UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS
NA ESTRUTURA, DINÂMICA E PROPRIEDADES ÓPTICAS
DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS DO RIO
NEGRO**

Ursula Fabiola Rodríguez Zúñiga

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências (Química Analítica).

Orientador: Dra. Débora Marcondes
Bastos Pereira Milori

São Carlos
2006

DEDICO:

A Dios;

*Al más fehaciente
testimonio de mi fé,
mis padres, **Juan e Gloria**
por creer, compartir y enseñarme
a luchar y a soñar
A mis queridas hermanas
Lena e Rocio
Por cariño y el apoyo constante.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori pela orientação, incentivo, confiança e amizade durante a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Ladislau Martin Neto, Dr. Wilson Tadeu Lopes da Silva, Dr. Marcelo Luiz Simões, pelas inúmeras contribuições na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Julio César Rocha, da Unesp-Araraquara por ter concedido as amostras de substâncias húmicas aquáticas e pelas contribuições, à sua orientada Luciana Camargo e a toda equipe de trabalho, pela colaboração, simpatia e atenção.

À Prof^a. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende e à sua orientada Jussara Cotta, pela valiosa colaboração e boa vontade.

Ao Dr. Êzio Sargentini Jr. do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA) pela extração das substâncias húmicas aquáticas.

Ao Sr. Daniel de Oliveira da Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais de Manaus (CPRM) pelo fornecimento dos dados meteorológicos do sistema Amazônico.

Ao Renê por sua valiosa e sempre disposta ajuda no laboratório de química.

Às bibliotecárias do IQSC e da Embrapa pela simpatia e pronto atendimento.

Aos secretários, telefonistas, estagiários, técnicos, pesquisadores, etc., a todos os colegas da Embrapa, pela acolhida e colaboração.

Às amigas Kelly, Lucimar, Larissa, Aline meu profundo agradecimento pela amizade, convivência, continua aprendizagem e sempre pronto auxílio.

Aos colegas e amigos de trabalho, Kelly, Larissa, Lucimar, Aline, Jean, Ana Flávia, Robson, Cléber, Martha, Garbin, Adriana, Eduarda, Marcilene, Vanessa, Jeferson, Elisângela, Rosilene, Fernanda, Cecília (Arequipa), Carlos (Perú), Claudia (Colômbia) pelo apoio e momentos de amizade.

Aos meus amigos de longe sempre presentes.

Às minhas companheiras de casa pela agradável convivência e ajuda prestativa.

Aos professores da Universidade Nacional de San Agustín de Arequipa pelo exemplo profissional, respeito e dedicação.

À Embrapa pela infra-estrutura e excelente ambiente de trabalho.

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS.....	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
CAPITULO 1.....	1
INTRODUÇÃO	1
CAPITULO 2.....	4
REVISÃO BIBLIOGRAFICA	4
2.1 DEFINIÇÃO DE MATERIA ORGÂNICA (MO)	4
2.2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH).....	6
2.3 MATERIA ORGÂNICA DISSOLVIDA EM AMBIENTES AQUÁTICOS (MOD)	11
2.3.1 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS (SHA).....	13
2.3.2 INTERAÇÕES ENTRE AS SHA E A RADIAÇÃO SOLAR.....	15
2.3.3 INTERAÇÕES ENTRE AS SHA E AS ESPÉCIES METÁLICAS.....	18
2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SHA.....	21
2.4.1 MÉTODOS QUÍMICOS.....	22
2.4.1.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR (CNHS)	22
2.4.1.2 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SHA	23
2.4.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	25
2.4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	26
2.4.2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN ¹³ C)	29
2.4.2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	35
2.4.2.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	38
2.4.2.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	44
CAPITULO 3.....	49
OBJETIVOS	49
CAPITULO 4.....	50
MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ÁREA DE AMOSTRAGEM	50
4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DA ÁREA	52
4.1.2 AMOSTRAGEM DE ÁGUA	54
4.2 EXTRAÇÃO DAS SHA	55
4.2.1 METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO.....	55
4.2.2 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DAS SHA	55
4.3 CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS SHA.....	55
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SHA.....	56
4.4.1 MÉTODOS QUÍMICOS.....	56
4.4.1.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS.....	56
4.4.1.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR E RAZÕES ATÔMICAS	56
4.4.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	57
4.4.2.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	57
4.4.2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C (RMN ¹³ C)	58
4.4.2.3 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	59
4.4.2.4 ABSORÇÃO DE LUZ UV-VISÍVEL.....	59
4.4.2.5 FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL	59
4.5 FOTOIRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS	60
4.5.1 MONITORAMENTO DA CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO	62
4.5.2 AVALIAÇÃO DAS MUDANÇAS ESTRUTURAIS.....	63
4.5.2.1 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)	63
4.5.2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	64

