

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

HENRIQUE ALVES DA SILVA

SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS DO RIO NEGRO-AM: IMPACTO  
DA VARIAÇÃO DA SUA COMPOSIÇÃO NA LABILIDADE DE ÍONS  
METÁLICOS E EM SEU EFEITO REDUTOR DE TOXICIDADE AGUDA

MANAUS

2019

HENRIQUE ALVES DA SILVA

SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS DO RIO NEGRO-AM: IMPACTO  
DA VARIAÇÃO DA SUA COMPOSIÇÃO NA LABILIDADE DE ÍONS  
METÁLICOS E EM SEU EFEITO REDUTOR DE TOXICIDADE AGUDA

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

Orientador: Dr. Ézio Sargentini Junior

MANAUS

2019

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586s Silva, Henrique Alves da  
Substâncias húmicas aquáticas do rio Negro - AM: impacto da  
variação da sua composição na labilidade de íons metálicos e em  
seu efeito redutor de toxicidade aguda / Henrique Alves da Silva.  
2019  
93 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Ézio Sargentini Junior  
Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. substância húmica. 2. ácido húmico. 3. artêmia salina. 4.  
complexação de metais. 5. labilidade de metais. I. Sargentini Junior,  
Ézio II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

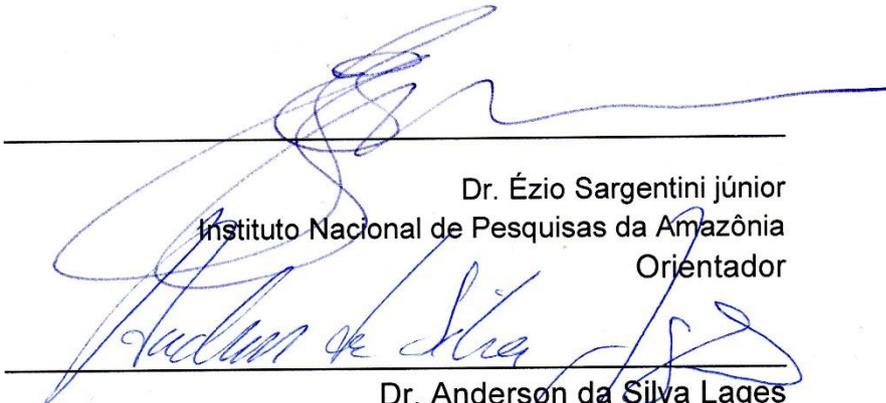
**“SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS DO RIO NEGRO-AM: IMPACTO DA VARIAÇÃO DA SUA COMPOSIÇÃO NA LABILIDADE DE ÍONS METÁLICOS E EM SEU EFEITO REDUTOR DE TOXIDADE AGUDA”**

**Henrique Alves Da Silva**

Tese de Doutorado 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 Doutor(a) em Química.

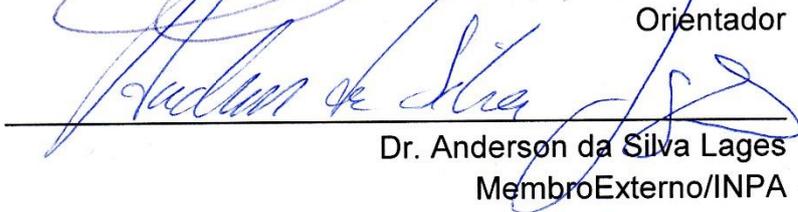
Aprovado, em 30 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA



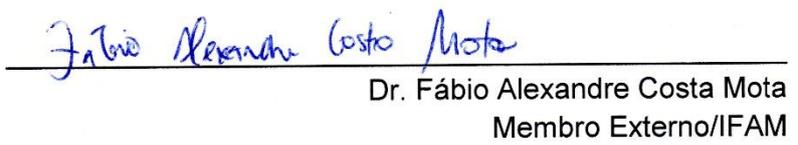
---

Dr. Ézio Sargentini Júnior  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Orientador



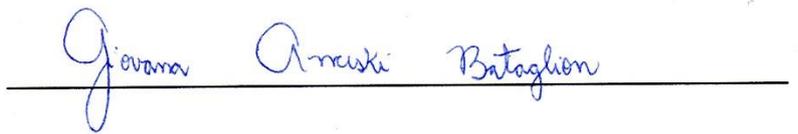
---

Dr. Anderson da Silva Lages  
Membro Externo/INPA



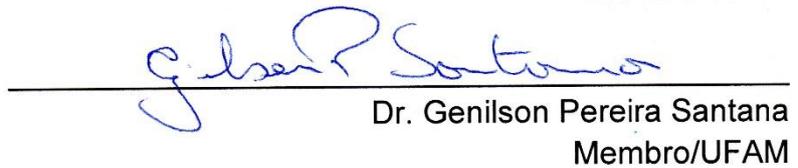
---

Dr. Fábio Alexandre Costa Mota  
Membro Externo/IFAM



---

Dra. Giovana Anceski Bataglion  
Membro/UFAM



---

Dr. Genilson Pereira Santana  
Membro/UFAM

Dedico esse trabalho a minha mãe e pai que, apesar de todas as dificuldades, sempre estiveram ao meu lado sendo o escudo e espada da minha vida.

Agradeço aos amigos do laboratório Dr. Ézio Sargentini Junior pela orientação e valiosa amizade durante todos esses anos e ao MSc. Marcos Alexandre Bolson pelas inestimáveis contribuições no laboratório e as várias risadas.

## RESUMO

Este trabalho tem o objetivo investigar o comportamento de complexação de metais da Substâncias Húmicas Aquáticas (SHA) frente as variações nas proporções das suas frações majoritárias Ácido Húmico (AH) e Ácido Fúlvico (AF), apontando as dificuldades da diferenciação e maneiras de minimizar essas dificuldades. Para tanto, foram caracterizadas amostras de SHA do rio Negro coletadas em agosto de 2016 e nos meses de março, junho, setembro e dezembro de 2012. As caracterizações dos seus componentes químicos foram feitas utilizando das técnicas de Análise Elementar, Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$ , Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, Espectroscopia no Ultravioleta Visível e Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente. Foram feitos estudos de labilidade dos metais Cu, Fe, Al, Mg, Mn e Zn nas diferentes amostras, utilizando o sistema de Ultrafiltração de Fluxo Tangencial (UF-TG) e íons de  $\text{Cu}^{2+}$  como íon trocador. Foi proposto um novo método de cálculo da ordem de labilidade dos diferentes metais. A nova proposta de cálculo foi utilizada nos resultados obtidos pela UF-TG nos estudos com SHA e suas frações AH e AF. Utilizando o método proposto, foi possível diferenciar e ordenar a labilidade dos íons metálicos presentes nas frações AH e AF com a dos íons metálicos presentes na SHA. Também foi estudado a eficiência e o impacto da purificação por diálise em processo de batelada na concentração de íons metálicos originalmente complexados nos extratos de SHA, AH e AF. Os resultados mostraram que sete bateladas de diálise são necessárias para reduzir o excesso de íons Na provenientes da extração da SHA e suas frações, e que íons de K, originalmente complexados na SHA e em suas frações, são perdidos durante o processo de diálise. Esses resultados reforçam a importância da estimativa da perda de íons metálicos durante o processo de purificando, evitando assim, afirmativas errôneas por exemplo em estudos de troca de íons metálicos e de determinação de constantes de estabilidade. A influência do caráter complexante de íons metálicos da SHA e sua frações também foi observada em ensaios de toxicidade aguda de íons cobre em *Artêmia Salina* sp. Nesses ensaios, foi verificado que o aumento da fração AH na estrutura da SHA tende a melhorar o efeito redutor de toxicidade da mesma.

Palavras chave: substâncias húmicas; ácido húmico e fúlvico; *Artêmia Salina*.sp; redução de toxicidade

## ABSTRACT

This aim of this work is to investigate the metal complexation behavior of Aquatic Humic Substances (SHA) against the variations in the proportions of their majority fractions Humic Acid (HA) and Fulvic Acid (FA), pointing out the difficulties of differentiation and ways to minimize these difficulties. Therefore, samples of the Rio Negro SHA collected in August 2016 and in March, June, September and December 2012 were characterized. The characterization of their chemical components was made using the Elemental Analysis techniques,  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Visible Ultraviolet Spectroscopy and Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. Liability studies of Cu, Fe, Al, Mg, Mn and Zn metals in the different samples were made using the Tangential Flow Ultrafiltration (UF-TG) system and  $\text{Cu}^{2+}$  ions as exchanger ion. A new method of calculating the order of lability of the different metals has been suggested. The new calculation proposal was used in the results obtained by UF-TG in studies with SHA and its fractions AH and AF. Using the proposed method, it was possible to differentiate and order the lability of the metal ions present in the AH and AF fractions with that of the metal ions present in the SHA. The efficiency and impact of batch dialysis purification on the concentration of originally complexed metal ions in SHA, AH and AF extracts were also studied. The results showed that seven batches of dialysis are required to reduce excess Na ions from the extraction of SHA and its fractions, and that K ions, originally complexed in SHA and its fractions, are lost during the dialysis process. These results reinforce the importance of estimating the loss of metal ions during the purification process, thus avoiding erroneous statements, for example in studies of metal ion exchange and determination of stability constants. The influence of the complexing character of SHA metal ions and its fractions was also observed in acute copper ion toxicity assays in *Artemia Salina* sp. In these tests, it was found that increasing the AH fraction in the SHA structure tends to improve its toxicity-reducing effect.

Keywords: humic substances; acid humic and fulvic; *Artemia Salina* sp; reduction of toxicity

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 2-1. Estrutura proposta por Schulten (1995) para o ácido húmico.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2-2. Modelo de estrutura para ácidos fúlvicos proposta por Buffle .....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2-3. Ponte de cátion interagindo grupos polares da SH e moléculas de água.. .....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2-4. Esquema de complexação de metais pelo ácido húmico. ....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2-5. Estrutura tridimensional proposta por Shulten &amp; Schnitzer (1995).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2-6. Esquema de complexos de esfera interna considerando forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 2-7. O processo de absorção biológica.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 2-8 Artêmia Salina sp. ....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 4-1. Ponto de amostragem do rio Negro – AM. ....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 4-2. Fluxograma da metodologia aplicada. ....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 4-3. Esquema do procedimento analítico utilizado para estudos de troca entre espécies metálicas originalmente complexadas por íons de <math>Cu^{2+}</math> e EDTA.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 4-4. Adaptação do sistema de ultrafiltração. ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 4-5. Representação esquemática dos aparatos usados para eclosão dos cistos de Artêmia Salina sp.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 5-1. Porcentagem de metais na amostra de água do rio Negro.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 5-2. Espectros de FT-IR das frações AH e AF da amostra SHA do rio Negro.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 5-3. Espectros RMN de <math>^{13}C</math> (75,5 MHz, NaOD) da amostra de SHA do rio Negro e de suas frações AF e AH. ....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 5-4. Redução da concentração de Na durante a diálise da SHA e suas frações AH e AF. ....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 5-5. Redução da concentração de K, Fe, Al, Mn, Mg e Zn durante a diálise da SHA e suas frações AH e AF. ....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 5-6. Complexação dos íons de cobre.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 5-7. Comportamento de troca dos metais a cada etapa de adição exponencial de cobre. ....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 5-10. Gráficos de Ktroca dos íons livres Na, Mg, Mn, Fe, Al e Zn obtidos para a AH após adição linear de cobre. ....</i>	<i>61</i>

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 2-1. Ácidos duros e moles e bases duras e moles.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 4-1. Comprimento de onda utilizados e tipo de visão utilizada. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4-2. Curvas de calibração usadas.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 4-3. Volumes das adições da solução de íons Cu<sup>2+</sup> (1 mg L<sup>-1</sup>) utilizados nos experimentos de troca de metais originalmente complexados em 200 mL de SHA 100 mg L<sup>-1</sup>. .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 5-1. Parâmetros físico-químicos da amostra de água do rio Negro de maio de 2016 em comparação com os valores encontrados por Silva (2015).....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 5-2. Especificação de metais da água do rio Negro-AM (RN 13/06/16) .....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 5-3. Concentração de metais em solução de 100 mg L<sup>-1</sup> da amostra de SHA e das frações AH e AF .....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 5-4. Atribuições dos picos para os espectros de RMN de <sup>13</sup>C da amostra de SHA, AF e AF e as integrações de suas áreas (%)......</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 5-5. Valores de concentração hipotéticos para os íons A, B, C e D utilizados para a construção das curvas de aumento da concentração de íons livre após adição de íons Cu<sup>2+</sup>.64</i>	
<i>Tabela 5-6. Resultados de Ktroca e das integrais obtidos para os métodos de ranqueamento utilizados.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 5-7. Ordem de labilidade dos metais nos diferentes dias.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 5-8. Ordem decrescente de labilidade nos diferentes dias para cada elemento. ....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 5-9. Valores das integrais para os íons metálicos nas diferentes amostras. ....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 5-10. Ordem de labilidade decrescente dos íons metálicos nas diferentes frações. ....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 5-11. Índice de mortalidade nas concentrações de íons cobre testadas. ....</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 5-12 Teste de toxicidade da substância húmica aquática (SHA). ....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 5-13 Redução da toxicidade do íon cobre (19 mg L<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações da substância húmica aquática SHA. ....</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 5-14 Redução da toxicidade do íon cobre (30 mg L<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações da substância húmica aquática (SHA). ....</i>	<i>75</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
2.1	SUBSTÂNCIAS HÚMICAS .....	14
2.2	SUBSTÂNCIA HÚMICA AQUÁTICA .....	16
2.3	ÁCIDO HÚMICO.....	16
2.4	ÁCIDO FÚLVICO.....	19
2.5	COMPLEXAÇÃO PELA SUBSTÂNCIA HÚMICA.....	20
2.6	TEORIA HSAB.....	23
2.7	ESTUDO DE COMPLEXAÇÃO .....	25
2.8	SISTEMA DE ULTRAFILTRAÇÃO .....	27
2.9	INTERAÇÃO DO METAL COM ORGANISMOS VIVOS.....	27
2.10	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA .....	29
2.10.1	<i>ARTÊMIA SALINA SP.</i> .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>31</b>
3.1	GERAL .....	31
3.2	ESPECÍFICO .....	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
4.1	AMOSTRAGEM .....	32
4.2	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA APLICADA .....	32
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	34
4.4	LIMPEZA DA RESINA XAD 8 .....	34
4.5	EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES ÁCIDO HÚMICO E ÁCIDO FÚLVICO.....	34
4.6	PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS HÚMICOS .....	35
4.7	CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA HÚMICA AQUÁTICA .....	35
4.7.1	<i>ANÁLISE DE CARBONO ORGÂNICO DE TOTAL E NITROGÊNIO TOTAL</i> .....	35
4.7.2	<i>ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER</i> .....	36
4.7.3	<i>RMN DE <sup>13</sup>C</i> .....	36

4.7.4	<i>DETERMINAÇÃO DE METAIS</i> .....	36
4.8	<i>ESTUDO DE COMPLEXAÇÃO</i> .....	38
4.8.1	<i>MONTAGEM DO SISTEMA DE ULTRAFILTRAÇÃO DE FLUXO TANGENCIAL DE ESTÁGIO SIMPLES</i> 38	
4.8.2	<i>ESTUDO DE TROCA DOS METAIS POR ÍONS DE <math>Cu^{2+}</math></i> .....	40
4.9	<i>TROCAS DE METAIS ORIGINALMENTE COMPLEXADOS PELA SHA PARA EDTA</i> .....	43
4.10	<i>TESTE DE REDUÇÃO DE TOXICIDADE DE METAIS PELA SHA E SUAS FRAÇÕES</i> .....	43
4.10.1	<i>ECLOSÃO DOS CISTOS DE ARTÊMIA SALINA SP.</i> .....	43
4.10.2	<i>SOLUÇÕES UTILIZADAS NO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA</i> .....	44
4.10.3	<i>EXPERIMENTOS DE TOXICIDADE AGUDA</i> .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
5.1	<i>ANÁLISE DA ÁGUA DO RIO NEGRO</i> .....	47
5.2	<i>CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS LIGANTES DA SHA</i> .....	49
5.2.1	<i>ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER</i> .....	49
5.2.2	<i>ESPECTROS DE RMN DE <math>^{13}C</math></i> .....	50
5.3	<i>ESTUDO DA DISPONIBILIDADE DE METAIS DAS SHA, AH E AF</i> .....	53
5.3.1	<i>CONCENTRAÇÃO DE METAIS DURANTE O PROCESSO DE DIÁLISE</i> .....	53
5.3.2	<i>TROCA DE ÍONS METÁLICOS ORIGINALMENTE COMPLEXOS DE SHA E AS FRAÇÕES AH E AF POR ÍONS DE <math>Cu^{2+}</math></i> .....	56
5.4	<i>MÉTODO DE RANQUEAMENTO DA LABILIDADE DOS ÍONS METÁLICOS POR INTEGRAIS</i> .....	62
5.5	<i>VARIAÇÃO DA LABILIDADE DE ÍONS METÁLICOS APÓS TEMPO DE ADIÇÃO DE ÍONS METÁLICOS À SOLUÇÃO DE SHA.</i> .....	65
5.6	<i>VARIAÇÃO DA LABILIDADE DE ÍONS METÁLICOS NA AMOSTRA DE SHA E SUAS FRAÇÕES.</i>	68
5.6.1	<i>TROCA DE METAIS ENTRE SHA E EDTA</i> .....	69
5.7	<i>EFEITO DA COMPLEXAÇÃO DE ÍONS COBRE PELA SHA E SUAS FRAÇÕES NA REDUÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA</i> .....	72
5.7.1	<i>TOXICIDADE AGUDA DE ÍONS COBRE</i> .....	72
5.7.2	<i>DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA SUBSTÂNCIA HÚMICA AQUÁTICA</i> .....	73
5.7.3	<i>AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ÍON COBRE POR SHA</i> .....	74
5.7.4	<i>AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE ÍON COBRE PELA SHA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEORES DE AH E AF</i> .....	76

<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>82</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas (SH) são o resultante dos processos de degradação animal e vegetal e são encontradas na natureza em diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos (substância húmica aquática) (STEVENSON, 1982; WU et al., 2017). As SH tem grande influência na qualidade do solo, para o plantio e no ambiente aquático, ela está diretamente associada com a labilidade de várias espécies químicas (ROCHA; TOSCANO; CARDOSO, 1997; ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018). Uma de suas principais características é sua capacidade de complexar espécies metálicas, levando até a causar inibição da toxicidade de algumas dessas espécies. Essa inibição pode ser relacionada com os diferentes processos de complexação que a estrutura da SH tem com diferentes espécies metálicas presentes nesses ambientes (WATANABE et al., 2017).

A variação climática e microbiana de uma região pode alterar as características estruturais químicas da SH, levando a obtenção de comportamentos distintos na complexação de metais (FILIP; TESAŘOVÁ, 2004). A variação sazonal de um rio está correlacionada com as mudanças de pluviosidade de uma região ao longo do ano. No começo do período de chuva, os rios sofrem grande aporte de SH, devido à lixiviação do solo, recebendo a parcela de húmus de mais fácil desprendimento, passando a ser chamada de substância húmica aquática (SHA). Conforme o período de chuvas se estende, a parcela de SH de menor desprendimento no solo é lixiviada e aportada no rio. Já no período de seca, o aporte de SH diminui e o húmus no solo se torna cada vez mais antigo e degradado.

Vários trabalhos já se propuseram a estudar como funcionam os mecanismos de complexação de metais pela SH e a sua contribuição na disponibilidade de metais no ambiente. A grande maioria desses trabalhos utiliza para comparação e caracterização da SH parâmetros de labilidade de espécies metálicas originalmente complexadas em suas estruturas (FAKOUR; LIN, 2014; JIANG et al., 2018; MARSAC et al., 2017). Um parâmetro muito utilizado são as constantes de troca ( $K_{troca}$ ) de metais originalmente complexados na SH, esse parâmetro é muito útil para entender de maneira qualitativa a disponibilidade e labilidade de espécies metálicas em amostras de SH. Essas constantes  $K_{troca}$  são obtidas na grande maioria das vezes combinando técnicas de ultrafiltração tangencial (UF-FT) com análises espectrométricas. As diferenças nos valores de  $K_{troca}$  são diretamente influenciadas pela estrutura da SH, que por sua vez tem estrutura diretamente influenciada por diferentes processos de formação do húmus.

Um dos principais problemas no estudo de complexação de metais na SHA está na dificuldade de determinar suas características estruturais e assim entender de forma clara como

funciona seus mecanismos de complexação. Até hoje, ainda não foi possível determinar sua estrutura química com precisão, embora já se conheça quais são os seus principais grupamentos químicos e já existam modelos propostos para sua possível estrutura química.

Nesse trabalho buscou-se determinar se amostras de SHA de diferentes proporções dos seus principais constituintes (ácido húmico e fúlvico) podem ter suas características de complexação alteradas e se são distinguíveis. As possíveis diferenças foram avaliadas através da obtenção e comparação das constantes  $K_{troca}$  e/ou através de valores de integrais obtidos nas curvas de aumento da concentração de alguns íons metálicos livres em soluções de SHA, AH e AF, utilizando as técnicas de UF-FT (Ultrafiltração de Fluxo Tangencial) e análises em ICP-OES (do inglês “*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*”), RMN-C<sup>13</sup> (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13), UV-VIS (Espectroscopia na região do ultravioleta visível) e FTIR ( do inglês “*Fourier Transform Infrared*”).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Substâncias Húmicas

O Húmus é a matéria orgânica presente em turfas, solos e sedimentos em vários estágios de decomposição. Ele pode ser classificado de duas formas, substâncias húmicas e as substâncias não húmicas. Essas classificações estão baseadas na estrutura química das espécies que o compõem. As substâncias não húmicas possuem forma estrutural definida, como por exemplo os aminoácidos, proteínas, carboidratos e ácidos orgânicos. Já as substâncias húmicas (SH) não possuem estrutura química definida e são compostas de uma mistura de compostos orgânicos de alta massa molecular heterogênicos, cuja sua estrutura possui regiões com características alifáticas e regiões com características aromáticas. Devido à grande variedade de formação da matéria orgânica que compõe o húmus, as substâncias húmicas possuem grande variação da composição de sua estrutura. A matéria orgânica que compõe o húmus tem diferentes estágios de decomposição, oriundos da degradação biológica e química de resíduos animais e vegetais (AIKEN et al., 1985; LIPCZYNSKA-KOCHANY, 2018).

Existe uma ampla variedade estrutural para compostos de substâncias húmicas. Isso ocorre devido ao seu processo de formação que é resultado de uma polimerização aleatória de uma variedade de material em decomposição. Além disso, sua estrutura pode variar de acordo com sua fonte. Sua heterogeneidade dificulta muito a sua caracterização conformacional. Em ambientes aquáticos as substâncias húmicas representam cerca de 40-60 % do carbono orgânico dissolvido e no solo 60-70 % do carbono orgânico total (GUO; LIU; WU, 2019; PETERS, 1989).

O termo “*húmus*” (do latim, equivalente ao solo) foi utilizado pela primeira vez por Nicolas Théodore de Saussure em seu trabalho intitulado de *Recherches chimiques sur la végétation*. Ele usou esse termo para descrever o material orgânico de coloração escura originado do solo. Em seu trabalho ele percebeu que o húmus era derivado de resíduos vegetais, sendo rico em carbono, mas pobre em hidrogênio e oxigênio (DE SAUSSURE, 1958).

Em 1786, Franz Karl Achard fez a primeira tentativa de isolar as substâncias húmicas presente no solo. Para isso, ele percolou em turfas solventes alcalinos e obteve uma solução de coloração escura que ao ser acidificada precipitava. O precipitado formado era insolúvel em soluções ácidas e solúvel em soluções alcalinas. Esse material foi então denominado de ácido húmico (AH), sendo essa a definição usada até os dias atuais. Achard em seus estudos também

chegou a conclusão de que a extração desse material a partir de turfas gerava grande quantidade de material e atribuiu isso ao alto estágio de decomposição da matéria orgânica encontrada nas turfas. (STEVENSON, 1994).

Durante a extração, a SH é dividida em três principais frações que são o ácido húmico, ácido fúlvico e a humina. O ácido húmico é definido operacionalmente como a fração da SH solúvel em meio alcalino diluído e que precipita após a acidificação do extrato alcalino, essa fração é insolúvel em valores de pH menores que 2 (POWELL; TOWN, 1992). O ácido fúlvico (AF) é fração que permanece em solução quando o extrato alcalino é acidificado (BARROS; PAULA; REZENDE, 1994; ROCHA; ROSA; FURLAN, 1998). Finalmente, a humina é a fração não extraída por soluções ácidas ou álcalis diluídas e insolúvel em água (MALCOLM, 1990; POPPI; TALAMONI, 1992).

As substâncias húmicas tem aplicações na agricultura, em áreas ambientais e industriais (MANZAK; KURŞUN; YILDIZ, 2017). A principal aplicação da substância húmica no meio ambiente está associada à sua afinidade com metais tóxicos, substâncias químicas orgânicas de origem antropogênica e outros contaminantes da água. Dentre os metais complexados pela substância húmica estão o ferro, níquel, mercúrio, cádmio e cobre na água. Existem filtros que são desenvolvidos usando como base o húmus para o tratamento de esgoto em muitas aplicações (PEÑA-MÉNDEZ; HAVEL; PATOČKA, 2005).

As substâncias húmicas normalmente tem como maior fração o ácido húmico e que geralmente contém partes hidrofílicas e hidrofóbicas, além de também muitos grupos funcionais reativos (ex.  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$  e  $-\text{OH}$ ) (COMBE et al., 1999). Devido à presença de grupos carboxílicos e fenólicos a SHA tem predominância de cargas negativas em soluções aquosas em condições ambientais normais (MAGHSOODLOO et al., 2011). Em baixos valores de pH os prótons dos diferentes grupos funcionais estão dificilmente dissociados da SH, enquanto em altos valores de pH os grupos funcionais são desprotonados, tornando a estrutura química da SH mais negativa. Os grupos ativos livres de prótons também possuem uma alta reatividade a metais, referindo-se a eles com sítios ligantes. Os sítios de ligação do ácido húmico podem mudar devido à protonação/desprotonação dos grupos funcionais em diferentes valores de pH, o que leva a mecanismos de coagulação distintos entre um coagulante e a SH (JIN et al., 2018).

## 2.2 Substância Húmica Aquática

A SHA é definida de maneira operacional (THURMAN; MALCOLM, 1981), ela é a matéria orgânica amorfa, não específica, constituída de carbono orgânico dissolvido em pH 2 que fica adsorvida em coluna de resina XAD-8, não iônica, e possui elevados valores de coeficiente de distribuição. Essa definição é baseada em métodos de extração cromatográficos. Segundo THURMAN & MALCOLM (1981) e SENESI (1989) na água a SHA representa entre um terço a metade de todo carbono orgânico dissolvido (COD), tendo em sua composição química estruturas principalmente de caráter ácido hidrofóbicas. A faixa de concentração em que elas podem ser encontradas varia entre  $20 \mu \text{L}^{-1}$  em águas subterrâneas à  $30 \text{mg L}^{-1}$  em águas superficiais (SUFFET; MACCARTHY, 1988). Fatores como o tipo de resina utilizada para extração da SHA, bem como quantidade de amostra e tipo de eluente utilizado definem que tipo de fração será extraída do carbono orgânico dissolvido. A variação desses fatores, conseqüentemente, torna os diferentes extratos produzidos de SHA quase incomparáveis.

