materials**. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, 1983. p. 1–23.

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

TROECH, F. R.; HOBBS, J. A.; DONAHUE, R. L. **Soil and water conservation for productivity and environmental protection**. New Jersey: Prentice Hall, 1980.

VAN DEN BERGH, J.; JAKUBOWSKI, B.; BURBA, P. Investigations on the conditional kinetic and thermodynamic stability of aquatic humic substance–metal complexes by means

of EDTA exchange, ultrafiltration and atomic spectrometry. **Talanta**, v. 55, n. 3, p. 587–593, 13 set. 2001.

WERSHAW, R. L. et al. NMR characterization of humic acid fractions from different Philippine soils and sediments. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 31–42, jan. 1990.

WILSON, M. A. No Title. In: HAYES, M. H. B. et al. (Eds.). . **Humic Substances II**. Chichester: John Wiley & Sons, 1989. p. 310–335.

WOOD, C. M. Flux measurements as indices of H<sup>+</sup> and metal effects on freshwater fish. **Aquatic Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 239–263, jun. 1992.

WOOD, C. M. et al. Protection by natural blackwater against disturbances in ion fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingrays endemic to the Rio Negro. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 76, n. 1, p. 12–27, 2003.

YAMAMOTO, M. et al. Evaluation of the binding of iron (II) to humic substances derived from a compost sample by a colorimetric method using ferrozine. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4456–60, jun. 2010.

ZEIDEMANN, V. K. O Rio das Águas Negras. In: OLIVEIRA, A. A. et al. (Eds.). . **Florestas do Rio Negro**. 1. ed. [s.l.] Companhia das Letras, 2001. p. 63–86.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Avaliação da influência de fatores ambientais na estrutura, dinâmica e propriedades ópticas da substâncias húmicas aquáticas do rio Negro**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.