4.5.2.3 FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL	64
4.5.2.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO (CC) PARA ÍONS Cu^{2+}	66
CAPÍTULO 5.....	68
RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO INICIAL	68
5.1 COMPOSIÇÃO ELEMENTAR	68
5.2 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	71
5.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C (RMN ^{13}C).....	72
5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	76
5.5 ABSORÇÃO DE LUZ UV-VISÍVEL	79
5.6 FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL	82
5.6.1 <i>Espectro de Emissão 1</i>	83
5.6.2 <i>Espectro de Emissão 2</i>	84
5.6.2 <i>Espectros de Varredura Síncronizada</i>	86
5.7 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
CAPÍTULO 6.....	95
RESULTADOS DA FOTODEGRADAÇÃO	95
6.1 CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO.....	95
6.1.1 <i>AVALIAÇÃO DIFERENCIAL DA PERDA DE ABSORBÂNCIA</i>	100
6.2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DECORRENTES DA FOTODEGRADAÇÃO	102
6.2.1 <i>CONCENTRAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)</i>	102
6.2.2 <i>ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)</i>	104
6.2.3 <i>ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA</i>	108
6.2.4 <i>CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO (CC) PARA ÍONS Cu^{+2}</i>	120
6.3 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
CAPÍTULO 7.....	126
CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS	130

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – MODELO ESTRUTURAL DE AH PROPOSTO POR SCHULTEN E SCHNITZER (1993).	8
FIGURA 2.2 – MODELOS CONCEITUAIS PROPOSTOS PELA TEORIA MACROMOLECULAR. (A) ÁCIDO HÚMICO PROPOSTO POR SCHULTEN E SCHNITZER (1995), CARBONO=AZUL; OXIGÊNIO=VERMELHO; NITROGÊNIO=PRETO E HIDROGÊNIO=BRANCO. AS LETRAS A, B E C INDICAM OS ESPAÇOS “VAZIOS” PRESENTES NA MOLÉCULA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS CAPAZES DE INTERAGIR COM OUTROS COMPOSTOS. (B) CONFORMAÇÃO EM FORMA DE “FITA” ALEATORIAMENTE ENOVELADA, MOSTRANDO SUA FLEXIBILIDADE (ADAPTADA DE SWIFT, 1989).	9
FIGURA 2.3 – ESQUEMA DE ESTRUTURA DAS SH PROPOSTO POR SIMPSON ET AL. (2002). AS UNIDADES VERMELHAS REPRESENTAM OS CÁTIOS METÁLICOS, AS UNIDADES PRETAS OS POLISSACARÍDEOS, AS UNIDADES AZUIS OS POLIPEPTÍDEOS, AS UNIDADES VERDES AS CADEIAS ALIFÁTICAS E AS UNIDADES MARRONS OS FRAGMENTOS AROMÁTICOS DERIVADOS DA LIGNINA.	10
FIGURA 2.4 - EXEMPLOS DE GRUPOS FUNCIONAIS EXISTENTES NAS SHA DISPONÍVEIS PARA REAÇÕES DE COMPLEXAÇÃO (A) CATECOL; (B) FTALATO; (C) SALICILATO.	19
TABELA 2.1 –LIGANTES CONTENDO OXIGÊNIO NA ESTRUTURA DAS SHA.	20
FIGURA 2.5 - ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE UF-FT PARA DETERMINAÇÃO DA CC CU^{+2}. ADAPTADO DE BURBA ET AL. (2001).	25
FIGURA 2.6 - DESDOBRAMENTO DOS NÍVEIS DE ENERGIA DO SPIN ELETRÔNICO: (A) EFEITO ZEEMAN; (B) FORMA DA LINHA DE ABSORÇÃO DE ENERGIA DO CAMPO DE MICROONDAS E (C) PRIMEIRA DERIVADA DA LINHA DE ABSORÇÃO.	27
FIGURA 2.7 - DIAGRAMA DE ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE SEMIQUINONA (SENESI & SCHNITZER, 1977).	28
FIGURA 2.8 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C TÍPICO DE AH MOSTRANDO GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS ÀS BANDAS CORRESPONDENTES (STUART, 1996).	34
FIGURA 2.9 - ALGUMAS VIBRAÇÕES TÍPICAS DE ÁTOMOS. OS SINAIS + E – SIGNIFICAM VIBRAÇÕES PERPENDICULARES AO PLANO DO PAPEL (STUART, 1996).	36
FIGURA 2.10 - TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS POSSÍVEIS DURANTE A EXCITAÇÃO DE UMA MOLÉCULA E DISTRIBUIÇÃO RELATIVA ENTRE SEUS ORBITAIS LIGANTES, NÃO LIGANTES E ANTI-LIGANTES.	38
FIGURA 2.11 - DESLOCAMENTO BATOCRÔMICO POR CONJUGAÇÃO DE POLIENOS.	41
FIGURA 2.12 - DESLOCAMENTOS BATOCRÔMICOS EM CONJUGAÇÃO DE SISTEMAS AROMÁTICOS: SISTEMAS DE CONJUGAÇÃO: NAFTALENO, ANTRACENO E TETRACENO. ...	42
FIGURA 2.13 - CROMÓFOROS PRESENTES NAS SH.	42
FIGURA 2.14 - CONFIGURAÇÃO ENERGÉTICA DE UMA MOLÉCULA ORGÂNICA E SUAS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS.	44
FIGURA 4.1 - MAPA DE IDENTIFICAÇÃO DA ÁREA DE AMOSTRAGEM DE ÁGUA DO RIO NEGRO-AM ENTRE AS CONFLUÊNCIAS DOS RIOS TARUMÃ-MIRIM (TM) E TARUMÃ-AÇU (T).	51
FIGURA 4.2 - VISTAS ILUSTRATIVAS DO RIO NEGRO EM DIFERENTES TEMPORADAS (A) TEMPORADA DE CHEIA (JULHO) E (B) TEMPORADA DE SECA (DEZEMBRO).	53
FIGURA 4.3 - LÂMPADA DE HG-XE, UV-SPOT LIGHT, MODELO LIGHTNINGCURRE 200 HAMAMATSU.	61
FIGURA 4.4 - (A) ESQUEMA DA MONTAGEM EXPERIMENTAL COM A LÂMPADA HG-XE HAMAMATSU PARA A FOTODEGRADAÇÃO DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DAS SHA. (B) ESPECTRO DE EMISSÃO DA FONTE.	61