Nos sistemas aquáticos a matéria orgânica pode ser classificada entre dissolvida e particulada. Essa classificação é feita de maneira operacional, considerando o carbono orgânico dissolvido com a fração da matéria orgânica dissolvida capaz de passar em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  (DANIELSSON, 1982). O carbono orgânico dissolvido pode ser fracionado em hidrofóbico e hidrofílico e as substâncias húmicas aquáticas representam cerca de 50 % da fração hidrofílica da matéria orgânica dissolvida, como proposto por Leenher e Noyes e citado por Frimmel (1992).

De modo geral, a concentração de substâncias húmicas em meio aquático é baixa e por isso é requerido grande volume de água para obter quantidades satisfatórias de material húmico (THURMAN; MALCOLM, 1981). Malcolm (1990) conseguiu obter cerca de 100 mg de ácido húmico purificado a partir da percolagem de 35 mil litros de água do mar em resina XAD 8. Já em rios as concentrações de SHA e suas frações são maiores quando comparadas à aquelas encontradas na água do mar (HAYES, 1985). Numerosos métodos de extração, concentração e fracionamento de SHA são citados e avaliados na literatura (AIKEN et al., 1985; BURBA; SHKINEV; SPIVAKOV, 1995; SWIFT, 1996).

## 2.3 Ácido Húmico

Os ácidos húmicos podem ser definidos como uma associação de moléculas de estrutura predominantemente hidrofóbica, com grupamentos polimetilênicos, ácidos graxos e

compostos de esteroides, que se encontram estabilizadas em pH natural por forças dispersivas hidrofóbicas (Van der Wall,  $\pi$ - $\pi$ , e interações CH- $\pi$ ). Sua conformação estrutural cresce progressivamente de tamanho à medida que as ligações de hidrogênio intramoleculares aumentam, esse aumento é causado por baixos valores de pH que podem levar o material húmico a flocular em pH menor que 2 (PICCOLO, 2002).

Os ácidos húmicos tem o papel positivo em relação a sua atividade no solo, isso acontece porque os ácidos húmicos liberam vagarosamente nutrientes para as plantas, além de ter a capacidade de trocar cátions, diminuir o caráter alcalino do solo, ter capacidade de retenção de água e possuir interação com íons metálicos e moléculas orgânicas xenobióticas (DAS et al., 2015; GIANNOULI et al., 2009). Pesquisas recentes utilizam o ácido húmico como substância “verde” base para síntese do grafeno através de carbonização associada a processos de oxidação-esfoliação-redução térmica. A produção do grafeno usando ácido húmico poder ser um caminho eficiente para reduzir o custo de produção de nanofolhas de grafeno em aplicações no campo energético (XING et al., 2017)

Em pH abaixo de 2, os ácidos húmicos são insolúveis, mas são solúveis e extraíveis em solução alcalina (DOSKOČIL et al., 2018). Sua solubilidade alcalina é devido à grande presença de grupos carboxílicos e hidroxílicos fenólicos, que contabilizam cerca de 20 % da sua massa molecular (MANZAK; KURŞUN; YILDIZ, 2017). Eles podem ser extraídos do solo, de turfas, lignito, hulha (carvão betuminoso) oxidada, e até mesmo de materiais artificiais obtidos em laboratório (ARAUJO et al., 2014; DIZMAN; TUTAR, 2015).

Durante o processo de desinfecção para obtenção de água potável, o ácido húmico pode produzir subprodutos carcinogênico através a reação com cloro. Em água naturais, ele pode apresentar-se em uma concentração abaixo de 10-15 mg L<sup>-1</sup>. Para remover o ácido húmico da água podem ser usados processos de adsorção, membranas de separação, coagulação entre outros (JARVIS; MAJEWSKI, 2013)

A composição elementar do ácido húmico é de aproximadamente 30 -60 % de carbono, 30-50 % de oxigênio, 4-5 % de hidrogênio, 1-4 % nitrogênio, 1-2 % enxofre e 0-0,3 % de fósforo. O ácido húmico tem sua estrutura composta principalmente por grupos carboxílicos, hidroxílicos e estruturas aromáticas. Os principais grupos funcionais presentes no ácido húmico são hidroxílicos fenólicos, hidroxílicos alcoólicos, ácidos carboxílicos, hidroxila, ácido sulfônico, amino, quinona e grupos metoxílico. O tamanho molecular da macromolécula de ácido húmico está na faixa de tamanho e estruturas colidais e o tamanho sofre grande alteração com a variação do pH do meio (ALVAREZ-PUEBLA; GARRIDO, 2005; BAHEMMAT; FARAHBAKHSH; KIANIRAD, 2016; GAFFNEY; MARLEY; CLARK, 1996). Esses grupos

podem ser vistos na estrutura hipotética para a macro molécula de ácido húmico proposta por Schulten (1995) (Figura 2-1).

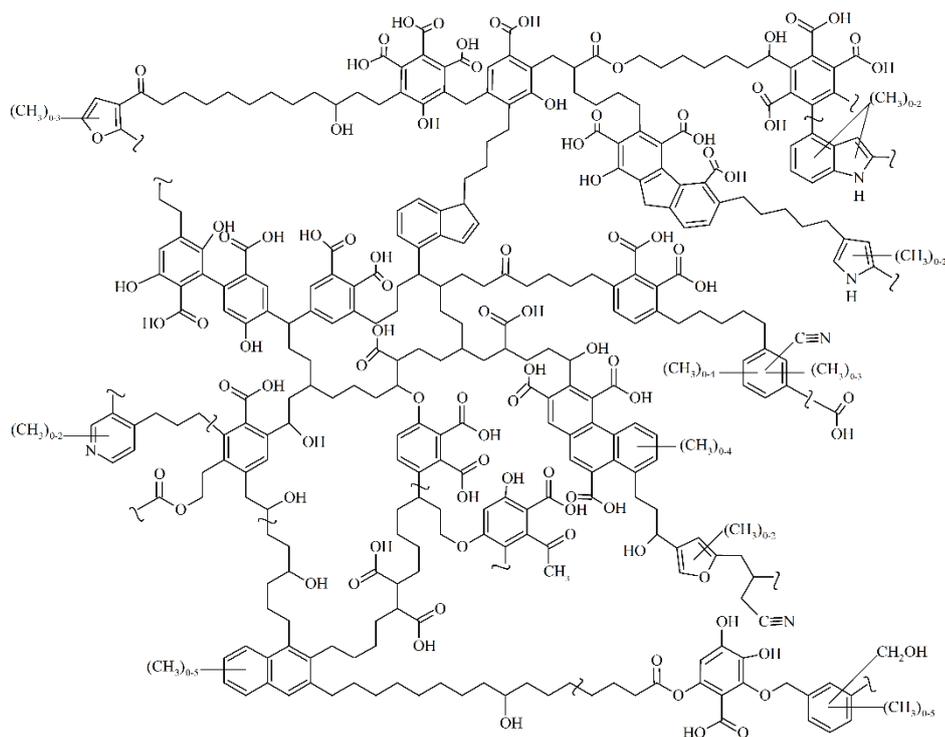


Figura 2-1. Estrutura proposta por Schulten (1995) para o ácido húmico.

O ácido húmico tem majoritariamente carga negativa em solução, isso devido à presença de grupos funcionais carboxílicos e grupos fenóis. Ele pode ser pensando como um agrupamento de moléculas que possuem massa molecular parecida. Devido às fortes interações entre grupos polares dos ácidos fúlvicos e húmicos, o processo de separação dessas espécies é difícil. Não há trabalhos na literatura que comprovem a total separação entre essas duas frações (PEÑA-MÉNDEZ; HAVEL; PATOČKA, 2005)

Além da capacidade de complexação de metais, e conseqüentemente a redução de toxicidade dos mesmos, o ácido húmico também pode reduzir a toxicidade de alguns fármacos. Kim et al. (2016) em seu trabalho mostrou haver uma redução significativa da disponibilidade de fármacos como tetraciclina, 4-octilfenol, e redução de seus efeitos tóxicos em algas. Ding et al (2018) mostrou em seu trabalho que o ácido húmico reduz significativamente a toxidade, acumulação e absorção biológica do triclosano na espécie de alga de água doce *Cymbella* sp. da família de diatomácea. O triclosano é um agente bacteriostático e é um dos mais frequentemente contaminantes detectados em estudos ambientais aquáticos (DURÁN-ÁLVAREZ et al., 2015).

## 2.4 Ácido Fúlvico

Segundo Piccolo (2002) o ácido fúlvico é uma associação de pequenas moléculas hidrofílicas que tem relativamente baixa massa molecular e que tem uma quantidade de grupos funcionais ácidos suficientes para manter agrupamentos de ácido fúlvicos dissolvidos em qualquer faixa de pH. Assim como o ácido húmico, o ácido fúlvico pode possuir, em sua estrutura, grupos funcionais como carboxila, fenol, hidroxila, amino e quinonas (AIKEN et al., 1985; STEVENSON, 1994; TANG et al., 2014)

Apesar de se encontrar em maior proporção na estrutura da substâncias húmicas e de conter relativamente mais grupos funcionais que o ácido húmico (Figura 2-2), o ácido fúlvico tem suas característica de interação/complexação com íons metálicos pouco estudadas, quando comparadas a grande variedades de estudos a respeito do ácido húmico (GÜNGÖR; BEKBÖLET, 2010; YANG et al., 2018)

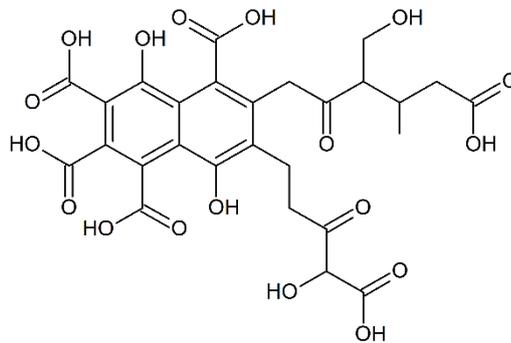


Figura 2-2. Modelo de estrutura para ácidos fúlvicos proposta por Buffle (conforme Stevenson, 1994)

A maior parte da massa molecular das substâncias húmicas (>90% m/m) pode ser classificada como ácido fúlvico, que possui baixa massa molecular e elevadas habilidades redox quando comparado com o ácido húmico (RITCHIE; PERDUE, 2003).

A composição elementar do ácido fúlvico é de aproximadamente 52,4-55,8 % de carbono, 31,4-36,7 % de oxigênio, 5,5-5,8 % de hidrogênio, 1,0- 1,7 % de nitrogênio, 1 % de enxofre (KUMADA, 1987; LI; WU, 2013; LI et al., 2017; PLÁCIDO; CAPAREDA, 2015; XU et al., 2018; ZHANG et al., 2015). O ácido fúlvico possui grande atividade biológica e tem aplicações nos campos da aquicultura e da indústria (WANG et al., 2015). Ele também possui mais grupos funcionais que contém oxigênio do que as demais frações das substância húmica (STEVENSON, 1994; ZHANG et al., 2011). Além disso, muito estudos vêm mostrando que o ácido fúlvico forma pequenos filmes na membrana mucosa no trato gastrointestinal, dessa forma promovendo uma proteção contra infecções e toxinas (TRCKOVA et al., 2005). Van

Rensburg (2001) mostrou em seu trabalho que o ácido húmico pode apresentar propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas.

## 2.5 Complexação pela Substância Húmica

A estrutura aproximada da substância húmica se baseia no conceito de que compostos anfifílicos relativamente pequenos estão ligados, formando um associação supramolecular, basicamente ligada por interações *non-bonder*, como interações de hidrogênio, atração coulombiana, forças de Van der Waals e interações entre ligações  $\pi$ - $\pi$  (AQUINO et al., 2014; PICCOLO, 2001, 2002; WERSHAW, 1999). A Figura 2-3 representa pontes de cátions e interações com moléculas de água ligando de maneira cruzada grupamentos desconectados da SH, através da interação de grupos contendo cargas negativas e/ou grupos multifuncionais. Os ácidos húmicos apresentam 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 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 2-4) (SOARES-PRADO, 1998).

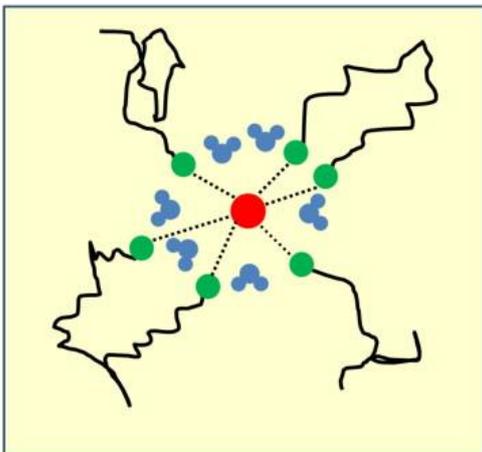


Figura 2-3. Ponte de cátion interagindo grupos polares da SH e moléculas de água. Adaptado de Aquino et al., 2014.

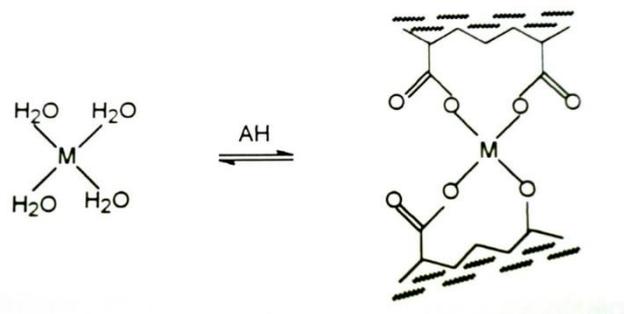
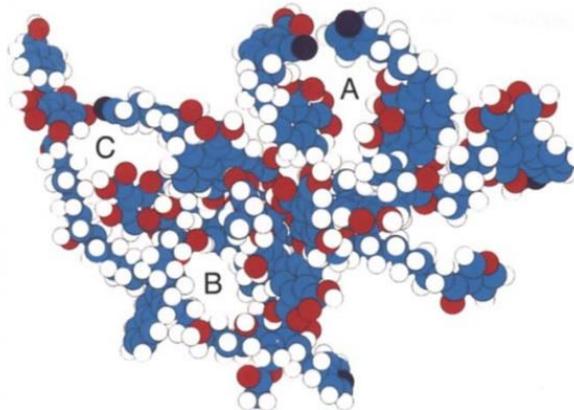


Figura 2-4. Esquema de complexação de metais pelo ácido húmico (adaptado de SANDRO, 1998).

Na substância húmica muitos grupos podem se ligar em um cátion isoladamente, levando ao aparecimento do efeito de quelatação ou pode haver o aparecimento de pontes de cátion entre diferentes grupos orgânicos da SH. Essas formas de interação dos íons com SH

fazem com que existam um ampla variedades de complexos SH-íon, com constantes de complexação aparente dependentes de diversos fatores como pH, força iônica, diferença na concentração das espécies envolvidas na razão íon/S<sub>H</sub> (por exemplo carregamento de íons metálicos) além da competição com outros cátions como Ca e Mg (MARSAC et al., 2017). Muitos trabalhos têm se esforçado para determinar, termodinamicamente, constantes complexação para espécies metálicas, com o objetivo de fornecer dados mais exatos para modelagem do comportamento de espécies metálicas em condições ambientais. Entretanto, devido à complexidade da substância húmica, essas determinações são muito difíceis e não há um consenso entre as diferentes aproximações propostas, o que gera resultados diferentes, assim dificultando ainda mais a determinação do comportamento de complexação da SH.

Shulten e Schnitzer (1995) propuseram em seu trabalho uma estrutura tridimensional para o ácido húmico (Figura 2-5) onde é possível destacar os espaços vazios na estrutura do ácido húmico capazes de complexar estruturas como aminoácidos, carboidratos e/ou moléculas que podem apresentar atividade hormonal. O preenchimento desses espaços pode alterar a dinâmica de complexação de íons metálicos.



**Figura 2-5. Estrutura tridimensional proposta por Shulten & Schnitzer (1995). A, B, C são espaços vazios que podem ser preenchidos por amino ácidos e carboidratos. As cores dos elementos são: Carbono=Azul; Hidrogênio=branco; Nitrogênio=preto; e Oxigênio=vermelho.**

Metais complexados podem não estar somente em sua forma dissociada, sendo possivelmente adsorvido nos espaços vazios da macromolécula húmica através das forças de Van der Waals e interações de hidrogênio como mostrado na Figura 2-6.

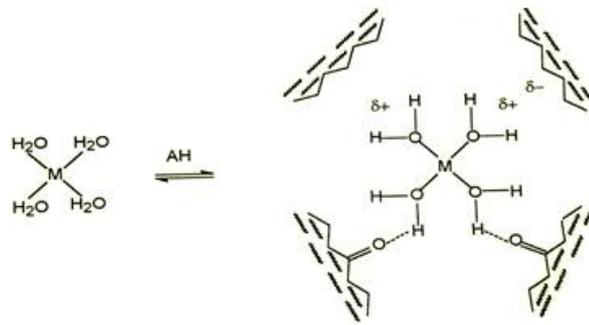


Figura 2-6. Esquema de complexos de esfera interna considerando forças de Van der Walls e ligações de hidrogênio (adaptado de Rocha & Rosa (2003) ).

Agentes de complexação sintéticos possuem grande capacidade de complexar metais potencialmente tóxicos que se encontram como poluentes em meio aquoso e terrestre, porém esses agentes podem causar uma série de problemas ambientais e isso limita seu uso (KULIKOWSKA et al., 2015). Os biossurfactantes, por exemplo ramnolipídeos de origem microbiana, o ácido tânico e a saponina são uma alternativa mais atrativa na remoção de metais pesado do ambiente, isso porque são consideradas substâncias mais apropriados para remoção de metais (GUSIATIN, 2014; MULLIGAN, 2009). Entretanto, essas substâncias têm alto custo, o que inibe o seu uso em larga escala. Todos esses fatores aumentam a busca por biossurfactantes mais baratos, economicamente viáveis e verde. Nesse sentido, devido à sua característica química, as substâncias húmicas aparecem como uma alternativa, já que apresentam boa propriedade como trocadora de íons e surfactante. Essa propriedades são atribuídas à SH por ela possuir uma estrutura química anfifílica, com componentes hidrofílicos e hidrofóbico (MONTONERI et al., 2009).

Para conhecer o feito 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 haver 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 como eles afetam a biodisponibilidade de metais é 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 no meio (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 potencialmente tóxicos pela SHA também facilita o sequestro destes pelas plantas por vários mecanismos (metais essenciais), previne a precipitação e acumulação desses íons no corpo sedimentado, e influenciam na eficiência da remoção de metais potencialmente tóxicos no tratamento de água.

## 2.6 Teoria HSAB

A teoria HSAB (do inglês: “*Hard and Soft Acid and Bases*”) foi proposta de Ralph G. Pearson 1973 para classificar e esclarecer tendências de reações de várias espécies químicas segundo suas características ácidas e básicas de acordo com a teoria de Lewis. Segundo a teoria HSAB, complexos formados entre íons metálicos e seus ligantes tem sua estabilidade correlacionada com a natureza das espécies químicas envolvida no complexo. Dessa forma a teoria HSAB propõe uma classificação das espécies químicas, que participam de reação de complexação, em ácidos duros e moles (ex. cátions metálicos) e bases duras e moles (ex. ligantes orgânicos).

Nessa teoria os cátions são ácidos Lewis e os ligantes são bases de Lewis. O termo “mole” e “duro” está relacionado com facilidade ou dificuldade que uma espécie química tem de ter sua nuvem eletrônica deformada ou polarizada. Uma espécie química considerada “mole” tem como principal característica a facilidade de deformação de sua nuvem eletrônica, favorecendo com isso interações do tipo covalente. Já uma espécie química considerada “dura” possui nuvem eletrônica mais “rígida”, ou seja, essa nuvem sofre nenhuma ou quase nenhuma deformidade e por isso são pouco polarizáveis, tendo elétrons menos moveis e com isso favorecendo interações do tipo “iônica”. Na teoria HSAB, os cátions metálicos são classificados com metais duros (ácidos duros) e têm preferência em ligarem-se com base duras (ligantes), e metais moles (ácidos moles) têm preferência em ligarem-se em bases moles (ligantes) (LANGMUIR, 1997). A Tabela 2-1 mostra a classificação de diversas espécies químicas segundo a teoria de HSAB.

Tabela 2-1. Ácidos duros e moles e bases duras e moles

Ácidos duros	$Al^{3+}$ , $Ba^{2+}$ , $Be^{2+}$ , $Co^{3+}$ , $Cr^{3+}$ , $Fe^{3+}$ , $Mn^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $U^{4+}$ , $UO_2^{2+}$ , $VO^{2+}$
Ácidos intermediários	$Co^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Zn^{2+}$
Ácidos moles	$Ag^+$ , $Cd^{2+}$ , $Cu^+$ , $Hg^{2+}$ , $CH_3Hg^+$ , $Tl^{3+}$ , $Tl^+$
Bases duras	$F^-$ , $H_2O$ , Oxiânion, $OH^-$ , $SO_4^{2-}$ , $CO_3^{2-}$ , $HCO_3^-$ , $C_2O_4^{2-}$ , $CrO_4^{2-}$ , $MoO_4^{2-}$ , $H_nAsO_4^{n-3}$ , $SeO_4^{2-}$ , $H_2VO_4^-$ , $NH_3$ , $RNH_2$ , $N_2H_4$ , $ROH$ , $RO^-$ , $R_2O$ , $CH_3COO^-$ , etc.
Bases intermediárias	$Cl^-$ , $Br^-$ , $NO_2^-$ , $SO_3^{2-}$ , $H_nAsO_3^{n-3}$ , $C_6H_5NH_2$ , $C_5H_5N$ , $N_3^-$ , $N_2$
Bases moles	$I^-$ , $HS^-$ , $S^{2-}$ , $CN^-$ , $SCN^-$ , $Se^{2-}$ , $S_2O_3^{2-}$ , $-SH$ , $-SCH_3$ , $-NH_2$ , $R^-$ , $C_2H_4$ , $C_6H_6$ , $RNC$ , $CO$ , $R_3P$ , $(RO)_3P$ , $R_3As$ , $R_2S$ , $RSH$ , $RS^-$

“R” é referente a moléculas orgânicas

Fonte: Adaptado de Langmuir (1997); Huheey et al. (2006)

Quando ácidos duros estão interagindo com bases moles, esses formam ligações menos estáveis quando comparadas ao par ácido duro base dura, da mesma forma, ácidos moles formam ligações menos estáveis quando comparadas ao par ácido mole-base mole.

Esses conceitos podem ajudar entender e prever de maneira qualitativa a maior ou menor toxicidade de uma espécie metálica em um determinado meio. Por exemplo, metais duros são menos tóxicos ligados a bases duras porque a interação metal ligante é forte, deixando o metal menos disponível. A força de interação entre cátions metálicos e ligantes moles ou substratos orgânicos (que podem ser considerados com ligantes moles) decresce respectivamente dos metais moles, metais de dureza intermediária e metais duros, seguindo tipicamente a ordem de força de interação  $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} \gg Na^+$  (PICKERING, 1986). Essa teoria serve para ajudarem a prever a labilidade de íons metálicos em um determinado meio, mas não deve ser usada de maneira definitiva, uma vez que não é levado em consideração outros parâmetros para complexação de íons metálicos como pH, força iônica e a estabilidade termodinâmica de um complexo (EPA, 2007).

A teoria de HSAB pode ser utilizada para prever a maior ou menor interação da SH com uma dada espécie iônica. Pode ser usada por exemplo para entender a forte interação entre a SH e espécies como  $Hg^{2+}$  e o metilmercúrio ( $CH_3Hg^+$ ) (HESTERBERG et al., 2001; YOON

et al., 2005). Essas duas espécies tem grande afinidade com a matéria orgânica tanto em ambientes aquáticos quanto no solo. As altas constantes de complexação e a baixa troca de íons é uma característica da ligação entre as substâncias húmicas e íons  $\text{Hg}^{2+}$  (LÖVGREN; SJÖBERG, 1989; WALLSCHLÄGER; DESAI; WILKEN, 1996). As altas constantes de complexação entre  $\text{Hg}^{2+}$  e a substância húmica podem ser associadas a presença, na estrutura da SH, de ligantes que contenham enxofre como os Tióis, que têm forte afinidade por íons  $\text{Hg}^{2+}$  (SKYLLBERG et al., 2000). A afinidade entre os íons  $\text{Hg}^{2+}$  e a substância húmica pode ser prevista pela teoria HSAB, já que ácidos Lewis “moles” como os íons  $\text{Hg}^{2+}$  formam ligações estáveis com bases de Lewis “moles” como os grupos tióis presentes na estrutura da SH (EPA, 2007; PEARSON, 1967). As ligações entre os íons  $\text{Hg}^{2+}$  e grupos sulfurados da SH foram evidenciada por Xia et al. (1999) que em seu trabalho utilizou a técnica de EXAFS (do inglês: “*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*”) para mostrar a ligação entre os íons de  $\text{Hg}^{2+}$  e os ligantes sulfurados da SH. Para o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , YOON et al. (2005) sugeriu, baseado na teoria HSAB, o seguinte potencial decrescente de ligação do  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  com os sítios de ligação das substâncias húmicas: tióis (-SH), polissulfetos de hidrogênio (-SSH ou -SSSH), sulfeto (-S-), dissulfeto (-SS-), grupo carboxílico (-COOH) e grupo amina (-NH<sub>2</sub>).

## 2.7 Estudo de Complexação

Quando um metal chega no ambiente aquático natural, por exemplo através da ação antropogênica, sua toxicidade pode ser reduzida pela matéria orgânica presente nesses ambientes. Essa redução é devido à presença de ligantes metálicos no meio como a SHA. A fração da matéria orgânica dissolvida, com massa molecular de 1 kDa à 10 kDa tem maior afinidade por 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., 2000a). Uma grande quantidade de fatores afetam a estabilidade dos complexos de 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, por exemplo o DTAP (do inglês “*Diethylenetriaminepentaacetic acid*”), EDTA (do inglês “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”) e  $\text{Cu}^{2+}$ , 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 à sua característica polifuncional, 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, consideram-se os ligantes do complexo 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 soluções 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 diretamente ligada à 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, é utilizada 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 do complexo EDTA-metal troca são utilizados para fazer a caracterização operacional da estabilidade cinética e da disponibilidade das espécies metálicas do complexo SH-metal (VAN DEN BERGH; JAKUBOWSKI; BURBA, 2001).

## 2.8 Sistema de ultrafiltração

Uma das metodologias mais citadas na literatura para extração e concentração da matéria orgânica 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 variada (ASTER; BURBA; BROEKAERT, 1996; BURBA; SHKINEV; SPIVAKOV, 1995; ROCHA et al., 1999, 2000a). 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 estágio 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 a diminuição dos efeitos de entupimento e/ou polarização das membranas, 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).

As informações cinéticas e termodinâmicas fornecidas pela utilização do sistema de ultrafiltração tangencial podem ser utilizadas para caracterizar as espécies metálicas ligadas na matéria orgânica, através da avaliação de reações de troca de ligante e/ou íons metálicos originalmente ligados à ela (BURBA; VAN DEN BERGH; KLOCKOW, 2001).

## 2.9 Interação do metal com organismos vivos

Quando um metal aporta em um ambiente aquático, várias situações, as quais afetarão o destino e transporte deste metal, podem ocorrer. Dentre elas estão a precipitação/dissolução, redução/oxidação, absorção/dessorção e a complexação (STUMM; MORGAN, 1995). Assim, para se compreender o comportamento de metais potencialmente tóxicos no ambiente é necessário ter em mãos metodologias para o estudo de cada um dos processos citados. Adicionalmente, para se acessar a toxicidade de um dado metal potencialmente tóxico, é necessária a caracterização das várias espécies químicas desse metal presentes no sistema aquático. Atualmente, nos Estados Unidos, os padrões de qualidade ambiental estabelecidos são baseados na concentração da fração iônica dissolvida das espécies metálicas. Porém, sabe-se que a toxicidade e a biodisponibilidade são influenciadas pela presença de agentes complexantes, ou quelantes em solução (ALLEN; HANSEN, 1996).

A presença da substância húmica pode alterar os processos de adsorção biológica (*biouptake*), já que metais complexados não penetram na parede celular ou na membrana celular tão facilmente quanto se estivessem livres (DING et al., 2018; HUE; CRADDOCK; ADAMS, 1986). Esses processos são uma variedade de *key fluxes*. A Figura 2-7 mostra os diferentes processos envolvidos na adsorção biológica. Os *key fluxes* são uma espécie de corrente ou de cadeia de processos bioquímicos que são conceitos usados para descrever o movimento de calor ou massa elementar, incluindo íons metálicos. No primeiro momento, os íons metálicos precisam se deslocar do seio da solução (nesse contexto definida como a região mais afastada do organismo) para a área da solução mais próxima da superfície do organismo, ou seja, acontece um processo de difusão. Durante o deslocamento na solução, os íons metálicos podem se tornar parte de uma molécula maior. Os íons podem também se separar de grandes moléculas nesse tempo. A formação e quebra dessas moléculas estão associadas à processos de complexação. Após isso, um íon metálico é ligado em algum sítio de ligação especial nas membranas celulares de um organismo, essa etapa é a etapa de adsorção. Por fim, o íon metálico é transportado para um sítio de ligação dentro da célula, essa etapa do processo é chamada de internalização (WORMS et al., 2006).

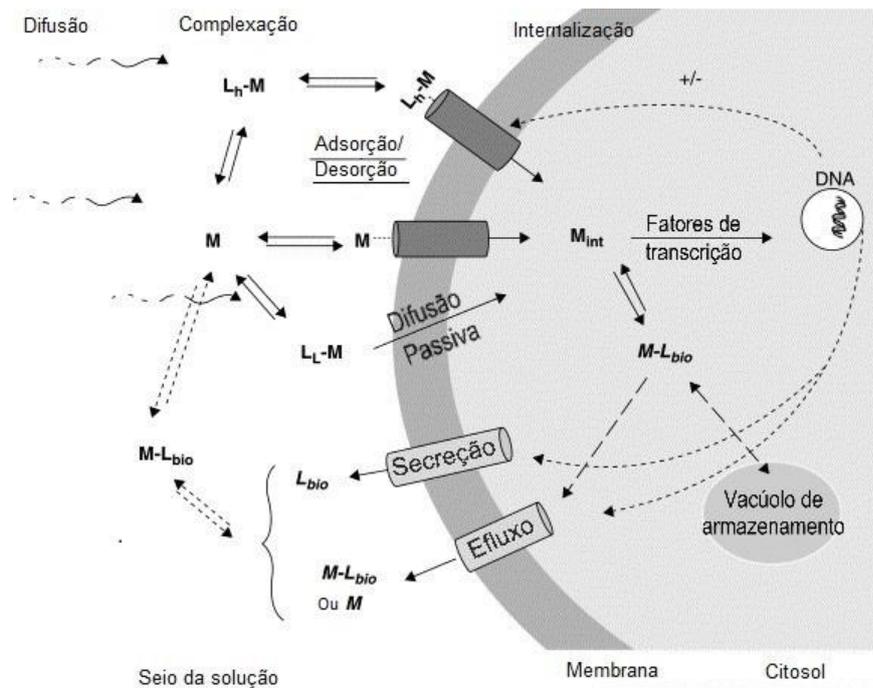


Figura 2-7. O processo de absorção biológica. Adaptado de WORMS et al., 2006

## 2.10 Ensaio de toxicidade aguda

Ensaio de letalidade permitem a avaliação da toxicidade geral de substâncias químicas e, portanto, são considerados essenciais como bioensaios preliminares em estudos de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al., 2000). Utilizando um teste simples com Artêmias, descrito em 1981 por Vanhaecke, pode ser encontrada a concentração letal de diversos compostos químicos para um organismo-teste. As Artêmias ou camarão marinho (nome popular) são pequenos crustáceos da ordem Anostraca, único gênero da família *Artemidae*, com aproximadamente 11 espécies e possui alta resistência a condições adversas, podendo viver em águas com alta salinidade. Na literatura não há ensaios de toxicidade aguda utilizando *Artêmia Salina* sp. para as SHA

Entende-se por toxicidade qualquer efeito adverso manifestado por um organismo-teste quando em presença de uma determinada espécie química, que pode incluir desde alterações genéticas, imobilidade, deformidades até letalidade (PIMENTEL et al., 2012). Em testes de toxicidade são estudadas as relações de diferentes doses de uma espécie química e seus efeitos em um organismo-teste. Inicialmente os testes avaliam o efeito de diferentes concentrações na sobrevivência dos organismos em estudo e posteriormente os efeitos da exposição à concentrações sub-letais (RANTIN; BOIJINK; RANTIN, 2013).

Os resultados dos testes de toxicidade não têm caráter absoluto no que diz respeito ao risco que uma substância representa aos seres humanos, isso porque a extrapolação dos resultados fornecidos pelo teste são de difícil extrapolação para os seres humanos e até mesmo difícil correlação com resultados de toxicidade obtidos por testes que utilizam organismos de espécies diferentes (COSTA et al., 2008).

Toxicidade aguda é aquela em que os efeitos tóxicos são produzidos por uma única ou por múltiplas exposições à uma substância, por qualquer via e por um curto período de tempo, sendo que as mesmas manifestações ocorrem em um breve período. Esses testes são muito eficazes na avaliação da toxicidade de diversas espécie químicas (BORGES, 2009).

### 2.10.1 *Artêmia Salina* sp.

*Artêmia Salina* sp. Leach (*Anostraceae*), Figura 2-8, é um microcrustáceo marinho conhecido como camarão, de ampla distribuição geográfica, caracterizado pela sua tolerância à larga escala de salinidade (5-250 g L<sup>-1</sup>) e temperatura (6-35 °C), com ciclo de vida curto e elevada adaptabilidade às circunstâncias ambientais adversas. Apresenta alta fecundidade,

estratégia de reprodução bissexual/partenogênica, com produção de larvas ou cistos (MOREIRA et al., 2013).



**Figura 2-8** *Artêmia Salina* sp. Fonte: DUMITRASCU, 2011.

Todos esses fatores favorecem a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral. (NASCIMENLO et al., 2008). Esse microcrustáceo é amplamente usado para testes de toxicidade devido à disponibilidade comercial de ovos latentes (cistos), que são encontrados com facilidade. As larvas incubadas pelos cistos são utilizadas em todo o mundo em aquicultura e em aquariologia, como alimento vivo para peixes juvenis (ARCANJO et al., 2012).

A forma mais comum e disponível das *Artêmia Salina* sp. é em forma de cistos que eclodem como minúsculas larvas e são de baixo custo, facilmente adquiridas em lojas de aquaristas, permanecendo viáveis por anos quando estocadas em condições secas. Os cistos são colocados pré-hidratados em solução salina e então se inicia a embriogênese. O ensaio é considerado eficiente para a determinação de toxicidade aguda e de fácil execução, podendo ser realizado sem a necessidade de equipamentos especiais (MOREIRA et al., 2013).

## 3 OBJETIVO

### 3.1 Geral

Estudar o impacto da variação das frações de Ácido Húmico e Ácido Fúlvico no comportamento de complexação de metais pelas Substância Húmica Aquática do rio Negro-AM, fazendo a determinação e ranqueamento da labilidade de metais livres e estudando o efeito redutor de toxicidade aguda de íons  $\text{Cu}^{2+}$  promovido pela substância húmica aquática.

### 3.2 Específico

- Coletar amostra de água para obtenção da SHA e suas frações;
- Determinar a perda de metais originalmente complexados durante o processo de purificação por diálise na SHA e suas frações;
- Caracterizar a amostra de SHA e suas fração pela técnica de infravermelho e RMN de  $^{13}\text{C}$ ;
- Fazer os estudos de disponibilidade de metais utilizando o sistema de ultrafiltração tangencial;
- Fazer ensaios de redução da toxicidade aguda de íons cobre provocadas pela presença da SHA e de suas frações AH e AF.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Amostragem

O ponto de coleta da amostra situa-se entre as confluências das bacias do Tarumã e Tarumã mirim (Figura 4-1), aproximadamente 20 Km da cidade de Manaus. A amostra de água do rio Negro foi coletada dia 18 de agosto de 2016. Foram coletados 260 L de água, armazenando-os em garrações de plástico e acidificando-os com HCl até o pH 2. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente. Também foram utilizadas quatro amostras de SHA cedidas pelo Laboratório de Química Analítica Ambiental, cada uma correspondente respectivamente aos períodos hidrológicos de Enchente, Cheia, Vazante e Seca do rio Negro do ano de 2012. Todas as amostras foram coletadas no mesmo ponto (S 3°04'13.74" e W 60°08'26.92").



Figura 4-1. Ponto de amostragem do rio Negro – AM (S 3°04'13.74" e W 60°08'26.92"). Fonte: Google Earth.

### 4.2 Fluxograma da metodologia aplicada

A Figura 4-2 mostra o fluxograma da metodologia aplicada. Após a coleta das amostras e obtenção de seus parâmetros físico-químicos no momento da coleta, foram utilizadas técnicas para verificar as características estruturais das amostras de SHA e suas frações AH e AF e foram feitos estudos de complexação nas amostras de SHA, AH e AF utilizando íons de

$\text{Cu}^{2+}$ . Na caracterização estrutural utilizou-se as seguintes técnicas: análise de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT); análise elementar de carbono e nitrogênio; ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ); espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FT-IR) e determinação de metais utilizando a técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Para o estudo de complexação da SHA e de suas frações AH e AF com íon de cobre utilizou-se as seguintes técnicas: troca de metais originalmente complexados pela SHA por íons de  $\text{Cu}^{2+}$  e deslocamento de metais originalmente complexados pela SHA para EDTA. Em todos os estudos de complexação foi utilizado do sistema de ultrafiltração de fluxo tangencial (UF-FT) em estágio simples.

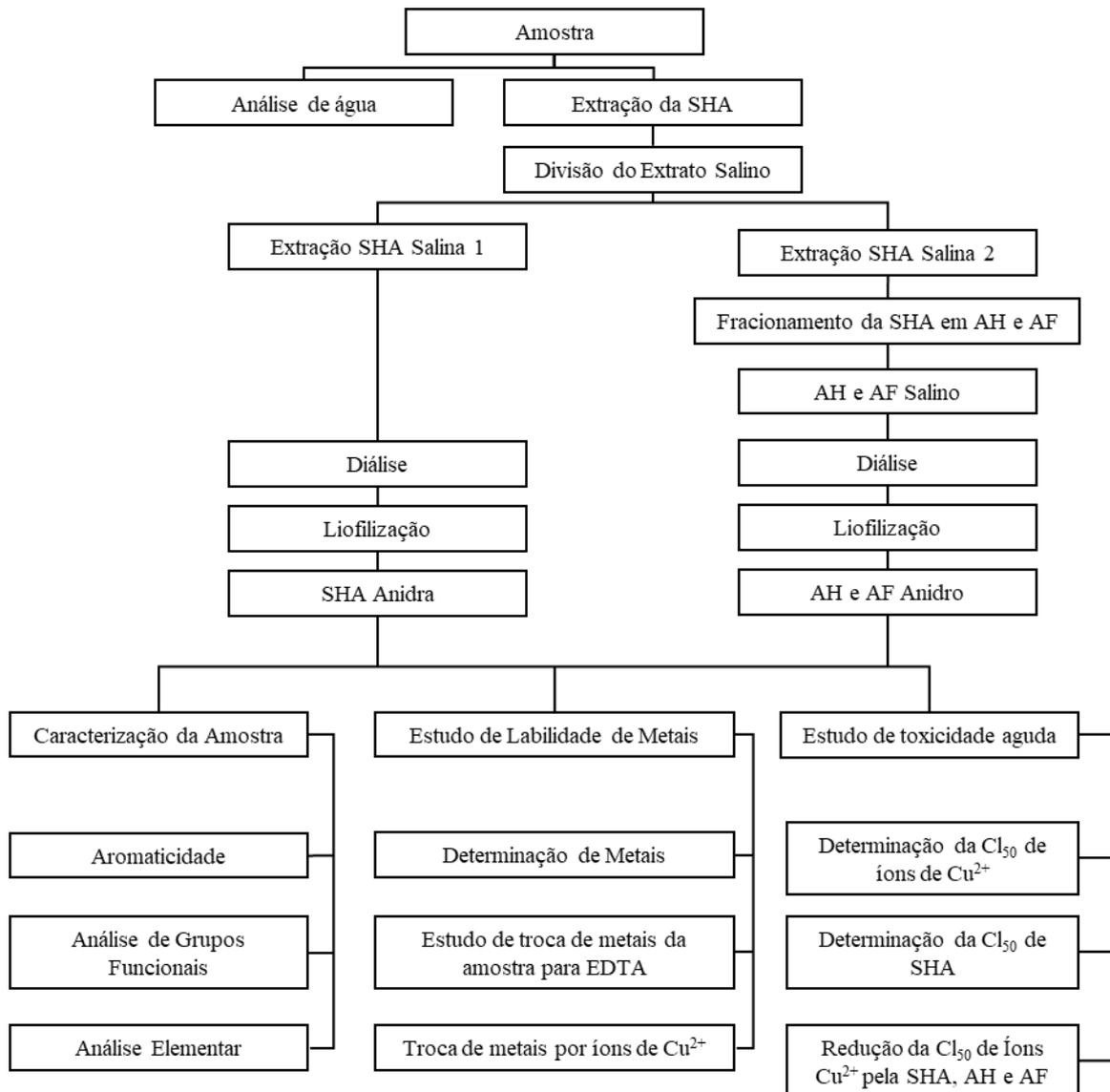


Figura 4-2. Fluxograma da metodologia aplicada.

### 4.3 Caracterização físico-química das amostras de água

Para caracterização físico-química das amostras, foram registrados no momento da coleta dados de temperatura, condutividade elétrica e pH utilizando equipamento HANNA INSTRUMENTS modelo pH/EC Waterproof, e dados de cor obtidos no medidor de cor ALFAKIT modelo MICROPROCESSADO.

### 4.4 Limpeza da resina XAD 8

A resina macroporosa XAD 8 utilizada para a extração da SHA foi previamente purificada 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 o método de Thurman & Malcolm (1981) recomendado a *International Humic Substances Society* (HAYES, 1985; IHSS, 2018; MCDONALD et al., 2004).

### 4.5 Extração das substâncias húmicas e separação das frações ácido húmico e ácido fúlvico

Para extração, foi utilizado o procedimento recomendado pela IHSS (MCDONALD et al., 2004; SWIFT, 1996). As amostras de água foram filtradas inicialmente por um sistema de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo Whatman 42, em seguida o filtrado foi novamente filtrado usando filtro de acetato de celulose Whatman com porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$ , utilizando um kitassato e bomba de vácuo. Feito isso, o novo filtrado foi acidificado com solução de ácido clorídrico  $6,0 \text{ mol L}^{-1}$  até pH 3,0. No método de extração original, após as etapas de filtração, o pH é ajustado para 2, entretanto, para o presente trabalho o pH foi regulado para 3 devido à grande formação de corpo de fundo observada ao ajustar o pH do filtrado para 2. A formação de corpo fundo em pH 2 pode estar associada à grande concentração de COD encontrado no rio Negro-AM.

Após os processos de filtragem, o filtrado em  $0,45 \mu\text{m}$  foi percolado 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  $3 \text{ mL min}^{-1}$ . Após saturação, verificada pelo escurecimento da resina, foram percoladas sucessivamente 100 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 da SHA retida pela resina com vazão de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Após cada eluição, foi percolado 100 mL de ácido

clorídrico pela resina e o processo de extração repetido. O extrato salino de SHA foi dividido em duas porções. A primeira porção foi separada para posterior purificação da SHA e liofilização. Já a segunda porção foi acidificada com HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> até pH menor que 2 para precipitação do ácido húmico e o sobrenadante (ácido fúlvico) foi separado. As duas frações já separadas, foram submetidas aos mesmos procedimentos de purificação e liofilização utilizados para a SHA.

## **4.6 Purificação dos extratos húmicos**

Antes de fazer as caracterizações da substância húmica aquática e de suas frações, fez-se diálise para remoção do excesso de sais dissolvidos. As membranas de diálise (Spectrapor 10 mm x 50 cm *wet cellulose, cutoff 2 kDa*) 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 mol L<sup>-1</sup>, as membranas foram lavadas com água deionizada (65 °C) e estocadas em refrigerador.

Os extratos húmicos foram purificados por diálise, utilizando a membrana de diálise previamente preparada contra água deionizada, em processo de batelada até condutividade constante da amostra. Cada batelada do processo de diálise consiste na troca osmótica de íons, através da membrana de diálise, de 1 litro do extrato húmico salino para 10 litros de água deionizada, por um período de 24 horas

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 armazenado em frascos de vidro âmbar e acondicionados em freezer.

## **4.7 Caracterização da substância húmica aquática**

### **4.7.1 Análise de carbono orgânico de total e nitrogênio total**

As análises de COT foram feitas em analisador de carbono orgânico total, modelo TOC-VCPH, marca SHIMADZU. As análises de NT foram feitas no mesmo equipamento utilizando unidade para análise de nitrogênio total modelo TNM-1 SHIMADZU.

#### 4.7.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As análises de infravermelho foram feitas em um espectrômetro com transformada de Fourier, marca BOMEM, modelo MB-102. Para a análises foram feitas pastilhas de material húmico liofilizado na proporção de 1-100 (1 mg de amostra e 100 mg de KBr). Foram feitas 16 varreduras com  $2\text{ cm}^{-1}$  de resolução e espectros obtidos na região de 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.7.3 RMN de $^{13}\text{C}$

Nos espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  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  $0,5\text{ mol L}^{-1}$ ; tempo de aquisição 0,20 s; tempo total de 62 h; *sweep width* de 24414 Hz; e resolução de 3 k, onde k é um parâmetro experimental que representa o melhor nível para a obtenção do espectro de RMN.

#### 4.7.4 Determinação de metais

Para determinação de metais nas amostras de água, SHA, AH e AF foi feita a abertura de amostra em forno de micro-ondas CEM, modelo MARS 230/60, utilizando procedimento EPA 3015, recomendado para amostras de água e extratos, e posterior análise de metais usando a técnica de ICP-OES em equipamento THERMO SCIENTIFIC modelo iCAP 7600 Duo, acoplado a um nebulizador ultrassônico CETAC modelo U5000AF<sup>+</sup>. Ao total foram terminados 19 elementos Na, K, Mg, Cu, Pb, Cd, Se, Cr, Ag, Mn, Zn, Ni, Co, V, Sb, Fe, Al, Ca, Ba utilizando os comprimentos de onda descritos na Tabela 4-1.

Tabela 4-1. Comprimento de onda utilizados e tipo de visão utilizada.

Elemento	Comprimento de onda	Leitura
Na	589,592	Radial
K	769,896	Radial
Mg	280,270	Radial
Cu	224,700	Axial
Pb	220,353	Axial
Cd	214,438	Axial
Se	203,985	Axial
Cr	267,716	Axial
Ag	338,289	Axial

Continua

Elemento	Comprimento de onda	Leitura
Mn	257,610	Axial
Zn	206,200	Axial
Ni	231, 604	Axial
Co	228,616	Axial
V	292,402	Axial
Sb	206,833	Axial
Fe	259,940	Radial
Al	396,152	Radial
Ca	393,366	Radial
Ba	455,403	Radial

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados usando as equações seguintes:

$$LD = 3,3 * s/b \quad (1)$$

$$LQ = 10 * s/b \quad (2)$$

Onde  $s$  é o desvio padrão da resposta do branco após 7 repetições da análise e  $b$  representa o coeficiente angular de curva de calibração.

Na tabela Tabela 4-2 mostra as concentrações dos padrões nas curvas de calibração, coeficientes de correção, limites de detecção e limites de quantificação usados.

Tabela 4-2. Curvas de calibração usadas

Elemento	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	RQ	LD	LQ
	ppb								ppb	ppb	
Na	100	200	500	1000	3000	10000	20000	30000	0,99967	10,173	34,030
K	100	200	500	1000	3000	10000	20000	30000	0,99990	13,549	54,528
Mg	100	200	500	1000	3000	10000	20000	30000	0,99480	0,087	0,379
Cu	5	10	25	50	150	500	1000	1500	0,99976	0,457	1,580
Pb	0,6*	1,2	3	6	18	60	120	180	0,99987	0,423	0,7816*
Cd	1	2	5	10	30	100	200	300	0,99945	0,085	0,313
Se	1	2	5	10	30	100	200	300	0,99882	0,268	0,995
Cr	2	4	10	20	60	200	400	600	0,99945	0,092	0,346
Ag	2	4	10	20	60	200	400	600	0,99983	0,206	0,736
Mn	3	6	12	30	90	300	600	900	0,99912	0,029	0,099
Zn	4	8	20	40	120	400	800	1200	0,99942	0,247	0,911
Ni	8	16	40	80	240	800	1600	2400	0,99829	0,816	2,860

Continua

Elemento	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	RQ	LD	LQ
	ppb								ppb	ppb	
Co	10	20	50	100	300	1000	2000	3000	0,99947	0,074	0,275
V	10	20	50	100	300	1000	2000	3000	0,99944	0,090	0,325
Sb	12	24	60	120	360	1200	2400	3600	0,99944	0,917	3,277
Fe	20	40	100	200	600	2000	4000	6000	0,99976	0,955	3,195
Al	40	80	200	400	1200	4000	8000	12000	0,99997	1,216	4,060
Ca	100	200	500	1000	3000	N/A	N/A	N/A	0,99980	0,075	0,253
Ba	40	80	200	400	1200	4000	8000	12000	0,99994	0,074	0,248

RD (R Quadrado)

LD (Limite de Detecção)

LQ (Limite de Quantificação)

N/A (Não Analisada)

\* (Padrão eliminado da curva por ser maior que LQ)

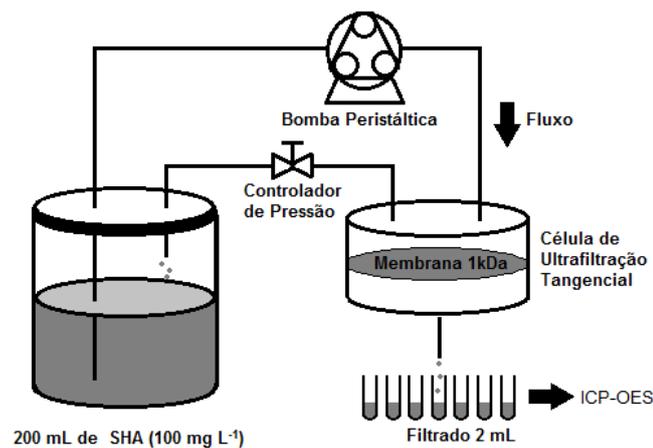
## 4.8 Estudo de complexação

### 4.8.1 Montagem do sistema de Ultrafiltração de Fluxo Tangencial de estágio simples

Este experimento consiste na separação por filtração em membrana de polietersulfona de 1 kDa MILLIPORE, espécies metálicas livres e complexadas. As SHA apresentam tamanhos moleculares superiores à 1 kDa e por isso seus complexos ficam retidos na membrana, enquanto que os íons metálicos são filtrados. Nesse experimento, a concentração do metal livre é igual à concentração determinada no filtrado e o metal complexado será obtido por diferença da concentração total. Esse 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 Na, K, Mg, Cu, Pb, Cd, Ag, Mn, Zn, Ni, Co, Fe, Al, Ca, originalmente complexados na estrutura da SHA e na estrutura de suas frações isoladas (AH e AF), foram feitos dois tipos de experimento. O primeiro experimento utilizou íons de  $\text{Cu}^{2+}$  como íon de troca. Os íons de  $\text{Cu}^{2+}$  foram complexados pela estrutura SHA e/ou suas frações AH e AF e então, logo após sua complexação, os íons de  $\text{Cu}^{2+}$  competem pelos sítios de ligações da SHA e/ou sítios das frações AH e AF que já possuíam íons metálicos originalmente complexados, isso porque a ligação entre a SHA e/ou suas frações AH e AF formam estruturas complexas mais estáveis quando compradas à maioria dos íons metálicos encontrados originalmente nas amostras (CUPRYS et al., 2018; NIFANT'EVA et al., 2001;

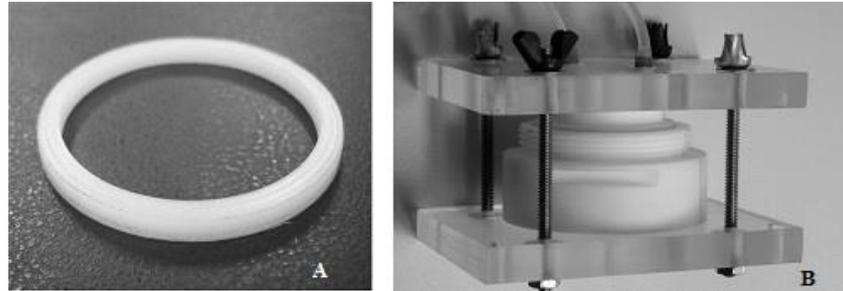
YANG et al., 2018). Além da alta estabilidade dos complexos formados por íons de cobre com a SHA e suas frações, os íons de cobre foram escolhidos como íons de troca por serem os íons mais comumente utilizados na literatura que trata de troca de íons metálicos pela SHA, o que facilita a comparação dos resultados com outros trabalhos. Já o segundo experimento utilizou moléculas de EDTA como agente competidor de íons originalmente complexados na SHA e/ou nas suas frações AH e AF. O EDTA é mais forte complexante de íons metálicos que a SHA e/ou suas frações AH e AF, dessa forma, o EDTA compete com a SHA e/ou AH e AF por seus íons originalmente complexados. Essa competição serve como parâmetro para comparar as forças de ligações dos ligantes presentes na SHA, AH e AF com ligantes de força de ligação com íons metálicos bem conhecidos como o ligantes presentes na molécula de EDTA (BURBA; VAN DEN BERGH, 2004; HAO et al., 2011; VAN DEN BERGH; JAKUBOWSKI; BURBA, 2001). Além de ser um poderoso e conhecido complexante de metais, o EDTA foi escolhido por também ser comumente utilizado na literatura da SHA, AH e AF, e dessa forma facilitar comparação dos resultados. Em todos esses experimentos foi o utilizado o procedimento analítico adotado por BURBA et al. (2001), ilustrado na Figura 4-3.