FIGURA 5.1 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DE AMOSTRAS SÓLIDAS DAS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO	73
FIGURA 5.2 - CORRELAÇÕES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE RLS POR RPE E OS VALORES DA INTEGRAÇÃO DE ÁREAS DOS ESPECTROS DE RMN ^{13}C (A) INTEGRAÇÃO DA ÁREA ENTRE 110-140 PPM (CONCENTRAÇÃO DE C AROMÁTICOS) E (B) INTEGRAÇÃO DA ÁREA ENTRE 140-160 PPM.....	75
FIGURA 5.3 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA AS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO 2003.	77
FIGURA 5.4 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ UV-VISÍVEL OBTIDOS PARA AS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO 2003.	80
FIGURA 5.8 - ESPECTROS SINCRONIZADOS DE FLUORESCÊNCIA ($\Delta\lambda$ DE 55 NM) DAS SHA DO RIO NEGRO.....	87
FIGURA 5.9 - CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE RLS POR RPE COM (A) ABSORBÂNCIA A 460 NM E (B) PORCENTAGEM DE AROMATICIDADE DE RMN ^{13}C.....	91
FIGURA 5.10 - CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE RLS POR RPE E AS METODOLOGIAS DE FLUORESCÊNCIA (A)ZSOLNAY ET AL. (1999) E (B) MILORI ET AL. (2002).....	93
FIGURA 6.1 - VARIAÇÃO DO FORMATO E PERDA GLOBAL DA ABSORBÂNCIA DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VISÍVEL PRODUTO DA IRRADIAÇÃO DE 48 HORAS. (A) SOLUÇÃO SHA INVERNO, (B) SOLUÇÃO SHA VERÃO.....	96
FIGURA 6.2 - CURVAS DE DECAIMENTO EXPONENCIAL DA ABSORBÂNCIA NA FOTODEGRADAÇÃO DAS SHA DE INVERNO E VERÃO A DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA. (A) 254 NM, (B) 360 NM, (C) 460 NM.	97
FIGURA 6.3 - REPRESENTAÇÃO LINEAR DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM DA FOTODEGRADAÇÃO DAS SHA DE INVERNO E VERÃO APÓS 48 HORAS DE IRRADIAÇÃO A DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA. (A) 254 NM, (B) 360 NM, (B) 460 NM.	99
FIGURA 6.4 - ESPECTROS DIFERENCIAIS OBTIDOS A PARTIR DA SUBTRAÇÃO DE ESPECTROS APÓS IRRADIAÇÃO DO ESPECTRO DA SOLUÇÃO DE SHA INICIAL. A) IRRADIAÇÃO DE SHA INVERNO E B) IRRADIAÇÃO DE SHA VERÃO.	101
FIGURA 6.5 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PERDA DE COT RESULTADO DA FOTODEGRADAÇÃO DAS SHA DE INVERNO E VERÃO (A) CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM (B) REPRESENTAÇÃO LINEAR.....	103
FIGURA 6.6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE FTIR DAS SHA (INVERNO) SEM IRRADIAR E SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE IRRADIAÇÃO.....	105
FIGURA 6.7 - COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE FTIR DAS SHA (VERÃO) SEM IRRADIAR E SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE IRRADIAÇÃO.....	106
FIGURA 6.8- ESPECTROS DE EXCITAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA, COM EMISSÃO A 425 NM, CORRESPONDENTES A DIFERENTES TEMPOS DE IRRADIAÇÃO. A) SHA INVERNO E B) A) SHA VERÃO.	109
FIGURA 6.9- COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA, COM EXCITAÇÃO A 250 NM, CORRESPONDENTES A DIFERENTES TEMPOS DE IRRADIAÇÃO. A) SHA INVERNO E B) SHA VERÃO.....	110
FIGURA 6.10 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA, COM EXCITAÇÃO A 325 NM, CORRESPONDENTES A DIFERENTES TEMPOS DE IRRADIAÇÃO. A) SHA INVERNO E B) SHA VERÃO.....	111
FIGURA 6.12 - DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA COM $\lambda_{\text{EXC}}=250$ NM PARA AS SOLUÇÕES DAS SHA DE INVERNO. (A) ESPECTRO DA AMOSTRA INICIAL (B)ESPECTRO APÓS 5000 MINUTOS DE IRRADIAÇÃO.....	115