**Figura 4-3.** 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, equipada com membrana de polietersulfona, de porosidade de 1 kDa e 47 mm de diâmetro (MILLIPORE), uma bomba peristáltica de múltiplos canais (ISMALTEC modelo MC-MS/CA8), equipada com tubos Tygon®, controlador de pressão, agitador magnético e recipiente para adição da amostra. Nessa montagem, a amostra é aspirada do seu recipiente pela bomba peristáltica, em fluxo aproximado de  $165 \text{ ml min}^{-1}$  para evitar o entupimento da membrana, e a pressão é ajustada com o auxílio do controlador de pressão à 3

bar para efetivar a filtração da amostra. 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 esse tipo de O-ring pode absorver e liberar metais ao sistema, sendo assim, foi necessário substituir o O-ring de borracha por um selo de nylon, utilizando chapas de acrílico parafusadas entre si para efetivar a vedação conforme a Figura 4-4.



**Figura 4-4. Adaptação do sistema de ultrafiltração. A) Selo de Nylon; B) Chapas de acrílico, parafusadas ente 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.

#### **4.8.2 Estudo de troca dos metais por íons de $\text{Cu}^{2+}$**

Os metais Na, K, Mg, Cu, Pb, Cd, Ag, Mn, Zn, Ni, Co, Fe, Al e Ca inicialmente foram comparados através das constantes de troca dos metais com íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Essas constantes foram obtidas com o auxílio do sistema de ultrafiltração tangencial (UF-FT), adicionando 200 mL da amostra de interesse na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e pH ajudado para 5 (quando necessário) com  $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  no recipiente de amostra. A escolha do pH 5 deu-se por ser o valor mais próximo dos valores de pH comumente encontrado no rio Negro, e assim, aproximar as propriedades conformacionais e polieletrólíticas das amostras à aquelas encontradas no rio.

Primeiramente filtrou-se a primeira alíquota (2 mL), corresponde ao tempo zero, antes da adição da solução de íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Essa alíquota pode conter uma pequena quantidade de íons  $\text{Cu}^{2+}$  livre originalmente presentes na amostra de SHA ou em suas frações de AH e AF, além de outras substâncias (ex. proteínas, lipídios) ligadas naturalmente a amostra com tamanho molecular menor que 1 kDa. Antes do início das adições de cobre, uma alíquota de 2 mL da solução de 200 mL da amostra foi retirada para a determinação da concentração total dos íons

no início do experimento e uma alíquota de 2 mL foi filtrada para terminação dos metais livres antes da adição de cobre.

Após a coleta das primeiras alíquotas, foi adicionado solução de íons  $\text{Cu}^{2+}$  à solução da amostra (SHA, AH ou AF), ajustando a concentração inicial de íons  $\text{Cu}^{2+}$  à  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . 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  $\text{Cu}^{2+}$  até que a concentração final atingisse  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 4-3), respeitando 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 ICP-OES THERMO SCIENTIFIC, modelo iCAP 7600 Duo.

**Tabela 4-3. Volumes das adições da solução de íons  $\text{Cu}^{2+}$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizados nos experimentos de troca de metais originalmente complexados em 200 mL de SHA  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .**

Etapas de 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:



$$K_{\text{troca}} = \frac{[\text{Cu-SHA}][\text{M}]}{[\text{M-SHA}][\text{Cu}]} \quad (4)$$

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

A concentração de metal complexado é obtida pela seguinte formula:

$$[\text{M-SHA}] = C_{\text{mt}} - [\text{M}] \quad (5)$$

Onde  $C_{mt}$  é concentração de metal originalmente complexado na SHA (ou nas frações AH e AF), determinada através da análise da alíquota de 2 mL da solução de 200 mL da amostra coletada no tempo zero (antes da adição de íons de  $Cu^{2+}$ ) e seu primeiro filtrado em 1 KDa também no tempo zero. A diferença entre as concentrações de metais determinados na primeira alíquota coletada (2 mL da solução da amostra) e no primeiro filtrado (2 mL filtrados da solução da amostra antes da adição de cobre) fornecem a concentração de metais originalmente complexados.

A concentração de  $Cu^{2+}$  complexada [Cu-SHA] é dada por:

$$[Cu-SHA] = C_{Cu_{add}} - [Cu] \quad (6)$$

Onde  $C_{Cu_{add}}$  é a concentração de íons  $Cu^{2+}$  em 200 mL da solução da amostra calculada usando o somatório da massa de íons  $Cu^{2+}$  em solução, determinada através da alíquota de 2 mL da solução no tempo zero (antes das adições de íons  $Cu^{2+}$ ) e as massas de íons  $Cu^{2+}$  adicionadas nas diferentes etapas do experimento. O volume total usando para o cálculo da concentração de íons  $Cu^{2+}$  é corrigido a cada etapa de adição, uma vez que a cada etapa são retirados da solução 2 mL (filtrado) e adicionados pequenos volumes da solução de íons de cobre  $Cu^{2+}$ .

Os resultados são plotados em gráfico, sendo o eixo das abscissas a razão  $Cu^{2+}_{livre} / Cu-SHA$  e no eixo das ordenadas  $M_{livre} / M-SHA$ , 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  $K_{troca}$  (BURBA; VAN DEN BERGH; KLOCKOW, 2001).

#### 4.8.2.1 Estudo de troca dos metais por íons de $Cu^{2+}$ após adição de íons metálicos.

Em amostras de SHA, AH e AF extraídas do rio Negro são normalmente encontradas baixas concentrações de metais, com exceção de íon de Fe e Al (ALLARD et al., 2011; AUCOUR et al., 2003). Nesse sentido, estudar apenas metais originalmente complexados na SHA e suas frações pode ser um limitante para o entendimento do comportamento de complexação, uma vez que, normalmente, esses metais se encontram em níveis de concentrações muito próximos ou inferiores aos limites de detecção do ICP-OES, dificultando assim a construção dos gráficos de complexação e também o ranqueamento e o entendimento das possíveis diferenças de labilidade de diferentes espécies metálicas na presença da SHA e suas frações. Outro fator importante a ser levado em consideração é que nos experimentos de

labilidade de íons metálicos é feita a determinação de metais livre em solução, e por isso é esperado que a concentração de metais livres em solução seja ainda menor que as concentrações de metais complexados na SHA e nas frações AH e AF.

Para minimizar esses problemas, nesse experimento foi adicionado à 500 mL de uma solução de SHA 100 mg L<sup>-1</sup> com pH ajudado para 5 com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (quando necessário) 500 µL de padrão multielementar para espectroscopia atômica PERKIN ELMER, com as seguintes concentrações de metais: Pb 3 µg L<sup>-1</sup>; Cd 5 µg L<sup>-1</sup>; Mn 15 µg L<sup>-1</sup>; Zn 20 µg L<sup>-1</sup>; Cu 25 µg L<sup>-1</sup>; Ni 40 µg L<sup>-1</sup>; Co 50 µg L<sup>-1</sup>; Fe 100 µg L<sup>-1</sup>; Al e Ba 200 µg L<sup>-1</sup>; Ca, Mg, K e Na 500 µg L<sup>-1</sup>. Após adição, a solução de SHA foi deixada em repouso por 1 dia e protegida da luz. Passado esse tempo foi feito o experimento de troca de metais com íons cobre para determinação da ordem de labilidade desses metais. Esse experimento foi repetido para os tempos de 2, 3 e 30 dias após a adição dos íons.

#### **4.9 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 Cu<sup>2+</sup>. Adicionou-se 200 mL da amostra de SHA (100 mg L<sup>-1</sup>) ao sistema de ultrafiltração, submeteu-se à 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 10, 50, 90, 150, 300, 400 e 1440 min. As análises foram feitas em ICP-OES (BURBA; VAN DEN BERGH; KLOCKOW, 2001).

#### **4.10 Teste de redução de toxicidade de metais pela SHA e suas frações**

##### **4.10.1 Eclosão dos cistos de *Artêmia Salina* sp.**

Para a eclosão dos cistos de *Artemia*, foi utilizado um béquer de 300 mL, uma fonte de luz branca (lâmpada fluorescente de 15W 6400k) e uma bomba de ar (bomba compressora Boyu U-02800) (Figura 4-5). Os cistos de *Artemia salina* sp., comprados em lojas especializadas em aquarofilia em estado de hibernação, foram colocados no recipiente devidamente lavado. Foi adicionado 200 mg de cistos em 200 mL de água do mar artificial, com concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> de sal marinho, e com o auxílio de uma bomba de ar foi feita a oxigenação da água (SILVA et al., 2010; VANHAECKE et al., 1981). Uma fonte de luz branca

constante foi mantida sobre os ovos durante 24 horas em temperatura ambiente. O tempo necessário para a eclosão da *Artemia* é de 24 horas. Após a eclosão, as *Artemias* vivas foram separadas dos cistos que não eclodiram.

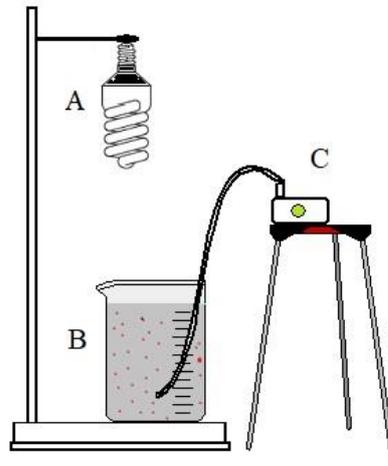


Figura 4-5. Representação esquemática dos aparatos usados para eclosão dos cistos de *Artêmia Salina sp.* A) lâmpada fluorescente de 15 W, 6400 K; B) Béquer (200 mL); C) Compressor de ar. Fonte: autor.

#### 4.10.2 Soluções utilizadas no teste de toxicidade aguda

Foram preparadas diversas soluções de nitrato de cobre com concentração que variaram entre 5 a 50 mg L<sup>-1</sup> para determinação da concentração letal para as *Artemias*. Para a avaliação da concentração letal de SHA, foram preparadas soluções com concentração de 10 a 300 mg L<sup>-1</sup>, ajustando o pH para 5, que é próximo ao pH encontrado no rio Negro. Foi preparada uma solução de água marinha artificial de 4 mg L<sup>-1</sup>. O sal marinho utilizado (Red Sea Salt), adquirindo em loja de aquarofilia.

#### 4.10.3 Experimentos de toxicidade aguda

Com as *Artemia* eclodidas e separadas, foram feitos três experimentos. O primeiro com as soluções de nitrato de cobre para determinar sua concentração letal, que é definida como a concentração que provoca mortalidade de 50 % da população do organismo teste (CL<sub>50</sub>). O segundo com SHA, para determinar sua concentração letal. O terceiro teste teve a finalidade de verificar o potencial redutor de toxicidade aguda da SHA em diferentes concentração e teores de suas frações AH e AF contra a concentração letal para íons de cobre determinada para as

*Artemias*. Foi utilizado um conta gotas, placas para cultura de células de 24 poços e volume de 3 mL e uma lupa para a contagem das larvas que permaneceram vivas. Nas primeiras 24 horas, o náuplio consome o vitelo que envolve o seu corpo como fonte de alimento, sendo assim, o náuplio não precisa ser alimentado (BRISKI et al., 2008; SORGELOOS, 1978).

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, foram transferidas 10 larvas para cada poço, onde foi adicionado com auxílio de pipeta automática, 1 mL da solução de 4 mg L<sup>-1</sup> do sal marinho artificial, 0,1 mL de uma solução de 0,51 g L<sup>-1</sup> de nitrato de cobre, seguida de uma pequena massa predeterminada da SHA em cada poço. Após as adições, finalmente os pocinhos foram avolumados com a solução de 4 mg L<sup>-1</sup> do sal marinho artificial.

As placas de cultura então são levadas a estufa biológica e mantidas a temperatura de 25 °C por um período de 24 horas. Após as 24 horas, foi feita a contagem das larvas sobreviventes com auxílio de uma lupa. A placa de cultura foi suavemente agitada e as larvas que permaneceram paradas por mais de 10 segundos foram consideradas mortas.

Por fim, foi feita a determinação da concentração letal média CL<sub>50</sub>. A partir dos dados obtidos durante os experimentos, foi calculado o índice médio de mortalidade (*Im*) utilizando a equação  $Im = Nm/Nt * 100$ . Onde *Nm* é a quantidade de *Artemias* que morreram durante o teste, e *Nt* a quantidade total de *Artemias* utilizadas em cada poço (MOREIRA, 2013). Para cálculo de *Im*, foi utilizada a média do percentual de mortalidade encontrado nos poços de duas placas de cultura, resultando assim em um N amostral de 48.

#### **4.10.3.1 Determinação da toxicidade aguda dos íons cobre**

A determinação da toxicidade aguda de íons cobre para as *Artemias Salinas* foi feita utilizando soluções de concentrações de 0 a 50 mg L<sup>-1</sup> em nitrato de cobre. A CL<sub>50</sub> de íons cobre determinada foi utilizada nos experimentos de redução toxicidade pela SHA e suas frações.

#### **4.10.3.2 Determinação da toxicidade aguda da SHA**

Foi preciso conhecer a toxicidade aguda para as *Artemias Salinas* em SHA e assim conhecer o limite de sua concentração a ser utilizada nos ensaios de redução de toxicidade de íons cobre, provocada pela presença da SHA. Para esse teste, foram testadas as seguintes concentrações de SHA: 10, 50, 100, 200, 400 e 600 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.10.3.3 Avaliação da redução da toxicidade aguda de íons cobre por SHA

Para a avaliação do potencial redutor de toxicidade aguda pela SHA, foram feitos dois testes, o primeiro foi feito utilizando a concentração de  $19 \text{ mg L}^{-1}$  que foi determinada como  $CL_{50}$  de íons cobre. Já o segundo teste foi feito na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  que apresenta índice de mortalidade superior à 85 %. As concentrações de SHA utilizadas foram as seguintes: 25, 50, 75 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 4.10.3.4 Avaliação da redução da toxicidade aguda de íons cobre por SHA com diferentes concentrações e teores de AH e AF

Para entender qual a contribuição dos componentes majoritários das substâncias húmicas aquáticas (ácido húmico e fúlvico) no seu potencial redutor de toxicidade aguda, foi feito o teste de redução dos índices de mortalidade para as frações da SHA isoladas e da mistura dessas frações em proporção diferentes (m/m). Esse teste foi feito utilizando a concentração de  $19 \text{ mg L}^{-1}$  que foi determinada como  $CL_{50}$  de íons cobre. A primeira proporção da mistura entre AH e AF foi feita com 25 % de AH e 75 % AF; a segunda mistura foi feita com 50 % de AH e 50 % AF; por último, foi feita a mistura de proporção de 75 % AH e 25 % AF. Com as soluções prontas, foi feito os ensaios de redução dos índices de mortalidade para as amostras de AH e AF primeiramente isoladas e posteriormente em misturas, em quatro concentrações de suas soluções  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $75 \text{ mg L}^{-1}$  e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Essas quatro concentrações foram escolhidas por estarem próximas aos níveis encontrados em rio de água doce.

#### 4.10.3.5 Análise estatística

O teste de Lilliefors foi usado para determinar se os dados tem distribuição normal para um nível de significância de 0,05. Após a confirmação da normalidade dos dados, os resultados foram comparados usando teste de Fisher LSD (do inglês: “*Least Significant Difference*”) com nível de significância 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise da água do rio Negro

A Tabela 5-1 mostra os parâmetros físico-químicos analisados para a amostra de água do rio Negro, coletada em maio de 2016, em comparação com os parâmetros físico-químicos encontrados por Silva (2015) para amostras do período sazonal do ano de 2012 (Enchente, Cheia, Vazante e Seca). A comparação foi feita para demonstrar a proximidade dos valores de pH, condutividade, cor, NT, concentração da SHA e razão C/N encontrados no presente trabalho com valores encontrados na literatura para amostras de água do rio Negro.

Os resultados obtidos mostram valores característicos para amostras de SHA do rio Negro e isso pode ser observado quando é feita a comparação desses resultados com os encontrados por Silva (2015), que obteve valores similares. A amostra de 2016 apresentou valor da razão C/N mais elevado, e segundo Stevenson (1994) valores elevados da C/N estão associados ao maior grau de humificação da amostra, nesse sentido, é possível sugerir que a amostra coletada é mais humificada e por tanto possui matéria orgânica dissolvida mais antiga que as amostras de Silva (2015).

**Tabela 5-1. Parâmetros físico-químicos da amostra de água do rio Negro de maio de 2016 em comparação com os valores encontrados por Silva (2015).**

Amostra	Temperatura (°C)	Hora	pH	Condutividade ( $\mu\text{ cm}^{-1}$ )	Cor (mg Pt-Co L <sup>-1</sup> )	COT (mg L <sup>-1</sup> )	NT (mg L <sup>-1</sup> )	[SHA] mg L <sup>-1</sup>	C/N
RN 13/05/16	32,1	11:20	5,4	11	195,36	12,97	0,24	13,90	54,50
RN 23/03/12	30,2	09:41	5,1	12	193,70	11,88	0,34	11,11	35,21
RN 29/06/12	30,0	10:00	5,5	12	190,23	10,95	0,30	5,58	36,54
RN 29/09/12	31,4	09:50	5,0	14	191,34	12,17	0,27	5,12	44,46
RN 23/12/12	33,0	11:00	4,9	11	195,61	11,27	0,31	12,89	36,65

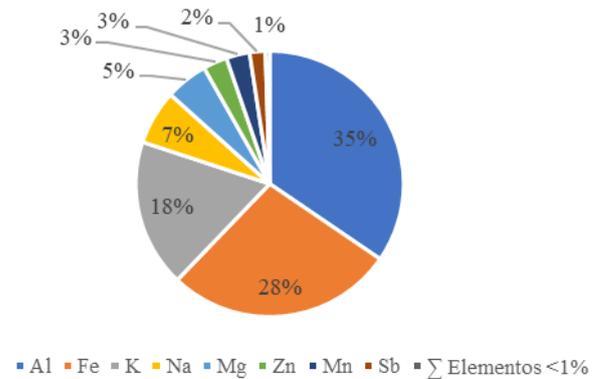
O valor de pH analisado se encontra dentro do esperado para amostras do rio Negro. Os baixos valores de pH das águas do rio Negro são justificados devido à grande presença de substâncias de caráter ácido com as substâncias húmicas aquáticas, que tem sua origem em solos podzólicos hidromórficos, que por sua vez, são abundantes em estruturas químicas ricas em grupos carboxílicos. O baixo valor de condutividade encontrado é uma característica típica

de “águas pretas” e pode ser explicado por esse tipo de água apresentar baixos teores de íons livres. Valores próximos foram encontrados em diversos outros trabalhos (FADINI; JARDIM, 2001; OLIVEIRA et al., 2007; SARGENTINI, 2008).

Os resultados para análise de metais da amostra do rio Negro-AM podem ser vistos na Tabela 5-2 e porcentual dos íons metálicos na amostra são exibidos na Figura 5-1.

**Tabela 5-2. Metais presentes na água do rio Negro-AM (RN 13/06/16)**

Elementos	Concentração (ppb)
Al	385,2
Fe	307,2
K	200,2
Na	73,7
Mg	57,3
Zn	32,5
Mn	31,4
Sb	21,2
∑ Elementos <1%	5,7



**Figura 5-1. Porcentagem de metais na amostra de água do rio**

Após o processo de extração da SHA dos 280 litros da amostra de água do rio Negro com a resina XAD-8, purificação do extrato e liofilização, foi obtido 4,891 g de SHA anidra, o que representa uma concentração de 17,5 mg L<sup>-1</sup> em SHA na amostra coletada. Dos 4,981 g de SHA anida, 1 g foi separado para realização dos experimentos com SHA e massa restante, 3,891 g de SHA, foi submetida ao processo de separação das frações AH e AF. Após a separação foi obtido 3,579 g de AF que representa 92 % da massa de SHA e 0,306 g de AH que representa 8 % da massa de SHA.

Para a análise dos metais nas frações, foram preparadas soluções de 100 mg L<sup>-1</sup>, tanto da amostra de SHA quanto das frações AF e AH, o resultado pode ser visto na Tabela 5-3.

**Tabela 5-3. Concentração de metais em solução de 100 mg L<sup>-1</sup> da amostra de SHA e das frações AH e AF**

Amostra	Cu	Na	K	Mg	Pb	Cd	Ag	Mn	Zn	Ni	Fe	Al	Ba	Ca	Co
SHA	0,6	9405,5	62,4	94,4	9,2	0,0	4,1	19,1	4,4	0,3	445,9	346,0	14,1	908,5	0,1
AH	5,2	3436,3	22,5	3,3	2,6	0,1	2,0	0,4	8,6	2,7	759,8	103,3	1,7	18,5	11,2
AF	0,0	5405,7	0,0	85,3	20,4	0,0	2,9	6,6	47,5	0,9	472,4	391,4	16,6	440,2	3,7

## 5.2 Caracterização dos grupos ligantes da SHA

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

A espectroscopia de infravermelho é 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., 2000b; STEVENSON, 1982). A Figura 5-2 mostra os espectros de FT-IR obtidos para a amostra de SHA e suas frações AH e AF.

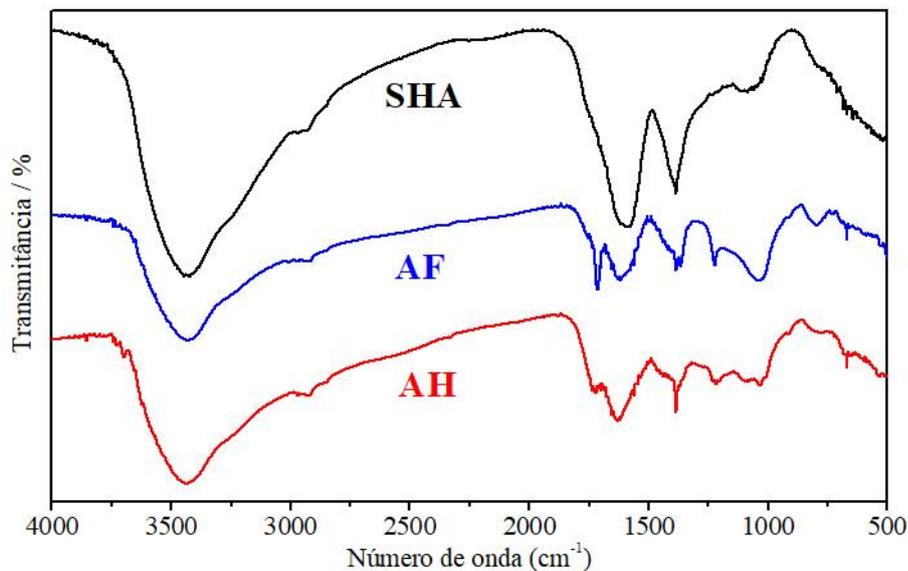


Figura 5-2. Espectros de FT-IR das frações AH e AF da amostra SHA do rio Negro

Os espectros obtidos apresentaram bandas largas e características comuns a aquelas encontradas para espectros de FT-IR de amostras de SHA. No geral, os espectros de infravermelho da amostra SHA e de suas frações apresentaram bandas largas e intensas, que são características das substâncias húmicas e de suas frações. As bandas largas e intensas podem ser justificadas pela presença de superposições de absorções de estruturas químicas similares e individuais entre grupos funcionais na amostra de SHA e nas frações AH e AF. A região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  apresenta uma banda característica da presença do estiramento OH que pode ser oriunda de grupos carboxílicos, alcoólicos, fenólicos e de moléculas de água ligadas à estrutura da SHA e suas frações. Na região em torno  $2900\text{ cm}^{-1}$ , é possível nota pequenas bandas que podem ser atribuídas aos metilenos alifáticos ou estiramentos C-H, que geralmente ficam

superpostas à banda larga produzida pelo estiramento OH. Em torno de  $1600\text{ cm}^{-1}$  é observada bandas que podem ser atribuídas à vibração de estiramentos C=C, possivelmente de anéis aromáticos conjugados com C=O e/ou COO<sup>-</sup>, esses sinais indicam a aromaticidade da SHA. Os sinais na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$  podem também ser atribuídos à vibrações do estiramento C=O do grupo COOH, sendo que nesse caso, o H está provavelmente ligado a grupos que contenham OH em posição orto, e ao estiramento anti-simétrico do grupo carboxilato. Entre  $1370$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  são observadas bandas que podem ser atribuídas aos grupos C-H alifáticos e vibrações de ácidos carboxílicos ou do grupo OH (RICCA et al., 2000; SLOBODA et al., 2009; STEVENSON, 1982).

### 5.2.2 Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica apropriada para a caracterização de substâncias húmicas (WILSON, 1989). Em geral a técnica de RMN de  $^{13}\text{C}$  é utilizada para comparar diferenças na concentração dos principais grupos funcionais entre amostras de substância húmica (WERSHAW et al., 1990). Os vários picos no espectro de amostras de SHA são atribuídos aos grupos funcionais de carbono específicos. Nesses espectros podem haver algumas sobreposições de sinais de ressonância, que podem ser justificadas pela larga variedade de grupos funcionais característica em um material complexo, como é caso das substâncias húmicas. Com a técnica de RMN de  $^{13}\text{C}$ , é possível fazer medidas diretas do teor de carbonos carboxílicos, aromáticos e alifáticos. Essas medidas podem ser feitas fazendo a integração de regiões específicas do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 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 regiões de ressonância específicas (ou deslocamentos químicos) para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Esse trabalho foi escolhido como referência por apresentar regiões de ressonância mais coerentes com as diferentes bandas espectrais obtidas nesse trabalho.

A Figura 5-3 mostra os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos para a amostra de SHA e suas frações AF e AH e os valores dos deslocamentos químicos estão apresentados na Tabela 5-4.

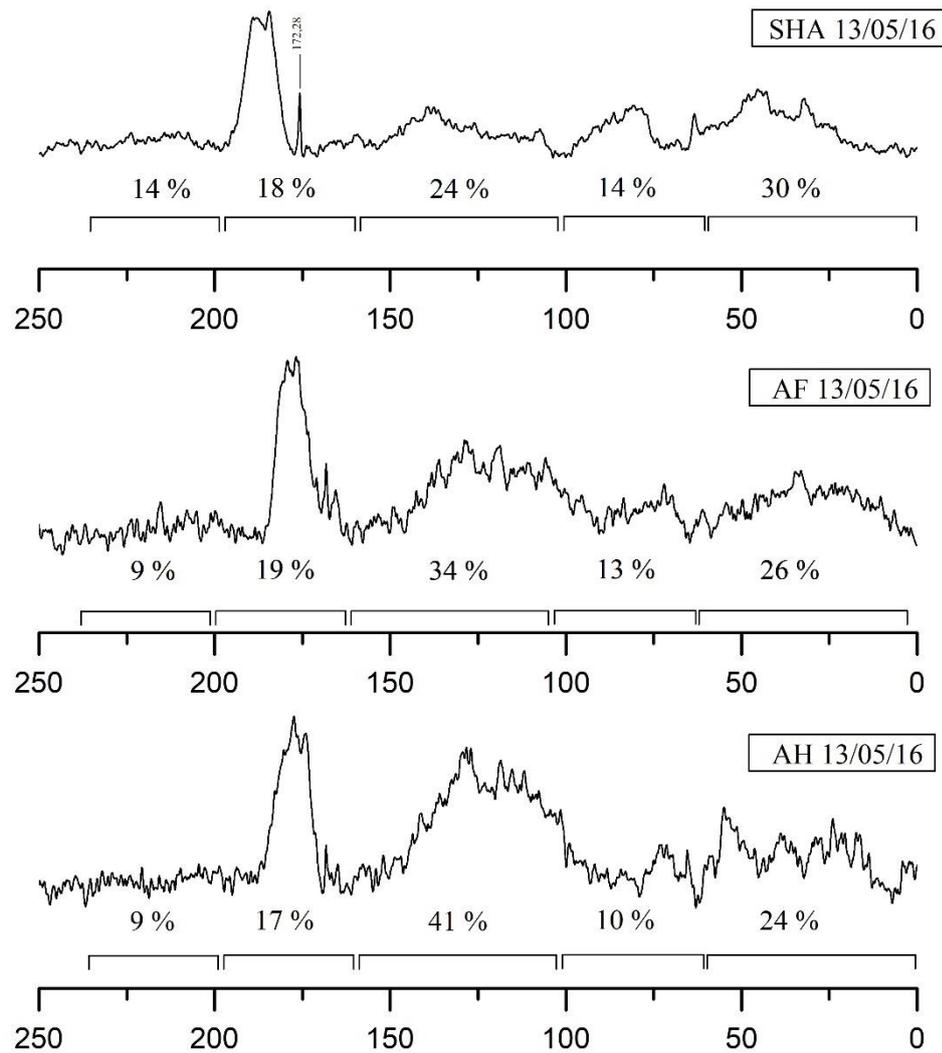


Figura 5-3. Espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz, NaOD) da amostra de SHA do rio Negro e de suas frações AF e AH.

Tabela 5-4. Atribuições dos picos para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra de SHA, AF e AF e as integrações de suas áreas (%). Deslocamentos químicos e suas atribuições foram adaptados de Rocha et al., (1999).

ppm	Atribuições	Integração %				
		SHA 13/05/16	AF 13/05/16	AH 13/05/16	SHA 29/06/12*	SHA Rocha et al (1999)**
0-65	Parafinas	30	26	24	27	33
65-100	Hidroxilas, Éteres	14	13	10	10	17
100-165	Olefinas, Aromáticos	24	34	41	30	35
165-190	Carboxílicos	18	19	17	18	12
190-230	Cetonas	14	9	9	14	3

\* Valores obtidos do trabalho de Silva, H. A., (2015)

\*\* Valores obtidos do trabalho de Rocha, et al., (1999)

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. Em geral, para essa região espectral, os valores das integrais obtidas para as frações AF e AH são similares entre si e menores que o valor obtido para SHA, ou seja, para essa amostra de SHA, suas frações de AH e AF apresentam menor presença porcentual de carbonos do tipo  $sp^3$ . Apesar do observado, não se pode afirmar que para qualquer amostra de SHA, as frações de AH e AF tem menor teor de carbonos  $sp^3$  quando comparado com a SHA, isso porque os valores das integrais obtidas para as frações são muito próximos aos valores encontrados por Silva (2015) para amostras de SHA no ano de 2012.

A região de 65 a 100 ppm está associada a carbonos alifáticos oxigenados, que representa uma variedade de grupos alcoóis, éteres e ésteres, exibiu uma quantidade relativamente pequena de sinais. A comparação dentre as amostras de AH e AF apresenta diferença de apenas 3 % dos valores de integral obtidas para região, dessa forma pode-se dizer ambas as amostras possuem características similares quanto ao teor de grupamentos químicos encontrados na região.

Na região dos grupos aromáticos e olefinas (100 a 164 ppm), as frações AF e AH apresentaram elevados valores da porcentagem de suas integrais 34 e 41 % respectivamente, evidenciando dessa forma uma maior presença de estruturas aromáticas na fração AH quando é feita a comparação com fração AF. Amostra de SHA mostrou valor porcentual da sua integral, para a mesma região, quase duas vezes menor que o valor obtido para fração AH, ou seja, a SHA, proporcionalmente, possui menor teor de grupos aromáticos e olefinas que suas duas principais frações isoladas.

Já região que vai de 165 a 190 ppm é relacionada aos grupos carboxílicos, carbonos de amidas e ésteres, que são os principais grupos ligantes da SHA e suas frações. Os valores porcentuais das integrais dos espectros para essa região mostraram não haver uma diferença significativa nos teores desses grupos ligantes tanto para de SHA quanto para suas frações AH e AF.

Esses resultados sugerem que possíveis diferenças observadas na comparação entre a complexação de metais da amostra de SHA e suas fração não estão relacionadas aos seus teores dos grupos carboxílicos, carbonos de amidas e ésteres, e sim relacionadas a variação da composição dos demais grupos constituintes da SHA, tais como grupamentos aromáticos, éteres, ésteres e cadeias alifáticas, bem como a distribuição espacial das macromoléculas de AH e AF.

### 5.3 Estudo da disponibilidade de metais das SHA, AH e AF

#### 5.3.1 Concentração de metais durante o processo de diálise

O comportamento de remoção do excesso de NaCl proveniente do processo de extração da SHA foi avaliado fazendo a análise da concentração de íons Na em alíquotas da amostra dialisada a cada batelada do processo. A Figura 5-4 mostra a redução da concentração de íons Na a cada batelada do processo, sendo todas as concentrações ajustadas com as concentrações de COT de cada alíquota para corrigir o efeito aumento do volume provocado pelo processo de diálise.

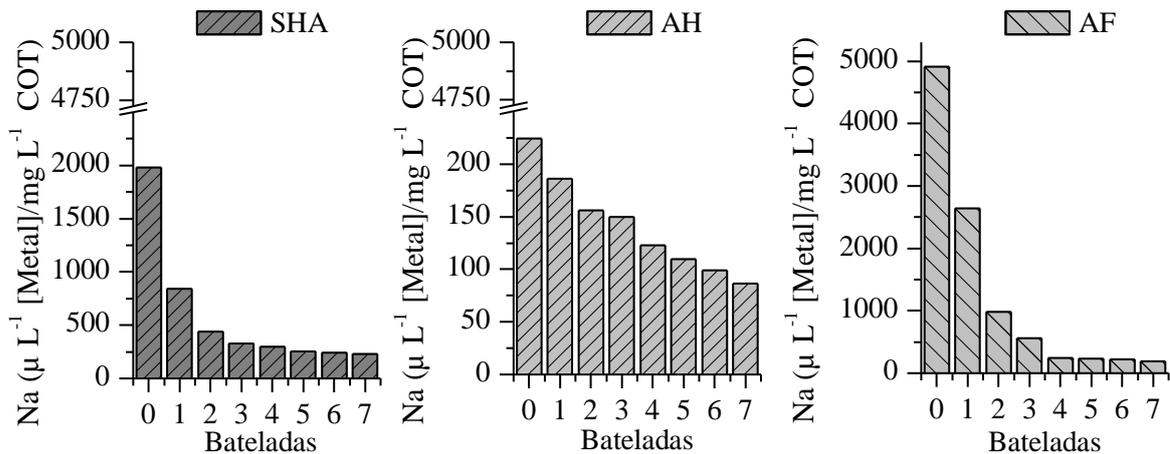
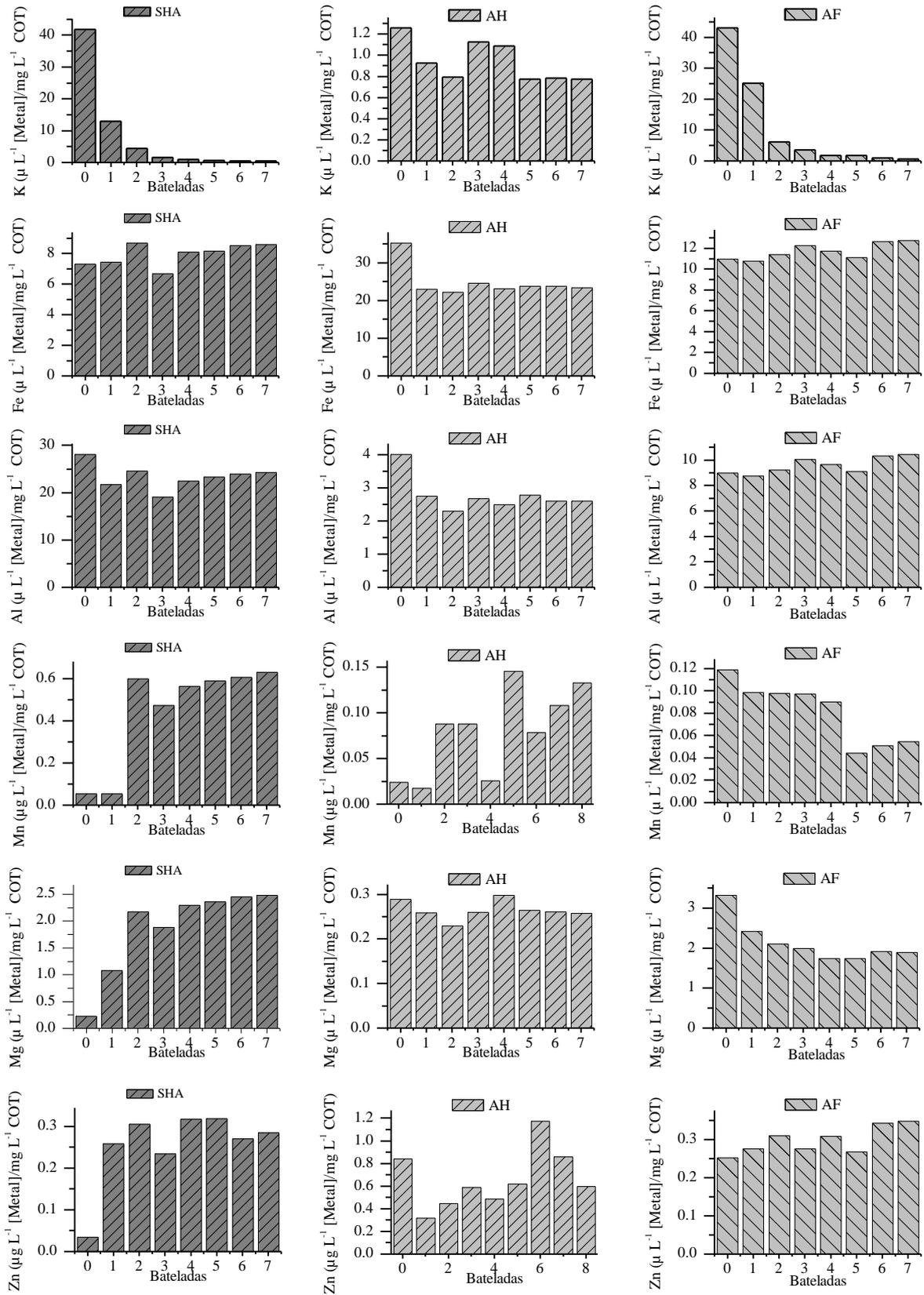


Figura 5-4. Redução da concentração de Na durante a diálise da SHA e suas frações AH e AF. Cada batelada do processo consiste na troca osmótica de íons presentes em 1 litro da amostra para 10 litros de água deionizada.

É notório que as concentrações de íons Na são drasticamente reduzidas logo nas três primeiras bateladas do processo de diálise para a amostra de SHA e a fração AF, onde praticamente todos os íons Na livres são trocados. É possível notar também que a concentração de íons Na, antes da primeira batelada de diálise na fração AH é bem menor quando comparada com a amostra de SHA e a fração AF. A diferença na concentração de íons Na nas frações AH e AF pode ter origem no processo de separação das frações, uma vez que após a acidificação do extrato salino de SHA, a fração AH é separada por precipitação e a fração AF é o sobrenadante resultante, e provavelmente os íons de Na ficam dissolvidos no sobrenadante no momento da separação.

Já para os demais metais os resultados são apresentados na Figura 5-5.



**Figura 5-5.** Redução da concentração de K, Fe, Al, Mn, Mg e Zn durante a diálise da SHA e suas frações AH e AF. Cada batelada do processo consiste na troca osmótica de íons presentes em 1 litro da amostra para 10 litros de água deionizada.

Na Figura 5-5 é possível notar uma aparente variação nas concentrações dos demais metais analisados a cada batelada do processo de diálise como Mn, Mg e Zn. A mais provável explicação dessas variações está nos níveis de concentrações desses metais na estrutura da SHA e em suas frações, que são muito baixos e muito próximos dos limites de detecção do elemento no ICP-OES, além disso, a imprecisão nas determinações COT, podem aumentar as incertezas nos resultados observados. Para elementos de concentração não tão baixos na estrutura da SHA e suas frações como Fe e Al é possível notar que a variação das concentrações desses elementos é muito baixa, ou seja, é possível dizer que esses elementos não se desprendem dos complexos de SHA-M, AH-M e AF-M durante o processo de diálise. O mesmo não pode ser dito para os íons de K, que aparentam se desprendem das estruturas da SHA com grande facilidade, considerando que a única fonte de íons K é a própria SHA, uma vez que as soluções usadas no processo extração da SHA e suas frações não possuem como contaminantes íons K.

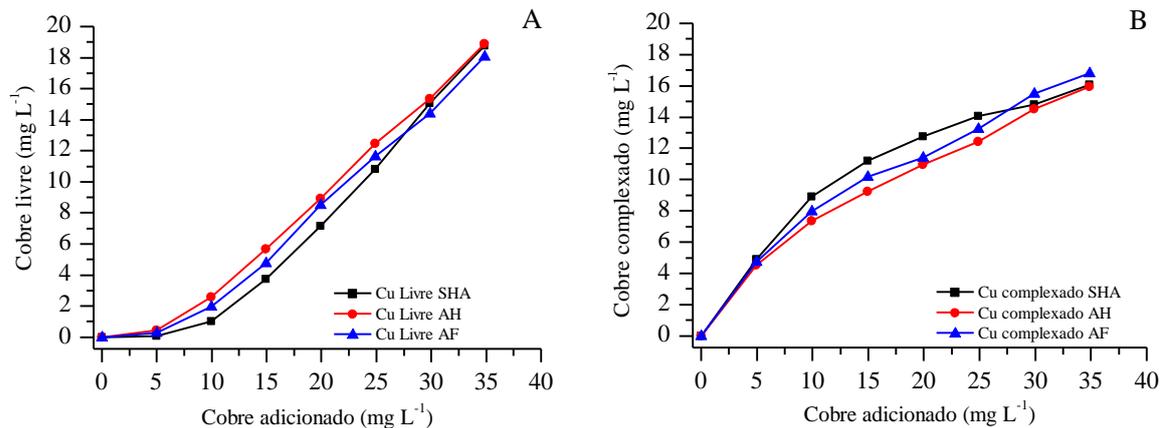
O processo de diálise foi muito efetivo na purificação de todas as amostras estudadas, em especial para a fração AF e para amostra de SHA que em três bateladas reduziram consideravelmente a presença de íons Na de origem não natural. Entretanto, ainda foi observado redução das concentrações de íons Na e K mesmo após a solução apresentar condutividade constante (7<sup>o</sup> batelada). Isso mostra que apesar da condutividade durante os experimentos tornar-se constantes entre a 6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> batelada, determinando o fim da purificação, ainda pode haver íons a serem trocados após esse ponto.

Um outro aspecto importante observado está na redução na concentração de íons K, que evidenciam que o processo de diálise pode dificultar a extrapolação de resultados de experimentos de complexação de alguns íons para ambientes naturais. Uma vez que a única fonte de íons K é a própria SHA e suas frações, a grande redução da concentração de íon K pode ser atribuída a fraca interação entre os íons K e a SHA e/ou suas frações. Dessa forma, após o processo diálise, os complexos entre os íons de K e SHA remanescentes serão aqueles de maior estabilidade, gerando assim, constantes de equilíbrio diferentes das encontradas em uma amostra natural. Dessa forma, o conhecimento da troca de íons metálicos durante o processo de diálise é importante para entender não apenas os níveis de concentrações iniciais de diversos íons em experimentos que tem como objetivo o ranquear a labilidade de íons metálicos, como também ajudam a explicar as diferentes constante de complexação encontradas dos mesmos.

### 5.3.2 Troca de íons metálicos originalmente complexos de SHA e as frações AH e AF por íons de $\text{Cu}^{2+}$

#### 5.3.2.1 Capacidade complexante de íons de cobre da SHA suas frações

Antes de se iniciar os diversos experimentos para o ranqueamento da labilidade de metais é necessário conhecer a capacidade complexante dos íons de cobre das amostras. Os íons de cobre são amplamente utilizados em estudos de complexação de metais e troca de metais por possuem alta afinidade com SHA e suas frações, formando assim complexos de alta estabilidade. A capacidade complexante de íons de cobre é determinada rotineiramente em diversos estudos utilizando principalmente eletrodo de íon seletivo de cobre, porém no presente trabalho foi utilizada como alternativa para obtenção da capacidade complexante a técnica de ultrafiltração tangencial, usando membrana de filtração de 1 kDa e posterior análise dos filtrados em ICP-OES. A capacidade complexante de íons cobre é determinada no momento em que a concentração dos filtrados se iguala a concentração dos íons de cobre adicionados à solução de SHA, isto é, todo os íons de cobre adicionados ficam livres e por isso são filtrados pela membrana. A Figura 5-6 mostra os gráficos obtidos para complexação dos íons de cobre.



**Figura 5-6. Complexação dos íons de cobre. A) Aumento da concentração de íons cobre livre em solução; B) Aumento da concentração do complexo Cobre com SHA, AH e AF.**

As curvas para as diferentes amostras no gráfico da Figura 5-6A mostram que entre as concentrações de 25 a 35 mg L<sup>-1</sup> o aumento da concentração de íons cobre livre (íons filtrados) é praticamente proporcional ao acréscimo da concentração de íons cobre total (íons adicionados). Já o gráfico Figura 5-6B mostra o aumento da concentração do complexo  $\text{Cu}^{2+}$  complexado com SHA, AH e AF, que é determinado como sendo a diferença entre a

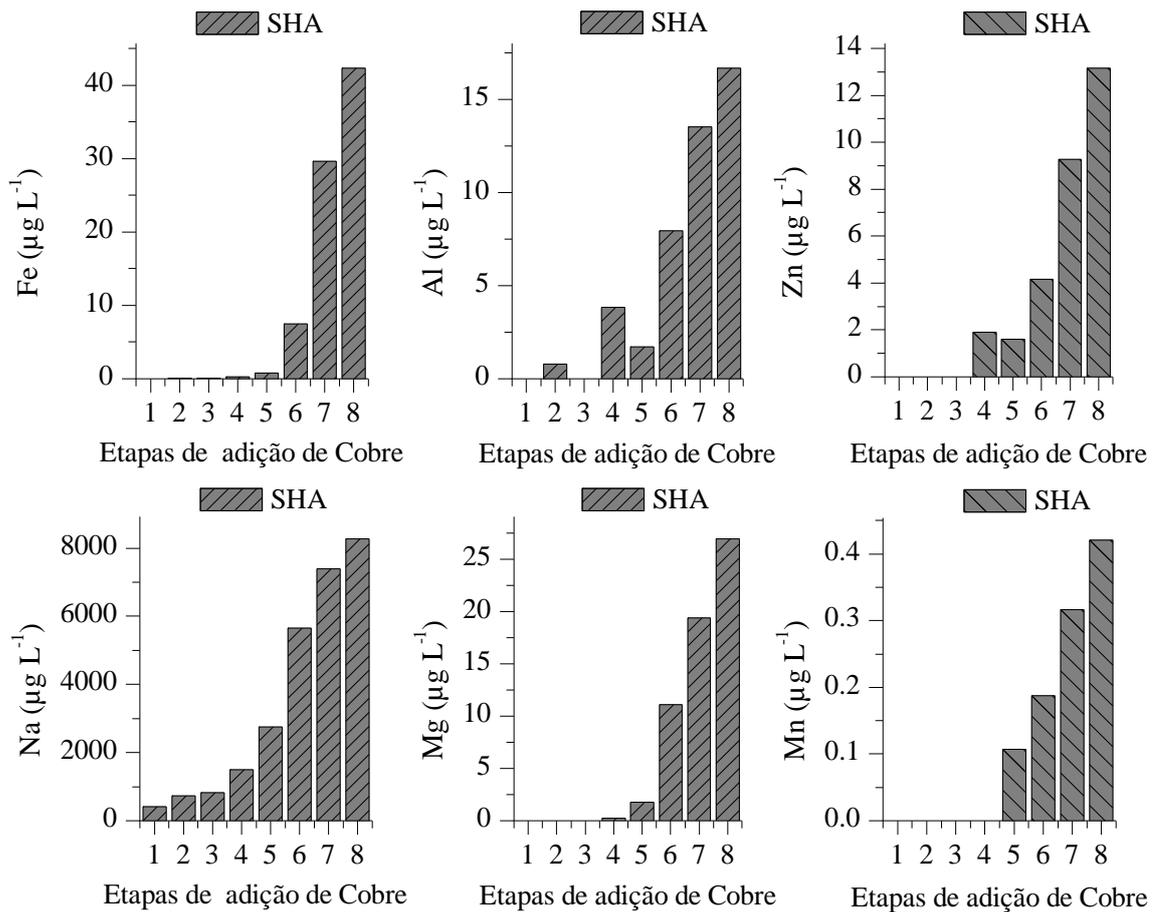
concentrações de cobre total e livre. É possível notar que entre as concentrações de 30 e 35 mg L<sup>-1</sup> de cobre total o aumento da concentração do complexo com cobre é mínimo.

Durante os experimentos, foi observado que a partir da concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> de íons Cu<sup>2+</sup> total há o início da precipitação da SHA e conseqüentemente dos complexos de cobre com os húmicos da solução. Essa precipitação ocorre devido ao aumento de forças polieletrólíticas na solução causadas pela adição de íons Cu<sup>2+</sup> (MCDONALD et al., 2004; ZAVARZINA et al., 2002), que por sua vez fazem com as estruturas das SHA e suas frações se condensem ao ponto precipitar. Por isso fica difícil de precisar a capacidade complexante das amostras através dessa técnica e aparentemente encontra-se em torno de 35 a 40 mg L<sup>-1</sup> de Cobre para 100 mg L<sup>-1</sup> de SHA e suas frações.

Esse experimento serviu para determinar a faixa de concentração a ser utilizada nos experimentos de troca de metais originalmente complexados pela SHA e suas frações que é de 1 à 35 mg L<sup>-1</sup> de cobre total. Das três amostras estudadas, a SHA foi a que mostrou o maior poder complexante de cobre, que pode ser facilmente visualizada na região que vai de 5 à 25 mg L<sup>-1</sup> de cobre total do gráfico Figura 5-6B.

### **5.3.2.2 Otimização do experimento de troca de metais (Adição linear x exponencial)**

O modelo experimental adotado para esse experimento precisou ser adaptado no presente trabalho. A adaptação foi necessária porque o procedimento experimental original faz uso de adições sucessivas de cobre elevando sua concentração de maneira exponencial (conforme descrito na Tabela 4-3). Esse procedimento não apresentou, de maneira geral, dados satisfatórios, uma vez que a detecção do aumento da concentração dos metais livre só foi observada, em sua grande maioria, nas três últimas etapas de adição (Figura 5-7). Isso provavelmente ocorre devido à baixa concentração nas etapas iniciais de adição cobre uma vez que nesse nível de concentração pode não haver troca em níveis detectáveis pela técnica espectroscópica utilizada.



**Figura 5-7.** Comportamento de troca dos metais a cada etapa de adição exponencial de cobre. Os valores de concentração de íons  $\text{Cu}^{2+}$  para cada etapa são respectivamente 1,00; 1,85; 3,41; 6,32; 11,69; 21,62 e 39,98  $\text{mg L}^{-1}$ .

Pode se sugerir que praticamente todo cobre adicionado nas etapas inicial estão sendo complexado por sitos de ligação ainda disponíveis na estrutura das amostras utilizadas.

Para melhorar a detecção dos metais trocados com por íons  $\text{Cu}^{2+}$ , optou-se por fazer o aumento da concentração do cobre de maneira linear e não exponencial. As concentraoes utilizadas para cada etapa de adição foram; 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\text{mg L}^{-1}$  de íons cobre. Os resultados obtidos com essa mudana melhoram detecção de metais como Na, Mg, Mn, Fe, Al, Zn nas 3 primeiras etapas de adição de cobre, que não encontravam em níveis quantificáveis pelo método exponencial para técnica de ICP-OES (Fiurga 5-8).

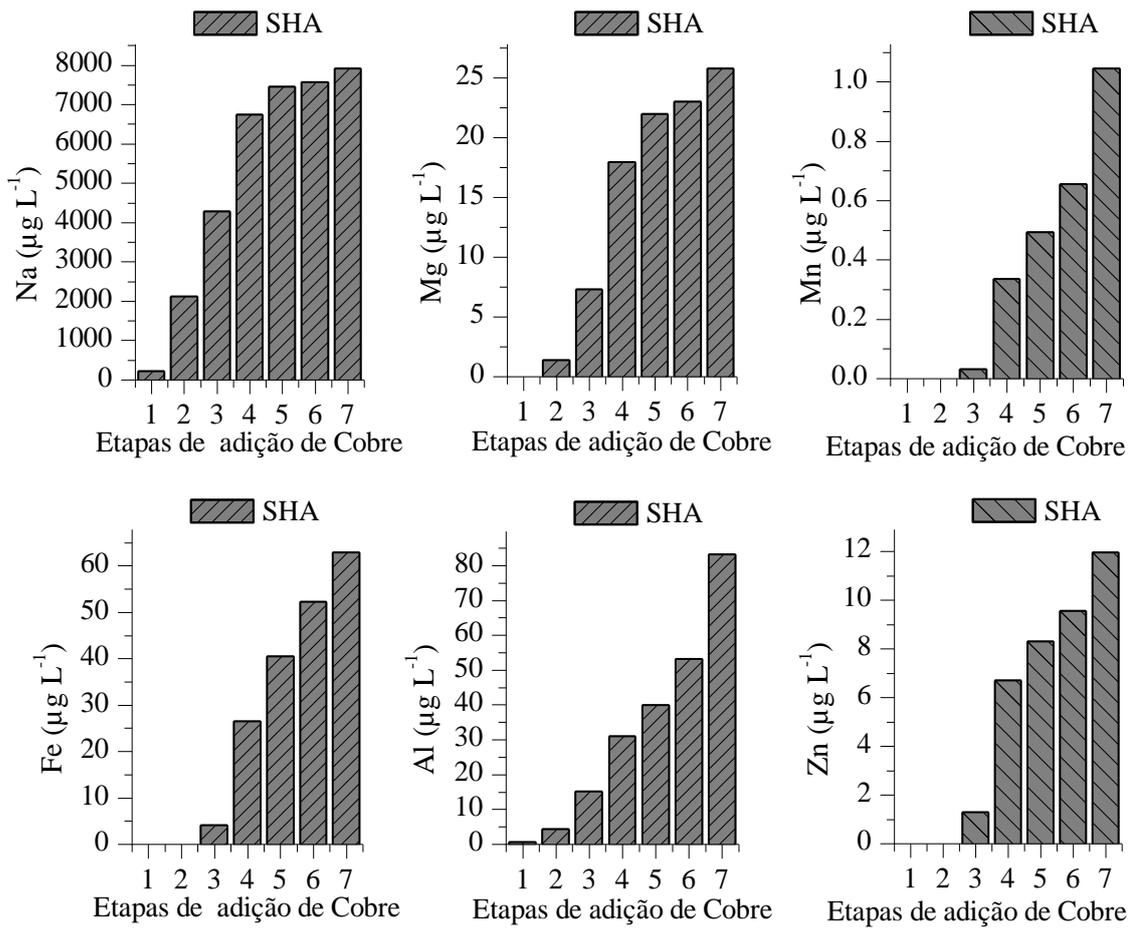


Figura 5-8. Comportamento de troca dos metais a cada etapa de adição linear de cobre. As concentrações utilizadas para cada etapa de adição foram; 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40  $\text{mg L}^{-1}$  de íons cobre.

Apesar das mudanças, a construção dos gráficos de  $K_{\text{troca}}$  é uma tarefa muito difícil, uma vez o comportamento dinâmico da SHA e provavelmente erros intermináveis contribuem de maneira expressiva para a não linearidade dos gráficos de  $K_{\text{troca}}$ . A Figura 5-9 mostra os gráficos de  $K_{\text{troca}}$  dos íons Na, Mg, Mn, Fe, Al e Zn obtidos para a SHA.

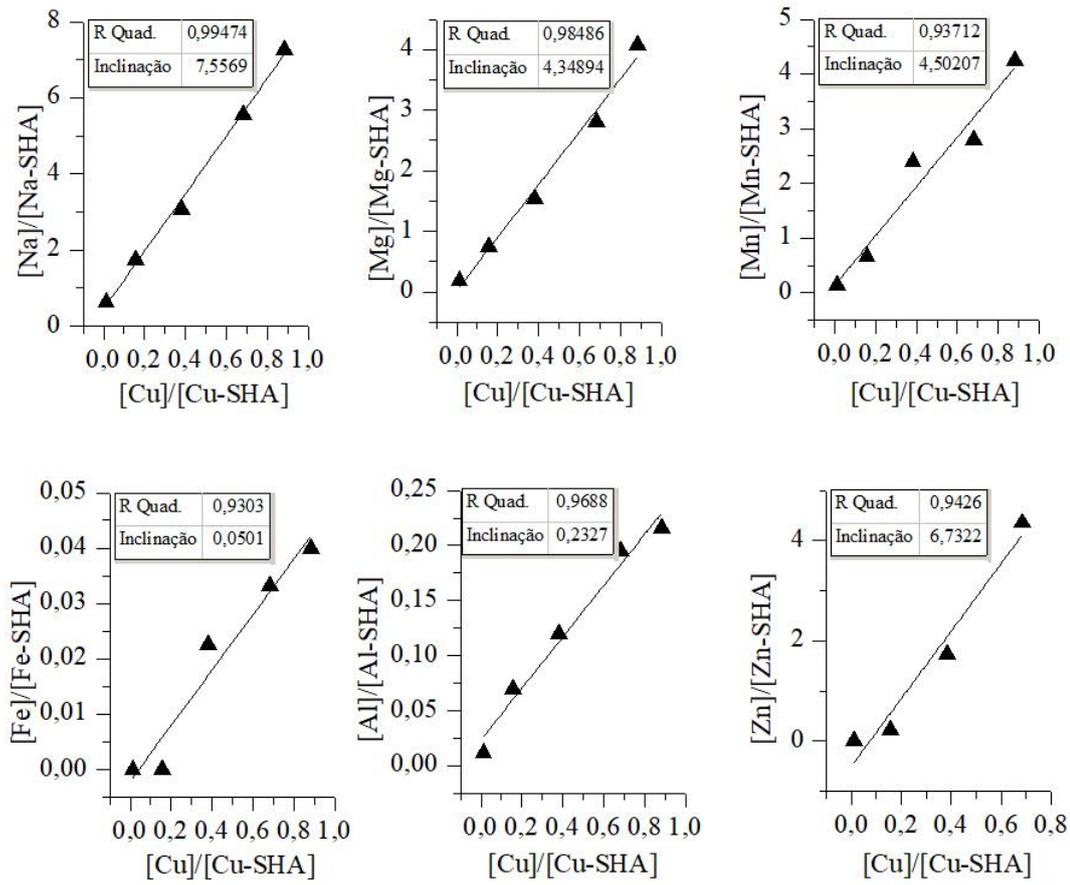


Figura 5-9. Gráficos de Ktroca dos íons livres Na, Mg, Mn, Fe, Al e Zn obtidos para a SHA após adição linear de cobre.

Entretanto, para os gráficos de  $K_{troca}$  das frações, AH e AF, não foi possível construir gráficos com valores de R quadrado aceitáveis (Figura 5-8 e Figura 5-11), mesmo após a mudança da forma de adição de cobre.

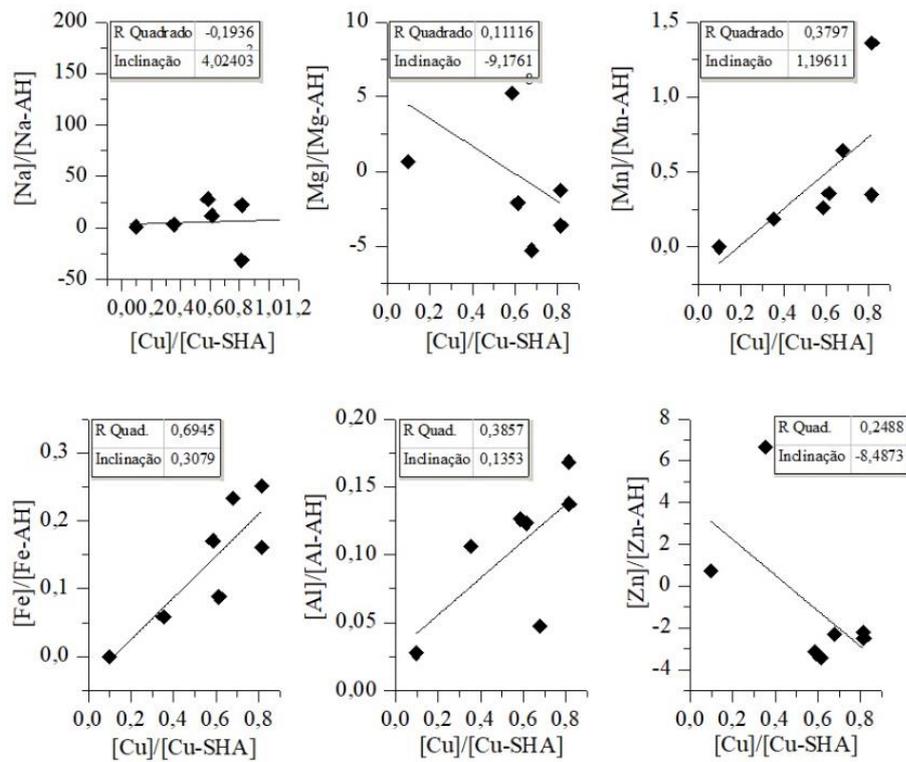


Figura 5-8. Gráficos de Ktroca dos íons livres Na, Mg, Mn, Fe, Al e Zn obtidos para a AH após adição linear de cobre.

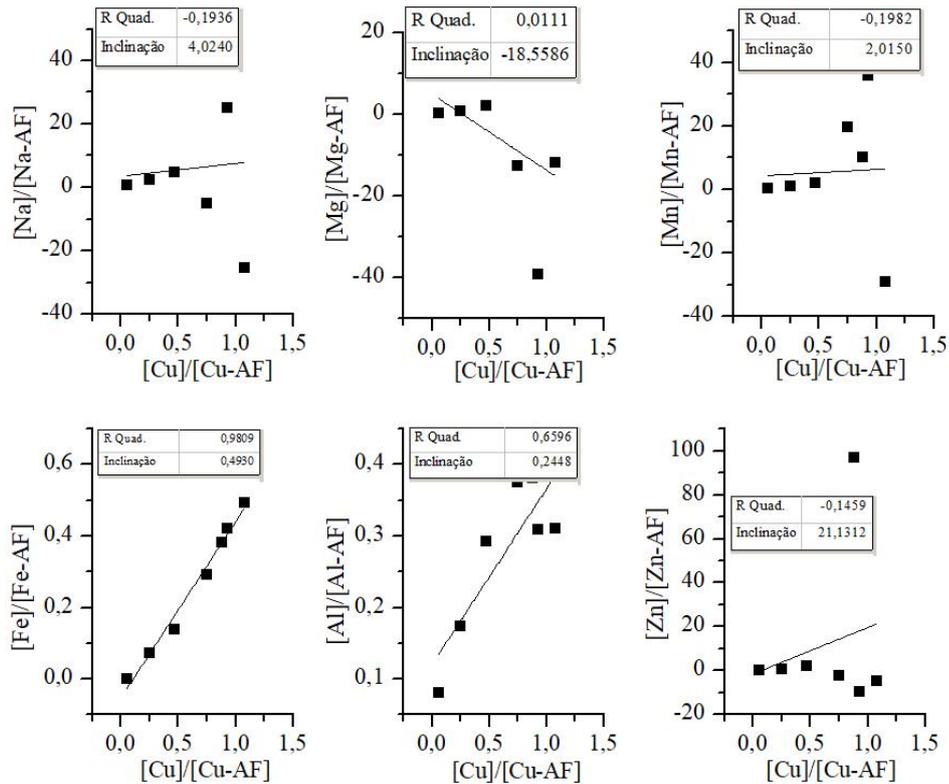


Figura 5-11. Gráficos de Ktroca dos íons livres Na, Mg, Mn, Fe, Al e Zn obtidos para a AF após adição linear de cobre.

As razões da não linearidade esperada para os gráficos das frações de AH e AF são insertas. Uma provável explicação para isto pode ser a diferença nos níveis de concentração entre os íons trocados e os íons de cobre adicionados, já que a concentração dos íons trocados se encontram próximas dos limites de detecção do equipamento utilizado na quantificação e a concentração dos íons de cobre encontra-se em valores que podem estar cerca de 100 vezes mais elevadas dependendo do íon trocado comparado. Essa diferença pode interferir na avaliação do comportamento de troca desses íons de menor concentração, uma vez que os erros da determinação dos íons de cobre podem ser maiores que as próprias concentrações do íon trocado.

#### **5.4 Método de ranqueamento da labilidade dos íons metálicos por integrais**

Para minimizar a interferência da imprecisão na determinação de cobre, e conseqüentemente no ranqueamento da labilidade dos íons complexados pela SHA, escolheu-se por fazer o ranqueamento usando apenas o aumento proporcional da concentração dos íons livres com parâmetro, já que as concentrações dos íons livres se encontram relativamente próximas e suas determinações foram mais precisas.

O novo ranqueamento tem como princípio o cálculo das integrais das curvas de tendências resultantes do *plot* da concentração dos íons livres (termo dependente) pela sequência das etapas de adição de cobre (termo independente). Para amostra reais, deve-se primeiro determinar as concentrações de íons totais em solução antes da primeira adição de cobre. Feito isto, é preciso determinar concentração dos íons livres antes da primeira adição de cobre, que é o filtrado no UF-FT antes da adição, em seguida, as adições de cobre são feitas e as alíquotas do filtrados, a cada etapa, são coletadas e analisadas. Os resultados das concentrações dos metais analisados são calculados em termos percentuais ao total determinado antes da adição de cobre, fazendo o desconto da concentração dos íons livres antes da adição. Após isto, são geradas novas curvas da subida da concentração dos íons, plotando os valores percentuais obtidos como termo dependente e as etapas de adição de cobre como termo independente. Com os novos gráficos plotados, é calculado as integrais de cada curva e esses valores de integrais obtidos são utilizados para fazer o ranqueamento da labilidade. Maiores valores da integral estão associados a maior troca entre os íons de cobre e as espécies metálicas, originalmente complexadas, e conseqüentemente a maior labilidade desses íons.

Esse modelo de ranqueamento foi testado usando curvas hipotéticas polinomiais de 2º ordem  $y = ax^2 + bx - c$  geradas a partir de alguns dos melhores resultados já obtidos para íons

reais (onde “x” representa a etapa de adição de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e “y” representa a concentração de um dado íons livres qualquer) fazendo apenas variações no coeficiente “b” das curvas com o intuito de simular o comportamento de íons de diferente labilidade. Com os valores hipotéticos de concentração obtidos para os íons hipotéticos A, B, C e D (Tabela 5-5) foi plotado um gráfico das concentrações desses íons pelo aumento da concentração de cobre livre (Figura 5-12) e posteriormente feito os cálculos das integrais usando a Equação 8, onde  $E_j$  é número da etapa de adição de íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $C_j$  a concentração do íon livre hipotético em cada etapa de adição de íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Com as integrais já determinadas, os íons livres hipotéticos foram ordenados em ordem decrescente, usando os valores das integrais calculadas, partindo do princípio de que quanto maior for o valor da integral, maior será a troca com íons cobre, isto é, quanto maior for o aumento da concentração dos íons livres a cada etapa de adição de cobre, maior será a inclinação da curva resultante e consequentemente maior sua área.

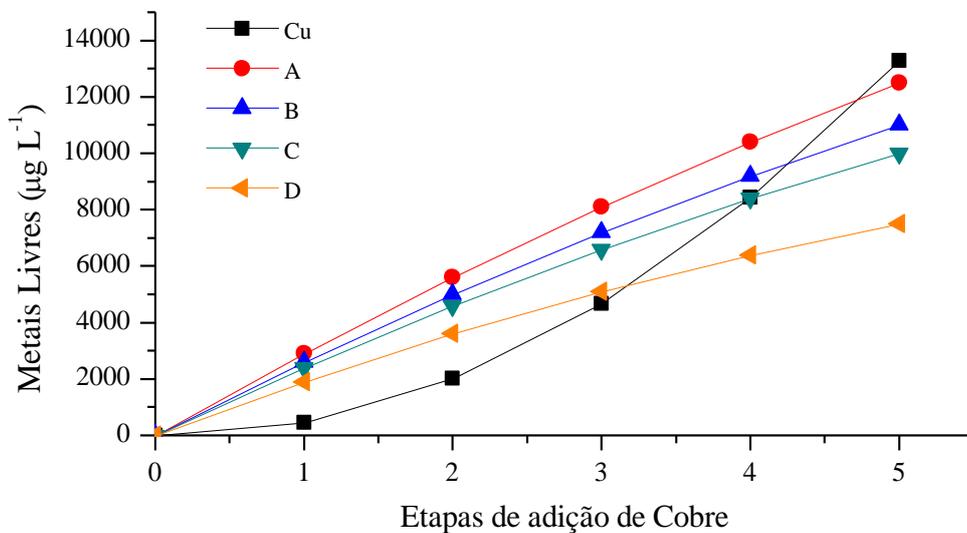


Figura 5-12 Curvas das concentrações dos íons hipotéticos A, B, C e D em cada etapa de adição de cobre, para obtenção dos valores de integrais para os íons hipotéticos.

$$\begin{aligned} \text{Área} = & (E_1 - E_0) \times \left( \frac{\left(\frac{C_0}{C_T}\right) \times 100 + \left(\frac{C_1}{C_T}\right) \times 100}{2} \right) + (E_2 - E_1) \times \left( \frac{\left(\frac{C_1}{C_T}\right) \times 100 + \left(\frac{C_2}{C_T}\right) \times 100}{2} \right) + \\ & (E_3 - E_2) \times \left( \frac{\left(\frac{C_2}{C_T}\right) \times 100 + \left(\frac{C_3}{C_T}\right) \times 100}{2} \right) + \dots + (E_n - E_{n-1}) \times \left( \frac{\left(\frac{C_{n-1}}{C_T}\right) \times 100 + \left(\frac{C_n}{C_T}\right) \times 100}{2} \right) \end{aligned} \quad (7)$$

ou

$$\text{Área} = \frac{50}{C_T} \sum_{j=1}^n \left( (E_j - E_{j-1}) \times (C_{j-1} - C_j) \right) \quad (8)$$

Tabela 5-5. Valores de concentração hipotéticos para os íons A, B, C e D utilizados para a construção das curvas de aumento da concentração de íons livre após adição de íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Os valores de concentração dos íons A, B, C e D foram obtidos após a modificação do coeficiente b da equação  $y = -100x^2 + 3000x - 2 \cdot 10^{-11}$  utilizada como modelo.

Íon	[Cu]	[A]	[B]	[C]	[D]
Em solução	0	20000	20000	20000	20000
Livre antes da adição	0	0	0	0	0
1º adição	459	2900	2600	2400	1900
2º adição	2018	5600	5000	4600	3600
3º adição	4677	8100	7200	6600	5100
4º adição	8436	10400	9200	8400	6400
5º adição	13295	12500	11000	10000	7500
a*		-100	-100	-100	-100
b*		3000	2700	2500	2000
c*		0	0	0	0

\* Coeficientes da equação polinomial de 2º ordem  $y = ax^2 + bx - c$ .

Paralelamente, usando os valores hipotéticos de concentração, foi construído gráficos da razão [íon]/[SHA-íon] pela razão [Cu]/[SHA-Cu] para obtenção dos valores de  $K_{\text{troca}}$  através das inclinação da curva resultante (Figura 5-13). Com os valores de  $K_{\text{troca}}$  determinados, os íons hipotéticos foram também ordenados de maneira decrescente, isto é, quanto maior o valor de  $K_{\text{troca}}$  maior será a labilidade do metal.

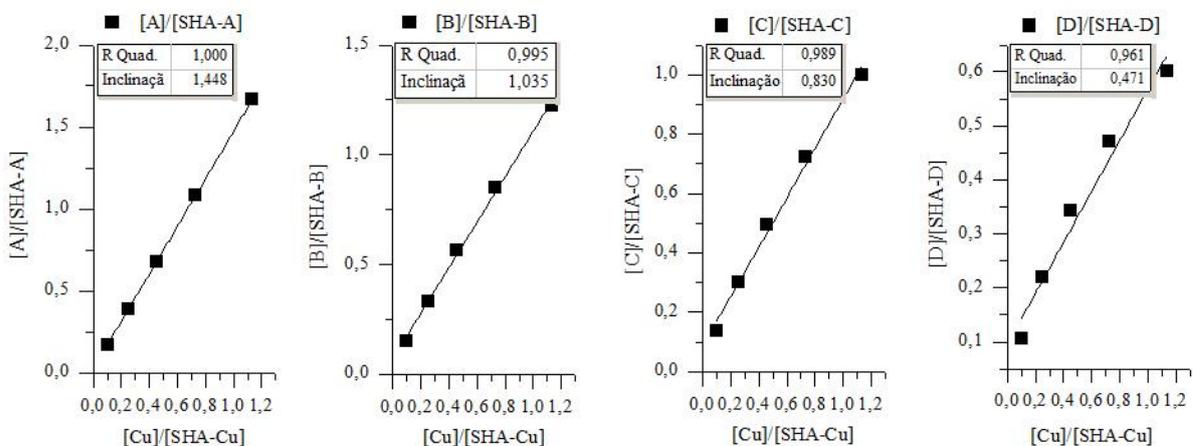


Figura 5-13. Curvas de  $K_{\text{troca}}$  obtidas usando as concentrações hipotéticos dos íons A, B, C e D.

A Tabela 5-6 mostra dos valores obtidos nos dois métodos de ranqueamento da labilidade para os íons hipotéticos. Os valores absolutos encontrados tanto para as constantes

de  $K_{troca}$  quanto para os valores de Integrais no método hipotético servem apenas para fazer o ranqueamento da labilidade, não sendo comparáveis entre si. É possível notar que os dois métodos geram a mesma ordem de labilidade para os íons. Dessa forma optou-se por usar o método de ranqueamento proposto já que esse não leva em consideração a concentração de íons cobre livre.

**Tabela 5-6. Resultados de  $K_{troca}$  e das integrais obtidos para os métodos de ranqueamento utilizados.**

<b><math>K_{troca}</math> em ordem decrecente</b>	<b>Íons hipotéticos</b>	<b>Integrais em ordem decrecente</b>	<b>Íons hipotéticos</b>
<b>1,4480</b>	A	<b>1,6625</b>	A
<b>1,0346</b>	B	<b>1,4750</b>	B
<b>0,8305</b>	C	<b>1,3500</b>	C
<b>0,4713</b>	D	<b>1,0375</b>	D

## **5.5 Variação da labilidade de íons metálicos após tempo de adição de íons metálicos à solução de SHA.**

A labilidade das espécies metálicas adicionadas à uma solução de 500 mL de SHA 100 mg L<sup>-1</sup> foi avaliada após adição de 500 µL de solução multielementar descrita no item 4.8.2.1. Esses experimentos de trocas de metais por íons de cobre foram feitos em 4 momentos distintos, 1, 2, 3 e 30 dias após adição de metais, com o objetivo de averiguar se há variação da labilidade de espécies metálicas em diferentes momentos após a adição de certa quantidade de íons metálicos.

A Figura 5-14 mostra a variação da labilidade dos íons metálicos em 30 dias. É possível notar que íons metálicos Ca, Zn, Pb e Fe são os que mais sofreram variação da sua labilidade nos três primeiros dias. Já os íons metálicos Na, Ni, Mn, Co, Cd, Ba e Al sofreram pouca ou quase nenhuma variação da sua labilidade nos três primeiros dias.

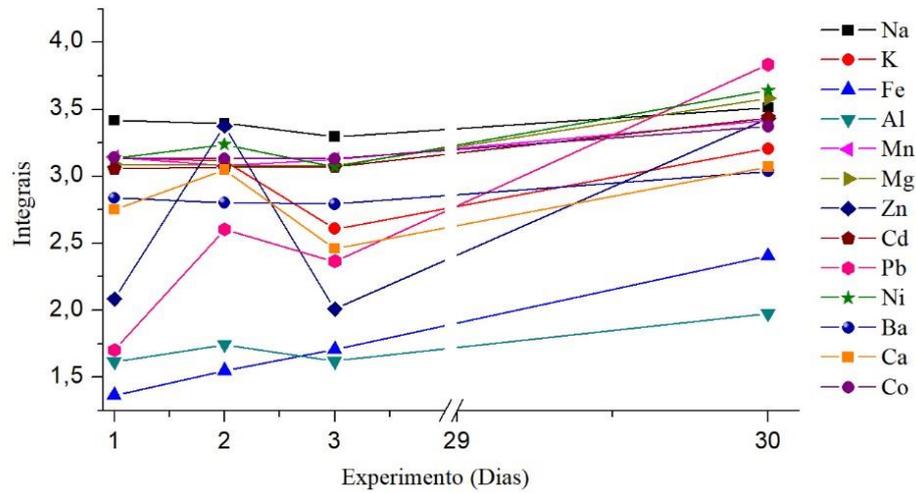


Figura 5-14. Variação da labilidade dos íons metálicos na amostra de SHA nos diferentes dias.

Em geral, todos os elementos estudados tiveram aumento da sua labilidade após 30 dias de adição dos seus íons, especialmente os íons de Pb, Fe e Zn que tiveram aumento da sua labilidade respectivamente em 2,23; 1,76; 1,70 vezes.

A Tabela 5-7 mostra a variação da ordem de labilidade dos íons metálicos nos 30 dias de experimento usando o cálculo da labilidade relativa por integral de íons livre. No geral, a comparação da variação da labilidade dos íons metálicos é uma tarefa bastante complicada, uma vez que a ordem de labilidade dos diversos íons estudados variou significativamente. Essa variação provavelmente acontece pela proximidade dos valores das suas integrais e pela proximidade dos resultados com o limite de detecção da quantificação dos metais por ICP-OES. Entretanto, algumas observações podem ser feitas, já que foi possível observar que íons de Fe e Al, nos diferentes dias testados, figuram como os íons de menor labilidade, e os íons de Na, em geral, aparecem como os íons de maior labilidade.

Tabela 5-7. Ordem de labilidade dos metais nos diferentes dias.

Dias	Labilidade dos elementos
1	Na > Mn = K = Co = Ni > Mg = Cd > Ba > Ca > Zn > Pb > Al > Fe
2	Na = Zn > Ni > Co = K > Mg = Mn = Cd = Ca > Ba > Pb > Al > Fe
3	Na > Co = Mn > Mg > Ni = Cd > Ba > K > Ca > Pb > Zn > Fe > Al
30	Pb > Ni > Mg > Na > Cd = Zn > Mn > Co > K > Ca > Ba >> Fe >> Al

Se tomarmos com base de comparação a ordem decrescente de labilidade dos elementos estudados nos diferentes dias do experimento, é possível notar que após 30 dias da adição dos íons, houve aumento da labilidade de todos os íons Tabela 5-8

**Tabela 5-8. Ordem decrescente de labilidade nos diferentes dias para cada elemento.**

<b>Elemento</b>	<b>Ordem de labilidade nos dias (Dias)</b>
<b>Na</b>	30 > 1 > 2 > 3
<b>K</b>	30 > 1 > 2 > 3
<b>Mg</b>	30 > 1 > 2 > 3
<b>Ba</b>	30 > 1 > 2 > 3
<b>Ca</b>	30 > 2 > 1 > 3
<b>Fe</b>	30 > 3 > 2 > 1
<b>Al</b>	30 > 2 > 3 > 1
<b>Mn</b>	30 > 1 > 3 > 2
<b>Zn</b>	30 > 2 > 1 > 3
<b>Pb</b>	30 > 2 > 3 > 1
<b>Ni</b>	30 > 2 > 1 > 3
<b>Cd</b>	30 > 3 > 2 > 1
<b>Co</b>	30 > 1 > 2 > 3

Os resultados reafirmam o sugerido no trabalho de Sargentini (2001) que em seu trabalho mostrou que a adição de íons metálicos, nos primeiros dias, provoca grande desordem na distribuição de metais na estrutura da SHA, e como consequência, provoca a variação da sua labilidade, e que com o passar dos dias o estado natural de distribuição dos íons metálicos tendem a ser reestabelecido.

No presente trabalho pode-se sugerir que um tempo repouso de 30 dias, após a adição de íons metálicos à solução de SHA, melhora a representatividade dos experimentos com a SHA de ambientes aquáticos. Porém em experimentos ambientais o tempo de 30 dias é muito longo, então para melhor comparação da labilidade nesse tipo de experimento pode se sugerir a padronizar do tempo de análises após adição de íons metálicos à soluções de SHA

## 5.6 Variação da labilidade de íons metálicos na amostra de SHA e suas frações

Para melhor compreensão da contribuição de cada fração da SHA no seu comportamento de troca de metais, as frações duas frações majoritárias de SHA, ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF) foram isoladas e a labilidade dos íons metálicos em suas estruturas foram estudadas utilizando o método de UF-FT e utilizando o método de ranqueamento da labilidade dos íons metálicos por integrais. A Tabela 5-9 apresenta os valores das integrais calculadas para elemento nas diferentes amostras.

Tabela 5-9. Valores das integrais para os íons metálicos nas diferentes amostras.

Amostra	Na	Mg	Pb	Mn	Zn	Fe	Al	Ba
SHA	1,40	1,34	0,81	1,09	1,09	0,05	0,26	0,62
AH	1,94	1,85	1,06	1,76	1,44	0,21	0,29	1,55
AF	4,32	3,37	4,36	1,88	3,99	0,31	0,55	4,65

Com os valores das integrais calculados foram plotados os gráficos mostrados na Figura 5-15 onde é possível comparar a diferença na labilidade dos diversos íons metálicos estudados na amostra de SHA e suas frações. Os íons de Al e Fe são os que possuem menor labilidade na amostra de SHA e essa afirmação também se mostrou verdadeira na fração AH e AF, ou seja, pode-se afirmar que as duas frações contribuem para menor labilidade desses íons na SHA.

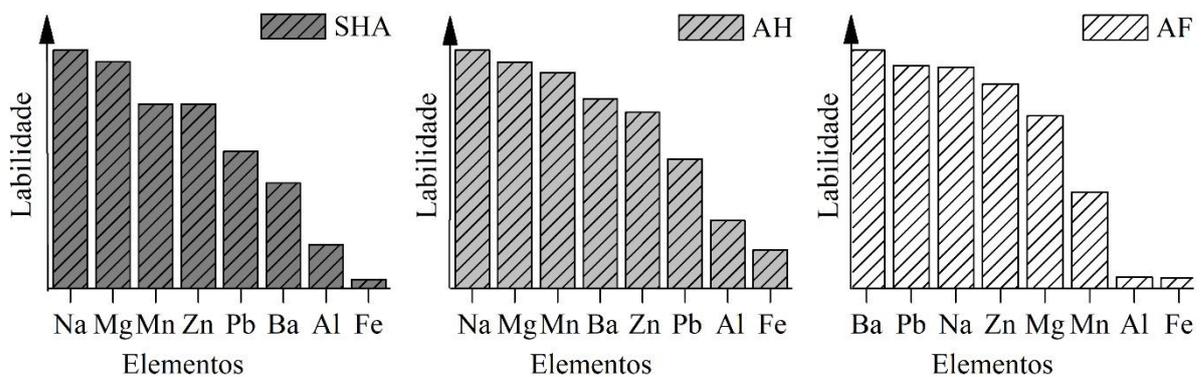


Figura 5-15. Diferença da labilidade dos íons metálicos na amostra de SHA e nas suas frações AH e AF.

Quando comparamos os íons Na, Mg e Mn, observamos que na SHA e AH são os íons de maior labilidade, e não podemos fazer a mesma afirmação para suas duas frações. Na fração AF os íons Na, Mg e Mn são respectivamente o 3º, 5º e 6º íons de maior labilidade, mas na SHA e na fração AH são respectivamente o 1º, 2º e 3º íons mais lábeis. Isso eleva a falsa suposição de que, na SHA, a fração AH é a principal contribuinte para maior labilidade desses íons e que a fração AF tem a menor contribuição, porém nesse tipo de suposição não é levando em consideração o comportamento dinâmico das interações entre as macromoléculas de AH e AF na estrutura da SHA, a mudança das propriedades polieletrólíticas da SHA e suas fração com a adição de íon cobre, razões de suas concentrações, e a distribuição da concentração de íons metálicos nas duas frações.

Ainda que não se possa fazer afirmações sobre a contribuição das frações AH e AF na labilidade dos íons metálicos da SHA, é possível conhecer em qual fração da SHA um íon metálico específico é mais lábio proporcionalmente. Usando os valores das integrais calculados foi ordenado em qual fração um dado íon metálico é mais lábil (Tabela 5-10). A fração de AF possui a maior labilidade de íons metálicos para quase todos os metais estudados exceto para os íons Fe e Al, que são mais lábeis na fração AH. Já a amostra de SHA tem seus íons metálicos menos lábeis quando comparado proporcionalmente com soluções de suas frações na mesma concentração. Esses resultados sugerem que é a presença simultânea das frações AH e AF que conferem a SHA um maior poder complexante.

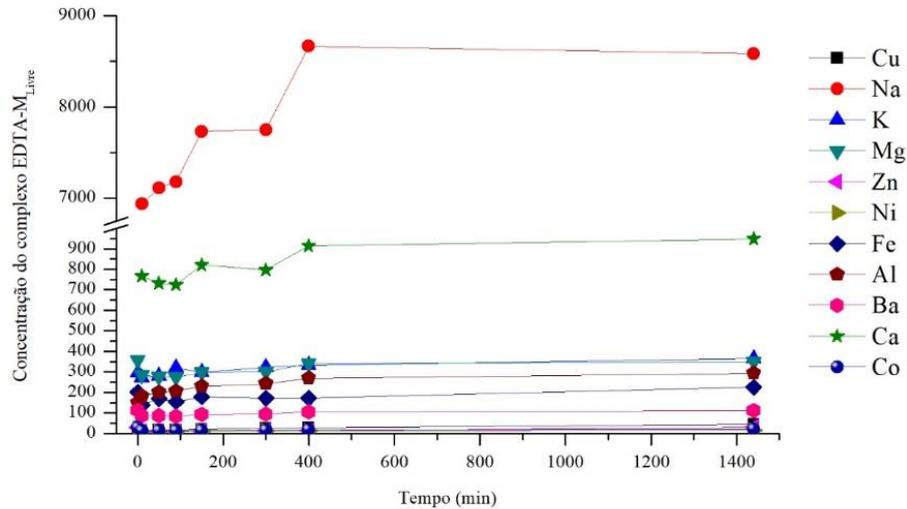
**Tabela 5-10. Ordem de labilidade decrescente dos íons metálicos nas diferentes frações.**

Elemento	Ordem de labilidade decrescente dos íons metálicos nas diferentes frações.
Na	AF > AH > SHA
Mg	AF > AH > SHA
Pb	AF > AH > SHA
Mn	AF > AH > SHA
Zn	AF > AH > SHA
Ba	AF > AH > SHA
Fe	AH > AF > SHA
Al	AH > AF > SHA

### 5.6.1 Troca de metais entre SHA e EDTA

A competição de íons metálicos originalmente complexadas na SHA pode ser averiguada usando o complexante EDTA, conhecido por formar com muitos íons metálicos complexos 1:1 com alta estabilidade termodinâmica. Os complexos de EDTA com os íons metálicos estudados são menores que um 1 kDa e, portanto, são filtrados com facilidade, já os

complexos de SHA-M são maiores que 10 kDa e por isso não passam pela membrana de ultrafiltração de 1 kDa. Esse experimento é utilizado para fazer a comparação das trocas de metais originalmente complexados frente a outros tipos de complexantes.



**Figura 5-16. Variação da concentração do complexo EDTA-M com o tempo.**

A Figura 5-16 mostra a subida da concentração da espécie EDTA-M com a variação do tempo. É possível notar que para todos os íons, após 400 min de adição do EDTA, é atingida a estabilidade dentre os complexos de SHA-M e EDTA-M. Para melhorar a comparação da competição entre as espécies de íons metálicos foi preciso analisar variação da razão da concentração  $(C_L - C)/C_L$ , onde  $C_L$  é a concentração de os íons metálicos livres no equilíbrio EDTA-M/SHA-M e  $C$  é a concentração de EDTA-M determinada nos diferentes tempos (Figura 5-17). Isso se faz necessário por que os níveis de concentração de alguns íons metálicos são bem distintos.

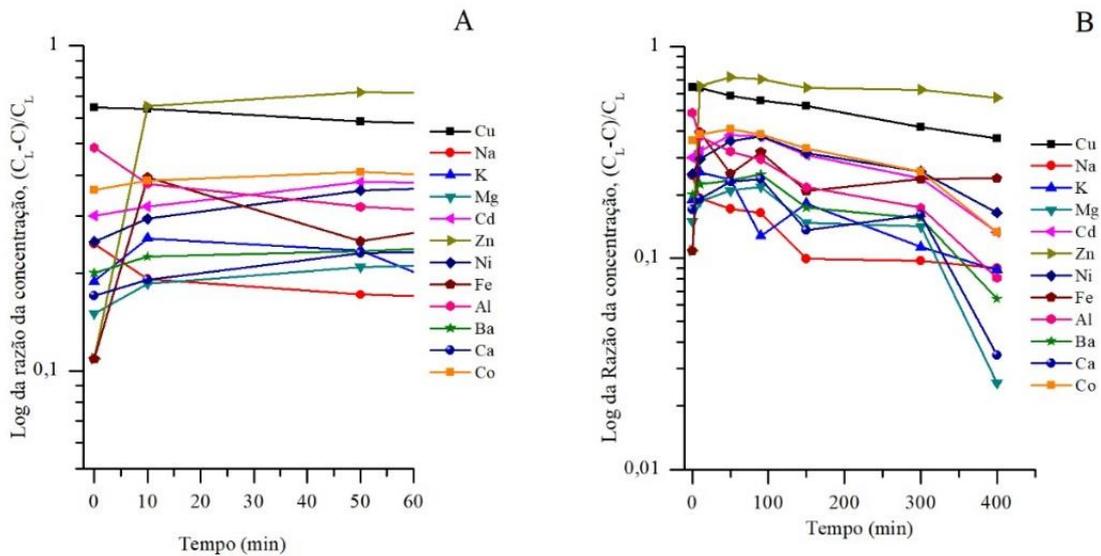


Figura 5-17. Log da razão da concentração  $(C_L-C)/C_L$ . A; Nos primeiros 60 min. B; Nos primeiros 400 min.

Na Figura 5-17A é possível notar que surpreendentemente nos primeiros 10 min a adição de EDTA provocou um aumento na complexação dos íons metálicos Zn, Co, K e Mg pela SHA, mas que passado esse tempo, a troca do metais do complexo SHA-M para EDTA continua até atingir o tempo de 400 min apresentado na Figura 5-17B. Menores valores da razão  $(C_L-C)/C_L$  estão relacionados a maior proximidade do equilíbrio de troca entre EDTA-M/SHA-M, ou seja, é possível dizer que tempo de 400 min metais como Mg, Ca, Ba já estão praticamente trocados e são o que possuem maior troca para a molécula de EDTA, enquanto metais como Zn e Cu ainda não estão no equilíbrio e por isso são os menos trocados para o EDTA. A ordem de estabilidade encontrada nesse experimento no tempo de 400 min após adição de EDTA foi  $Mg > Ca > Ba > Al \approx Na \approx K > Co \approx Cd > Ni > Fe > Cu > Zn$ .

Esses resultados reforçam a ideia da SHA como agente redutor de toxicidade no ambiente aquático, uma vez que metais como Cu, Zn e Fe, que são metais que podem agir como contaminantes ambientais, não são facilmente trocados e por tanto são menos disponíveis nesses ambientes. A menor labilidade encontrada para esses íons pode ser explicada, segundo a teoria de HSAB (do inglês: *Hard-Soft Acids-Bases*) introduzida por Person em 1973, que diz que esses metais são considerados de dureza intermediária e que ligados com SHA, que por sua vez pode ser considerada como base mole, formam complexos estáveis. Já íons Mg, Ca e Ba, que são considerados metais duros, em ligação com bases moles (ex. SHA) formam complexos menos estáveis (HO, 1977) e que confere a maior labilidade desses íons.

## 5.7 Efeito da complexação de íons cobre pela SHA e suas frações na redução de toxicidade aguda

A complexação de metais pela SHA e suas frações alteram de forma significativa a labilidade de íons metálicos em solução e conseqüentemente a sua disponibilidade para interação com diversas espécies químicas, porém pouco se sabe sobre como essa variação da complexação dos íons metálicos pela SHA e suas frações alteram parâmetros biológicos como índices de toxicidade da biota aquática. Já é bem conhecido que a SHA e suas frações possuem o poder redutor de toxicidade graças a forte interação com diversos íons metálicos, porém ainda não se sabe como mudanças de concentração da SHA e na proporção suas frações alteram seu poder redutor. Para verificar como a concentração e composição SHA alteram os parâmetros de toxicidade, no presente trabalho foram feitas uma serie de teste buscando determinar a redução da toxicidade de íons cobre provocada pela presença de SHA em organismo de teste *Artêmia Salina* sp.

### 5.7.1 Toxicidade aguda de íons cobre

A Tabela 5-11 mostra de forma simplificada, os resultados obtidos durante os testes com soluções de íons cobre nas concentrações de 0 a 50 mg L<sup>-1</sup>, após 24 horas de exposição às *Artemias*.

Tabela 5-11. Índice de mortalidade nas concentrações de íons cobre testadas.

Concentrações de Cu <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Índice de mortalidade (%)	Concentrações de Cu <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Índice de mortalidade (%)
5	1,3	18	46,9
10	18,8	19	56,7
11	14,4	20	68,8
12	18,8	25	88,1
13	31,9	30	82,5
14	28,8	35	82,5
15	30,6	40	88,8
16	43,1	45	86,3
17	42,5	50	98,8

A partir da concentração de 19 mg L<sup>-1</sup> todas as concentrações testadas resultaram em mais de 50 % de mortalidade na população de *Artemias*, sendo assim, essa concentração foi adotada como CL<sub>50</sub> de cobre e foi a concentração utilizada como referência para avaliar a redução dos índices de mortalidade provocada pela presença da SHA.

### 5.7.2 Determinação da toxicidade aguda da substância húmica aquática

Os resultados obtidos para as concentrações testadas de SHA, estão expostos de forma simplificada na Tabela 5-12. Esse experimento não foi possível determinar com precisão a CL<sub>50</sub> para a SHA.

Tabela 5-12 Teste de toxicidade da substância húmica aquática (SHA).

Concentrações de SHA (mg L <sup>-1</sup> )	[SHA] mg L <sup>-1</sup>	
	Índice de mortalidade médio	Desvio padrão
10	0,0	0,0
50	0,0	0,0
100	0,0	0,0
200	0,0	0,0
400	0,0	0,0
600	100,0	0,0

O valor da CL<sub>50</sub> não foi determinado com precisão para SHA devido à baixa massa de material disponível para mais ensaios, entretanto, a CL<sub>50</sub> parece se encontrar em concentrações entre 400 mg L<sup>-1</sup> a 600 mg L<sup>-1</sup>. Apesar da não determinação da CL<sub>50</sub>, os resultados obtidos mostram que a SHA em concentrações abaixo da concentração de 400 mg L<sup>-1</sup> podem ser utilizadas sem provocarem falsos positivos nos ensaios de redução toxicidade de cobre, além disso, concentrações em faixas superiores 50 mg L<sup>-1</sup> de SHA não são encontradas em rios de águas doce como no caso do rio Negro, que possuem concentração entre a faixa de 15 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Para todos os ensaios de redução da toxicidade aguda de íons cobre, foi utilizada a concentração máxima 100 mg L<sup>-1</sup> de SHA uma vez que concentrações mais altas não são normalmente esperadas em rios de água doce.

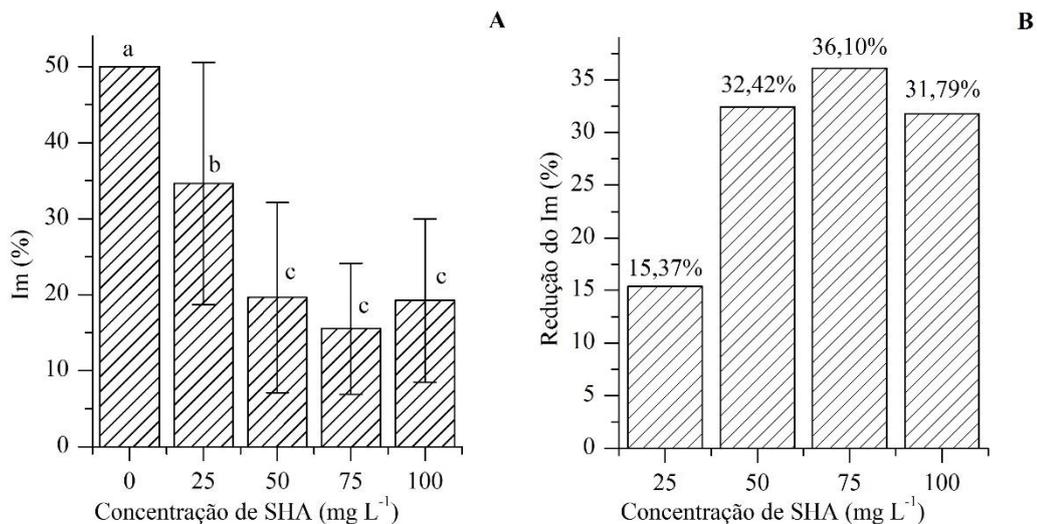
### 5.7.3 Avaliação da redução da toxicidade aguda do íon cobre por SHA

Os resultados obtidos para os testes com as concentrações de 25 a 100 mg L<sup>-1</sup> de SHA, em mistura com íons Cobre na CL<sub>50</sub> estão expostos na Tabela 5-13. A concentração mais baixa de SHA, em geral, resultou em índices de mortalidade cerca de duas vezes mais altos quando comparadas as demais concentrações deste teste, porém em todas as concentrações testadas foi observado redução dos índices de mortalidade quando comparados ao teste sem adição da SHA.

**Tabela 5-13** Redução da toxicidade do íon cobre (19 mg L<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações da substância húmica aquática SHA.

Cobre + SHA (mg L <sup>-1</sup> )		
Concentrações de SHA (mg L <sup>-1</sup> )	Índice de mortalidade médio (%) (n=48)	Desvio padrão
25	34,2	3,5
50	15,2	1,6
75	12,2	1,5
100	17,2	0,5

A Figura 5-18A mostra a aplicação do teste de variancia de Fisher aos resultados obtidos para o índice de mortalidade das *Artemias* em cobre (19 mg L<sup>-1</sup>) nas diferentes concentração de SHA testadas. A primeira barra representa o índice de mortalidade de cobre na CL<sub>50</sub> já determinada (19 mg L<sup>-1</sup>) antes da adição de SHA. Já a Figura 5-18B faz um comparativo da redução do índice de mortalidade com o aumento da concetração da SHA.



**Figura 5-18** Gráfico para o teste de redução da toxicidade de íons cobre na concentração de 19 mg L<sup>-1</sup> pela substância húmica aquática (SHA) em diferentes concentrações. A) Índice de mortalidade (Im) nas diferentes concentrações da SHA testadas; B) Redução do índice de mortalidade em cada concentração da SHA testada. Letras minúsculas diferentes nas barras representam variações significativas segundo o teste de Fisher com *p-value* < 0,05.

Após adição de íons cobre de 19 mg L<sup>-1</sup> (CL<sub>50</sub>), para todas as concentrações estudadas, os índices de mortalidade obtidos foram menores que a CL<sub>50</sub>, reafirmando assim o caráter redutor de toxicidade de SHA. Na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup> da SHA houve redução do *Im* em 15,37 % e ao dobrar sua concentração, foi reduzindo para 32,42 %, entretanto, um novo aumento da concentração de SHA não resultou, significativamente, em uma maior redução do *Im* para as *Artemias*. Esse resultado mostra que o aumento gradativo da concentração da SHA não significa um maior poder redutor de toxicidade aguda do meio, mesmo que teoricamente, em concentração mais altas da SHA, seja esperado maior complexação de íons cobre resultando em menor disponibilidade do mesmo. Efeitos como a enovelção da SHA em altas concentrações ou troca de íons de cobre por outros íons potencialmente mais tóxicos podem justificar o observado (MCDONALD et al., 2004; SWIFT, 1989).

Já os resultados dos ensaios de redução da toxicidade na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de cobre são mostrados na Tabela 5-14. Nesse experimento 100 % das *Artemias* morreram na concentração mais alta de SHA testada.

**Tabela 5-14** Redução da toxicidade do íon cobre (30 mg L<sup>-1</sup>) em diferentes concentrações da substância húmica aquática (SHA).

Concentrações de SHA (mg L <sup>-1</sup> )	Cobre + SHA (mg L <sup>-1</sup> )	
	Índice de mortalidade médio (%) (n=48)	Desvio padrão
25	63,0	10,5
50	64,0	0,5
75	64,0	1,7
100	100,0	0,0

A Figura 5-19A mostra a aplicação do teste de variancia de Fisher aos resultados obtidos para o índice de mortalidade das *Artemias* em presença de íons cobre (30 mg L<sup>-1</sup>) nas diferentes concentração de SHA testadas. A primeira barra representa o índice de mortalidade em presença de íons cobre na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> antes da adição de SHA. Já a Figura 5-19B faz um comparativo da redução do índice de mortalidade com o aumento da concetração da SHA.

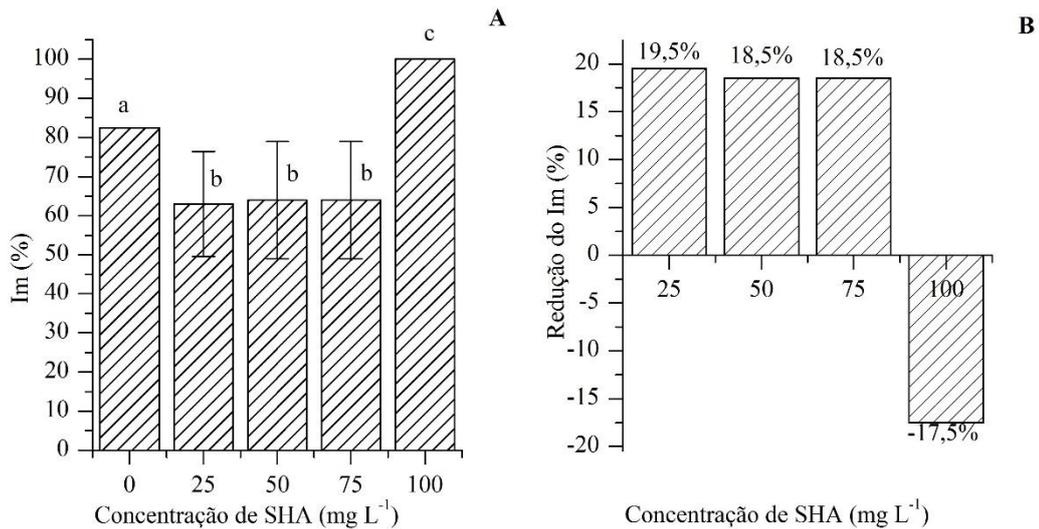
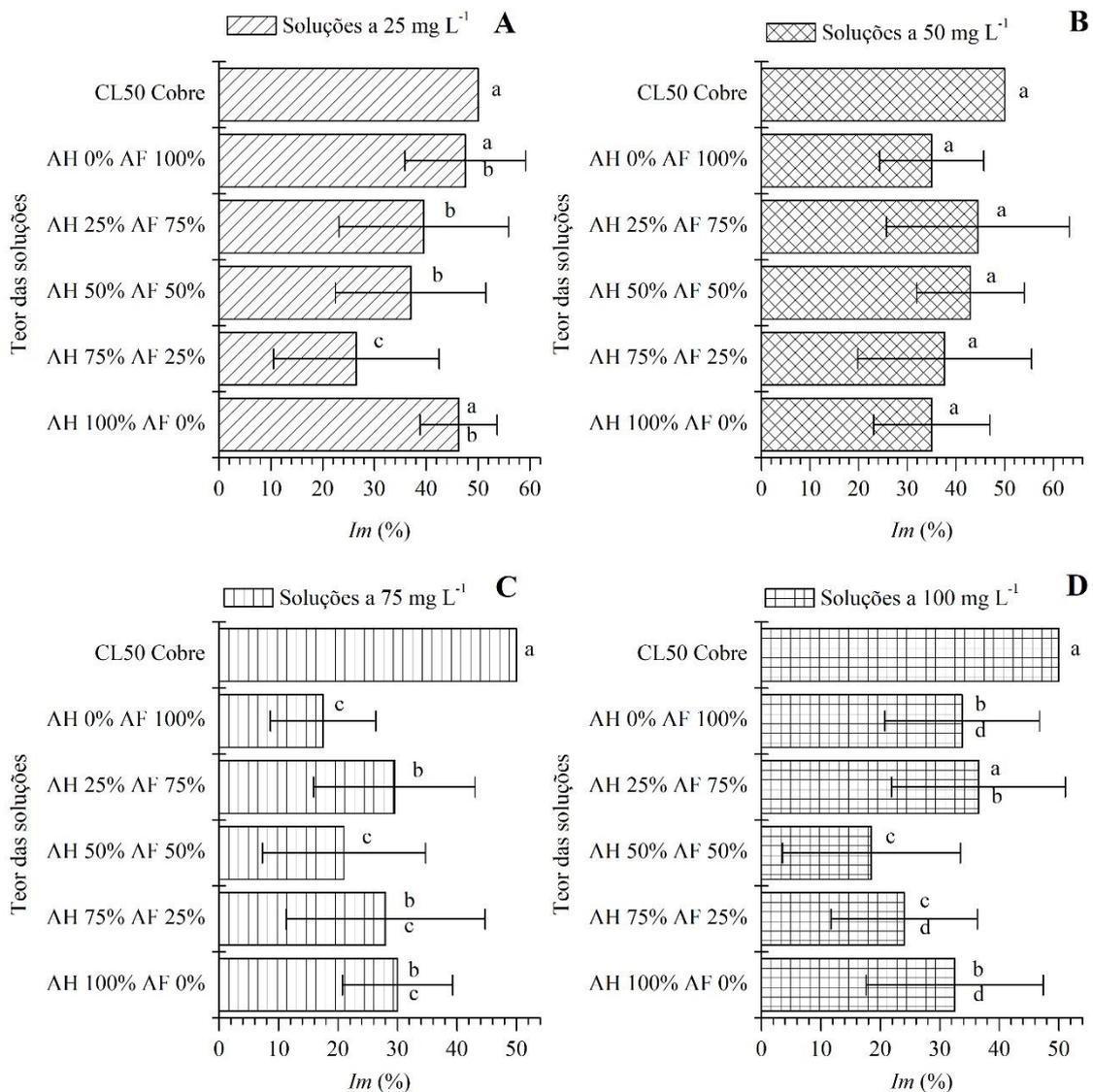


Figura 5-19 Gráfico para o teste de redução da toxicidade de íons cobre na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> pela substância húmica aquática (SHA) em diferentes concentrações. A) Índice de mortalidade (Im) nas diferentes concentrações da SHA testadas; B) Redução do índice de mortalidade em cada concentração de SHA testada. Letras minúsculas diferentes nas barras representam variações significativas segundo o teste de Fisher com *p-value* < 0,05.

Na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de íons cobre, a redução da toxicidade aguda foi menos acentuada quando comparadas com os resultados obtidos para redução de toxicidade aguda na CL<sub>50</sub> de íons cobre. Para todas a concentração testadas de SHA, os índices de mortalidades permaneceram acima da CL<sub>50</sub>. Na concentração de 25, 50 e 75 foi possível observar redução no *Im* de até 23,6%, porém não foi observado aumento significativo do poder redutor de toxicidade aguda entre essa concentração e que surpreendentemente, na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> de SHA, não houve redução de *Im* e sim acréscimo da toxicidade aguda, provocando 100% de mortalidade das *Artemias*. É possível supor que a explicação para o ocorrido esteja relacionada, mais uma vez, ao envelhecimento da estrutura da SHA em altas concentrações, que prova redução dos sítios de ligação da macromolécula. Além disso, é possível também que a complexação de íons cobre em altas concentrações, facilite a liberação de íons metálicos, originalmente complexados na estrutura da SHA (BURBA; ROCHA; KLOCKOW, 1994), potencialmente mais tóxicos para as *Artemias*, provocando assim o incremento da mortalidade.

#### 5.7.4 Avaliação da redução da toxicidade aguda de íon cobre pela SHA com diferentes concentrações e teores de AH e AF

A Figura 5-20 mostra os índice de mortalidade de *Artemias Salina* após adição da SHA em diferentes razões das suas principais frações (AF e AH) e em diferentes concentrações em 19 mg L<sup>-1</sup> de íons Cu<sup>2+</sup>.



**Figura 5-20. Redução dos índices de mortalidade ( $Im$ ) de íons  $Cu^{2+}$  ( $CL_{50} = 19 \text{ mg L}^{-1}$ ) resultante da presença de ácido húmico e fúlvico em diferentes concentrações e proporções de suas misturas. A) Soluções a  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de SHA; B) Soluções a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de SHA; C) Solução a  $75 \text{ mg L}^{-1}$  de SHA; D) Soluções a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de SHA. Letras minúsculas diferentes nas barras representam variações significativas segundo o teste de Fisher com  $p\text{-value} < 0,05$ .**

No ensaio com concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  das diferentes soluções de SHA, não foi observado o comportamento redutor de toxicidade aguda de íons cobre significativo para ambas as frações da SHA isoladas (AH 100 % e AF 100 %). Esse comportamento sugere que frações isoladas da SHA não são boas redutoras de toxicidade aguda. Somente após a mistura das frações AH e AF foi observada redução significativa do  $Im$ . Dessa forma é possível sugerir que independente da proporção de AH e AF na composição da amostra de SHA, a presença simultânea das duas frações é a grande responsável pelo aumento do poder redutor de toxicidade aguda da SHA na concentração de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . Isso pode ser justificado pela diferença no tamanho e na composição da estrutura do AH e AF, que em mistura, podem reduzir espaços

livres na estrutura da SHA e conseqüentemente formar complexos de íons metálicos mais estáveis. Outro comportamento interessante é que, nessa concentração, o aumento da proporção de AH parece melhorar o potencial redutor de toxicidade da amostra, mesmo que discretamente. Infelizmente, todos os experimentos apresentaram desvios padrões elevados, que por sua vez dificultaram interpretação dos resultados e afirmações sobre o comportamento redutor da toxicidade com o acréscimo da fração AH, mas que podem ser utilizados para apontar tendências.

Nos ensaios com diferentes soluções de SHA, nas concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup> a 100 mg L<sup>-1</sup>, todas as soluções (com exceção da solução com 50 mg L<sup>-1</sup>) com diferentes teores de AH e AF apresentaram melhora significativa no poder redutor de toxicidade aguda de íons cobre da SHA. Porém, nessas concentrações, não foi possível afirmar que as frações isoladas de AH e AF são piores redutores de toxicidade aguda quando comparadas as suas misturas, e também que o acréscimo da fração AH melhora o poder redutor de toxicidade aguda em soluções de SHA. É possível dizer que nesses níveis de concentrações das soluções de SHA, os resultados são muito dispersos e isso compromete a avaliação de tendências estatísticas dos resultados. Essas dispersões nos dados podem ser justificadas pelas altas concentrações de SHA utilizadas, que resultam em um maior envelhecimento das estruturas da SHA, reduzindo seus sítios de ligações de íons cobre e também por possíveis trocas de íons cobre por íons metálicos potencialmente mais tóxicos que se encontravam originalmente complexados na estrutura da SHA. Esses resultados são corroborados pelos resultados obtidos no teste com variações simples da concentração de SHA, que também mostrou-se difícil a diferenciação dos resultados em concentrações maiores que 25 mg L<sup>-1</sup>.

## 6 CONCLUSÃO

Os espectros de FT-IR obtidos para a amostra de SHA possui características idênticas a espectros de SHA encontrados na literatura. De maneira geral, a SHA coletada para o presente trabalho, tem presença dos mesmos grupamentos químicos encontrados em amostras de SHA diferentes localidades, ou seja, a composição em termos de grupamentos químicos parece não sofrer grandes alteração independente dos diferentes processos de formação da SHA. Já comparação entre os espectros de IR para as frações AH e AF apresentaram os mesmos sinais nas mesmas regiões, o que sugere que as duas frações não podem ser diferenciadas através da identificação dos seus grupamentos químicos, e sim pela quantificação dos mesmos. Já a análise entre as proporções das regiões dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das amostras, foi observado que carbonos de parafinas são o maior constituinte da amostra de SHA, representando cerca de 30 % do total. Já as suas frações, AH e AF, tem como maior constituinte carbonos aromático e olefinas destacando a fração AH que apresenta 41 % do total.

O processo de diálise se mostrou eficiente para a purificação dos extratos salinos, onde já na terceira batelada do processo, foi obtido mais de 50% de redução dos íons Na presentes na amostra de SHA e na fração AF. Entretanto, mais que três bateladas do processo são necessárias para assegurar da retirada dos íons Na na SHA e em suas frações AH e AF. Os resultados também sugerem que, durante o processo de extração, os íons de Na se encontram mais concentrado na fração de AH quando comparado com a fração AF. Na fração AF encontrava-se concentrações de Na cerca de 25 vezes mais elevada que a encontrada na fração de AH. É incorreto afirmar que a maior concentração de Na na fração AH está associada a uma maior afinidade da mesma com essa fração. Uma provável explicação está na metodologia de separação empregada, uma vez que a fração AF não sofre precipitação e por isso os íons de Na se encontram mais livres e em um volume maior, facilitando sua retirada no processo de diálise. Os demais metais analisados, no geral, não apresentaram perda significativa da concentração nas amostras purificadas.

Para experimentos de labilidade baseados do procedimento de troca de metais originalmente complexados na SHA e suas fração por íons de cobre, foi determinado que a concentração não deve ultrapassar 35  $\mu\text{g}$  de cobre por miligrama de SHA ou de suas frações, isto porque em concentrações mais elevadas, os complexos de SHA ou de suas frações se enovelam ao ponto de precipitarem. Originalmente, os experimentos de troca de metais por íons de cobre baseiam-se na diferença entre as razões na concentração íons de Cobre livre e Metais livres trocados, porém para análise em IPC-OES, a grande diferença na concentração de íons

cobre carregado e a concentrações das espécies metálicas trocadas se torna um problema, isso porque pequenas imprecisões na determinação da concentração de cobre geram grande erros na obtenção de valores da  $K_{troca}$  tornando-os não representativos. Para melhorar a fidelidade da ordem de labilidade dos metais originalmente complexados, nesse trabalho foi proposto uma nova forma de ordenar a labilidade dos íons metálicos fazendo uso apenas da variação da concentração dos metais livres em solução, assim minimizando o feito provocado pelas incertezas da determinação de cobre livre. Com a utilização do modelo proposto foi possível ordenar a labilidade das espécies metálicas proporcionalmente a sua concentração total inicial.

Após a adição de íons metálicos à solução de SHA, foi observada uma desordem na labilidade das espécies metálicas, nos três primeiros dias e que após trinta dias da adição de íon à solução de SHA, uma nova ordem de labilidade foi encontrada. Os íons metálicos Na, Mg, Pb, Mn, Zn, Ba encontram-se mais lábeis nas seguintes amostras AF>AH>SHA, já os íons de Fe e Al encontram-se mais lábeis nas seguintes amostras AH>AF>SHA. Foi observado que a amostra de SHA apresentou os menores valores de labilidade, o que pode sugerir que a diferença nas dimensões das estruturas químicas e da composição das frações AH e AF na SHA aumentam as forças de ligações nos complexos SHA-Metal, isto é, provavelmente, os íons metálicos são melhores engaiolados devido à uma melhora no arranjo estérico dos complexos provocado pela maior disponibilidade de macromoléculas de diferentes tamanhos de composições.

Nos experimentos competição entre a SHA e EDTA, foi observado que um tempo de 400 min é necessário para que seja alcançado o equilíbrio químico entre as espécies de SHA-M/EDTA-M. Também foi observado que os íons Co, Ca, Ba, K e Al são os que mais rapidamente atingem o equilíbrio entre os complexos, proporcionalmente as suas concentrações de íons trocáveis.

Nos ensaios de toxicidade aguda utilizando a *Artemia salina* sp. foi determinado que a concentração de 19 mg L<sup>-1</sup> de íons cobre resulta na mortalidade de 50% da população das *Artemias* (CL<sub>50</sub>). Também foi observado que concentrações menores que 400 mg L<sup>-1</sup> de SHA podem ser utilizadas para ensaios de redução da toxicidade aguda de cobre, uma vez que, no teste com concentrações inferiores, não houve mortalidade na população das *Artemias*. Os ensaios de redução da toxicidade aguda de íons cobre pelas SHA mostraram em geral que presença da SHA reduz o índice de mortalidade provocado pela CL<sub>50</sub> de íons cobre, reafirmando assim o poder redutor da toxicidade da SHA. Já os ensaios com SHA com diferentes proporções de AH e AF, com soluções na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup>, mostraram uma leve tendência de

melhora no efeito redutor de toxicidade aguda à medida que proporção da fração de AH aumenta na SHA. Além disso, as frações isoladas de AH e AF não apresentaram redução significativa da toxicidade aguda quando comparadas a soluções de SHA com proporções diferentes de AH e AF, sugerindo assim que as frações isoladas de AH e AF não são tão eficientes na redução de toxicidade quanto soluções com suas misturas. Esses resultados reforçam a ideia que o engaiolamento de íons metálicos é mais efetivo quando há maior variedade de macromoléculas de diferentes composições e estruturas na composição da SHA. Nos ensaios em concentrações 50 a 100 mg L<sup>-1</sup> SHA, houve grande dispersão dos resultados dificultando avaliações estatísticas. Essa dispersão pode estar correlacionada com o maior envelhecimento da SHA e troca de íons cobre por metais originalmente complexados na SHA potencialmente mais tóxicos.

## 7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

ALLARD, T. et al. Tracing source and evolution of suspended particles in the Rio Negro Basin (Brazil) using chemical species of iron. **Chemical Geology**, v. 280, n. 1–2, p. 79–88, 7 jan. 2011.

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.

ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; GARRIDO, J. J. Effect of pH on the aggregation of a gray humic acid in colloidal and solid states. **Chemosphere**, v. 59, n. 5, p. 659–667, 1 abr. 2005.

AQUINO, A. J. A. et al. Proton transfer processes in polar regions of humic substances initiated by aqueous aluminum cation bridges: A computational study. **Geoderma**, v. 213, p. 115–123, 1 jan. 2014.

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.

ARAUJO, J. R. et al. Selective extraction of humic acids from an anthropogenic Amazonian dark earth and from a chemically oxidized charcoal. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 8, p. 1223–1232, nov. 2014.

ARCANJO, D. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505–509, 2012.

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.

AUCOUR, A.-M. et al. The Amazon River: behaviour of metals (Fe, Al, Mn) and dissolved organic matter in the initial mixing at the Rio Negro/Solimões confluence. **Chemical Geology**, v. 197, n. 1–4, p. 271–285, 15 jun. 2003.

BAHEMMAT, M.; FARAHBAKHS, M.; KIANIRAD, M. Humic substances-enhanced electroremediation of heavy metals contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 312, p. 307–318, 15 jul. 2016.

BARROS, M. C. P.; PAULA, J. R. DE; REZENDE, M. O. O. Caracterização físico-química do ácido húmico de solo da Ilha de Cananéia e de sua interação com Fe (III), Cu (II) e Cd (II). **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 376–380, 1994.

BORGES, A. B. Estudos de toxicidade das águas da bacia hidrográfica do rio urussanga , utilizando-se organismos bioindicadores *Artemia sp .* e *Daphnia magna* , estudos de toxicidade das águas da bacia hidrográfica do rio urussanga , utilizando-se organismos bioindica. p. 36, 2009.

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.

BRISKI, E. et al. Laboratory production of early hatching *Artemia sp.* cysts by selection. **Aquaculture**, v. 282, n. 1–4, p. 19–25, 30 set. 2008.

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. Transformations of metal species in ageing humic hydrocolloids studied by competitive ligand and metal exchange. **Anal Bioanal Chem**, v. 378, p. 1637–1643, 2004.

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.

CAVALCANTE, M. F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20–22, fev. 2000.

COMBE, C. et al. The effect of CA membrane properties on adsorptive fouling by humic acid. **Journal of Membrane Science**, v. 154, n. 1, p. 73–87, 3 mar. 1999.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CUPRYS, A. et al. Ciprofloxacin-metal complexes –stability and toxicity tests in the presence of humic substances. **Chemosphere**, v. 202, p. 549–559, 1 jul. 2018.

DANIELSSON, L. G. On the use of filters for distinguishing between dissolved and particulate fractions in natural waters. **Water Research**, v. 16, n. 2, p. 179–182, 1 jan. 1982.

DAS, T. et al. Characterizations of humic acid isolated from coals of two Nagaland Coalfields of India in relation to their origin. **Journal of the Geological Society of India**, v. 86, n. 4, p. 468–474, 2015.

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 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.

DING, T. et al. Biouptake, toxicity and biotransformation of triclosan in diatom *Cymbella* sp. and the influence of humic acid. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 231–242, 1 mar. 2018.

DIZMAN, M.; TUTAR, A. The characterization of the arifiye peat. **Journal of the chemical society of Pakistan**, v. 37, n. 1, p. 131–138, 2015.

DOSKOČIL, L. et al. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. **Fuel**, v. 213, p. 123–132, 1 fev. 2018.

DUMITRASCU, M. *Artemia salina*. **Balneo Research Journal**, v. 2, n. 4, p. 119–122, 2011.

DURÁN-ÁLVAREZ, J. C. et al. Environmental fate of naproxen, carbamazepine and triclosan in wastewater, surface water and wastewater irrigated soil — Results of laboratory scale experiments. **Science of The Total Environment**, v. 538, p. 350–362, 15 dez. 2015.

EPA, U. S. E. P. A.-. **Framework for Metals Risk Assessment**: EPA 120/R-07/001. Washington D.C.: [s.n.]. Disponível em: <[www.epa.gov/osa](http://www.epa.gov/osa)>.

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.

FAKOUR, H.; LIN, T.-F. Experimental determination and modeling of arsenic complexation with humic and fulvic acids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 569–578, 30 ago. 2014.

FILIP, Z.; TESAŘOVÁ, M. Microbial degradation and transformation of humic acids from permanent meadow and forest soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, n. 2–3, p. 225–231, 1 set. 2004.

FRIMMEL, F. H. et al. Polar organic substances and their role in the water-saturated and -unsaturated zones. In: MATTHESS, G. et al. (Eds.). . **Progress in Hydrogeochemistry: Organics - Carbonate Systems - Silicate Systems - Microbiology - Models**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 7–100.

GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A.; CLARK, S. B. **Humic and Fulvic Acids: Isolation, Structure, and Environmental Role**. 651. ed. [s.l.] American Chemical Society, 1996.

GIANNOULI, A. et al. Evaluation of Greek low-rank coals as potential raw material for the production of soil amendments and organic fertilizers. **International Journal of Coal Geology**, v. 77, n. 3–4, p. 383–393, 31 jan. 2009.

GÜNGÖR, E. B. Ö.; BEKBÖLET, M. Zinc release by humic and fulvic acid as influenced by pH, complexation and DOC sorption. **Geoderma**, v. 159, n. 1–2, p. 131–138, out. 2010.

GUO, X.; LIU, H.; WU, S. Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions. **Science of The Total Environment**, v. 662, p. 501–510, 20 abr. 2019.

GUSIATIN, Z. M. Tannic acid and saponin for removing arsenic from brownfield soils: Mobilization, distribution and speciation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, n. 4, p. 855–864, abr. 2014.

HAO, Y. et al. Effect of metal ions on humic acid fouling of hollow fiber ultrafiltration membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 376, n. 1–2, p. 247–253, jul. 2011.

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.

HESTERBERG, D. et al. Bonding of Hg(II) to Reduced Organic Sulfur in Humic Acid

As Affected by S/Hg Ratio. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 13, p. 2741–2745, jul. 2001.

HO, T.-L. Classification of Hard and Soft Acids and Bases. In: **Hard and Soft Acids and Bases Principle in Organic Chemistry**. Clevenlad: Academic Press, 1977. p. 4–12.

HUE, N. V.; CRADDOCK, G. R.; ADAMS, F. Effect of Organic Acids on Aluminum Toxicity in Subsoils1. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, n. 1, p. 28, 1986.

HUHEEY, J. E. et al. **Inorganic Chemistry: Principles of structure and reactivity**. 4. ed. New York: Pearson, 2006.

IHSS. **Isolation of IHSS Samples**. Disponível em: <<https://humic-substances.org/isolation-of-ihss-samples/>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

JARVIS, K. L.; MAJEWSKI, P. Influence of film stability and aging of plasma polymerized allylamine coated quartz particles on humic acid removal. **ACS applied materials & interfaces**, v. 5, n. 15, p. 7315–7322, 2013.

JIANG, L. et al. Enhanced removal of humic acid from aqueous solution by novel stabilized nano-amorphous calcium phosphate: Behaviors and mechanisms. **Applied Surface Science**, v. 427, p. 965–975, 1 jan. 2018.

JIN, P. et al. Selective binding behavior of humic acid removal by aluminum coagulation. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 290–298, 1 fev. 2018.

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.

KIM, I. et al. Sorption and toxicity reduction of pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in the presence of colloidal humic acid. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 4, p. 904–913, 17 ago. 2016.

KULIKOWSKA, D. et al. Feasibility of using humic substances from compost to remove heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) from contaminated soil aged for different periods of time. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 882–891, 30 dez. 2015.

KUMADA, Y. Chapter 5 Elementary Composition of Humic Acids and Fulvic Acids. In: KUMADA, Y. (Ed.). **Developments in Soil Science**. 17. ed. Toyko: Elsevier, 1987. v. 17p. 70–94.

LANGMUIR, D. **Aqueous Environmental Geochemistry**. 1. ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 1997. v. 1

LI, J.; WU, J. Compositional and Structural Difference of Fulvic Acid from Black Soil Applied with Different Organic Materials: Assessment After Three Years. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 10, p. 1865–1871, 1 out. 2013.

LI, W. et al. Composition and copper binding properties of aquatic fulvic acids in eutrophic Taihu Lake, China. **Chemosphere**, v. 172, p. 496–504, 1 abr. 2017.

LIPCZYNSKA-KOCHANY, E. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: A review. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 1548–1565, 1 nov. 2018.

LÖVGREN, L.; SJÖBERG, S. Equilibrium approaches to natural water systems—7. Complexation reactions of copper(II), cadmium(II) and mercury(II) with dissolved organic matter in a concentrated bog-water. **Water Research**, v. 23, n. 3, p. 327–332, 1 mar. 1989.

MAGHSOODLOO, S. et al. Consequence of chitosan treating on the adsorption of humic acid by granular activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 191, n. 1–3, p. 380–387, 15 jul. 2011.

MALCOLM, R. L. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 19–30, 1990.

MANZAK, A.; KURŞUN, C.; YILDIZ, Y. Characterization of humic acid extracted from aqueous solutions with polymer inclusion membranes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 81, p. 14–20, 1 dez. 2017.

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.

MARSAC, R. et al. Modeling metal ion-humic substances complexation in highly saline conditions. **Applied Geochemistry**, v. 79, p. 52–64, 1 abr. 2017.

MCDONALD, S. et al. Analytical chemistry of freshwater humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 527, n. 2, p. 105–124, 6 dez. 2004.

MONTONERI, E. et al. Biosurfactants from urban green waste. **ChemSusChem**, v. 2, n. 3, p. 239–247, 2009.

MOREIRA, M. J. **Toxicidade Letal Aguda de Sulfato de Cobre em Artemia spp**. [s.l.] Faculdade de Ciências, 2013.

MOREIRA, W. A. DOS S. et al. Variação no tempo de eclosão dos cistos de Artemia salina salina e teste de toxicidade dos constituintes de Spathelia excelsa. **BioFar**, v. 09, p. 1–6, 2013.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 372–378, 2009.

NASCIMENLO, J. E. et al. Estudo Fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 143–148, 2008.

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

OLIVEIRA, L. C. DE et al. Extracted from Negro River ( Amazon State ) waters : Interactions with Hg ( II ). v. 18, n. 4, p. 860–868, 2007.

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.

PEARSON, G. . Perchloric acid flames VI—Ethane-rich flames. **Combustion and Flame**, v. 11, n. 2, p. 103–108, 1 abr. 1967.

PEÑA-MÉNDEZ, M. E.; HAVEL, J.; PATOČKA, J. Humic substances – compounds of still unknown structure : applications in agriculture , industry , environment , and biomedicine. **J. Appl. Biomed.**, v. 3, n. 2005, p. 13–24, 2005.

PETERS, R. W. **Aquatic humic substances: Influence on fate and treatment of pollutants: Advances in chemistry series**. 1. ed. Washington D.C.: ACS Publications, 1989. v. 8

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 810–832, nov. 2001.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. In: **Advances in Agronomy**. [s.l: s.n.]. v. 75p. 57–134.

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.

PICKERING, W. F. Metal ion speciation — soils and sediments (a review). **Ore Geology Reviews**, v. 1, n. 1, p. 83–146, 1 maio 1986.

PIMENTEL, M. P. et al. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 15–22, 2012.

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.

PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. Production of silicon compounds and fulvic acids from cotton wastes biochar using chemical depolymerization. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 270–280, 1 maio 2015.

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.

POWELL, K. J.; TOWN, R. M. Solubility and fractionation of humic acid; effect of pH and ionic medium. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, p. 47–54, 1992.

RANTIN, F. G. S.; BOIJINK, C. D. L.; RANTIN, F. T. **O Uso do Sulfato de Cobre em Ecossistemas Aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2013.

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.

RITCHIE, J. D.; PERDUE, E. M. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 67, n. 1, p. 85–96, 1 jan. 2003.

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. Substâncias húmicas sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 410–412, 2000a.

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, 2000b.

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

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; FURLAN, M. An alternative methodology of the extraction of humic substances from organic soils. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n. 1, p. 51–56, 1998.

ROCHA, J. C.; TOSCANO, I. A. S.; CARDOSO, A. A. Relative lability of trace metals complexed in aquatic humic substances using ion-exchanger cellulose-hyphan. **Journal**

of the **Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 3, p. 239–243, 1997.

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**, v. 2, p. 25–36, 2005.

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.

SCHULTEN, H.-R.; SCHNITZER, M. Three-Dimensional Models for Humic Acids and Soil Organic Matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, n. 11, p. 487–498, 1995.

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.

SILVA, H. A. DA. **Caracterização sazonal das substâncias húmicas aquáticas do rio Negro - AM**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2015.

SILVA, L. L. et al. Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 700–705, 2010.

SKYLLBERG, U. et al. Binding of Mercury(II) to Reduced Sulfur in Soil Organic Matter along Upland-Peat Soil Transects. **Journal of Environment Quality**, v. 29, n. 3, p. 855, 2000.

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.

SORGELOOS, P. The use of *Artemia* cysts in aquaculture: the concept of “hatching efficiency” and description of a new method for cyst processing. **Proceedings of the annual meeting-World Mariculture Society.**, v. 9, p. 715–721, 1978.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions**. 2. ed. Canada: Wily & Sons, 1982. v. 72

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry: Genesis, Compositon, Reactions**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

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

SUFFET, I. H.; MACCARTHY, P. **Aquatic Humic Substances: Influence on fate and treatment of pollutants**. 1. ed. Washington, DC: American Chemical Society, 1988. v. 219

SWIFT, R. S. Molecular weight, size, shape and charpe charecteristics 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. Oganic 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.

TANG, W.-W. et al. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review. **Science of The Total Environment**, v. 468–469, p. 1014–1027, 15 jan. 2014.

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

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

TRCKOVA, M. et al. Peat as a feed supplement for animals: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 50, n. 8, p. 361–377, 2005.

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.

VAN RENSBURG, C. E. J.; MALFELD, S. C. K.; DEKKER, J. Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice. **Drug Development Research**, v. 53, n. 1, p. 29–32, 2001.

VANHAECKE, P. et al. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 5, n. 3, p. 382–387, set. 1981.

WALLSCHLÄGER, D.; DESAI, M. V. M.; WILKEN, R.-D. The role of humic substances in the aqueous mobilization of mercury from contaminated floodplain soils. **Water**,

**Air, and Soil Pollution**, v. 90, n. 3, p. 507–520, 1996.

WANG, W. et al. Structure and properties of quaternary fulvic acid–intercalated saponite/poly(lactic acid) nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 109–110, p. 136–142, 1 jun. 2015.

WATANABE, C. H. et al. Toxicity assessment of arsenic and cobalt in the presence of aquatic humic substances of different molecular sizes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 1–8, 1 maio 2017.

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.

WERSHAW, R. L. Molecular aggregation of humic substances. **Soil Science**, v. 164, n. 11, p. 803–813, nov. 1999.

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

WORMS, I. et al. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1721–1731, 1 nov. 2006.

WU, J. et al. Identifying the key factors that affect the formation of humic substance during different materials composting. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1193–1196, 1 nov. 2017.

XIA, K. et al. X-ray Absorption Spectroscopic Evidence for the Complexation of Hg(II) by Reduced Sulfur in Soil Humic Substances. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 257–261, jan. 1999.

XING, B. et al. Facile synthesis of graphene nanosheets from humic acid for supercapacitors. **Fuel Processing Technology**, v. 165, p. 112–122, 1 out. 2017.

XU, J. et al. Does P-deficiency fertilization alter chemical compositions of fulvic acids? Insights from long-term field studies on two contrasting soils: A Fluvisol and an Anthrosol. **Soil and Tillage Research**, v. 178, p. 189–197, 1 maio 2018.

YANG, R. et al. Effects of Fe(III)-fulvic acid on Cu removal via adsorption versus coprecipitation. **Chemosphere**, v. 197, p. 291–298, 1 abr. 2018.

YOON, S.-J. et al. X-ray absorption studies of CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>-binding sites in humic substances. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 69, n. 5, p. 1111–1121, 1 mar. 2005.

ZAVARZINA, A. . et al. Extraction of humic acids and their fractions in poly(ethylene glycol)-based aqueous biphasic systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 452, n. 1, p. 95–103, 31 jan. 2002.

ZHANG, J. et al. Tracking the composition and transformation of humic and fulvic acids during vermicomposting of sewage sludge by elemental analysis and fluorescence excitation–emission matrix. **Waste Management**, v. 39, p. 111–118, 1 maio 2015.

ZHANG, Y. et al. Chemical characterization of humic substances isolated from mangrove swamp sediments: The Qinglan area of Hainan Island, China. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 93, n. 3, p. 220–227, 1 jul. 2011.

ZHANG, Y.; MIRÓ, M.; KOLEV, S. D. A novel hybrid flow platform for on-line simultaneous dynamic fractionation and evaluation of mercury lability in environmental solids. **Talanta**, v. 178, p. 622–628, 1 fev. 2018.