FIGURA 6.13 - DECONVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA COM $\lambda_{exc}=250$ NM PARA AS SOLUÇÕES DAS SHA DE VERÃO. (A) ESPECTRO DA AMOSTRA INICIAL (B) ESPECTRO APÓS 5000 MINUTOS DE IRRADIAÇÃO.	116
FIGURA 6.14 – AGRUPAMENTO DAS ÁREAS DAS GAUSSIANAS DAS TABELAS 6.7 E 6.8 COM O TEMPO DE IRRADIAÇÃO, RESULTADO DA ANÁLISE DE PCA EM TRÊS DIMENSÕES (A) AMOSTRA DE SHA INVERNO (B) AMOSTRA DE SHA VERÃO.....	118
FIGURA 6.15 - VARIAÇÃO NO TEMPO DE DEGRADAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DOS COMPONENTES ESPECTRAIS RESULTADO DA DECONVOLUÇÃO (A) SHA INVERNO (B) SHA VERÃO.	119
FIGURA 6.16 – CURVAS DE DETERMINAÇÃO DA CC COM Cu^{+2} DAS SOLUÇÕES DAS SHA SEM IRRADIAÇÃO. CONCENTRAÇÃO INICIAL DA SOLUÇÃO: 30 mg L^{-1} (A) SHA INVERNO, (B) SHA VERÃO.	121
FIGURA 6.17 – CURVAS DE DETERMINAÇÃO DA CC Cu^{+2} DAS SOLUÇÕES DAS SHA DE VERÃO SUBMETIDAS À DIFERENTES TEMPOS DE IRRADIAÇÃO. (A) 300 MIN., (B) 1500 MIN	121

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 –LIGANTES CONTENDO OXIGÊNIO NA ESTRUTURA DAS SHA	20
TABELA 2.2 - BANDAS NO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO HÚMICO OBTIDAS POR NIEMEYER ET AL (1992), DA “INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY, U.S. GEOLOGICAL SURVEY, DENVER, CO”.	37
TABELA 2.3 - ESTRUTURAS CROMÓFORAS EM MOLÉCULAS ORGÂNICAS E TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS.....	39
TABELA 4.1 - EVOLUÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HIDROLÓGICAS DO RIO NEGRO DURANTE O ANO 2003.	54
TABELA 4.2 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS.	54
TABELA 4.3 - CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS COMPOSTAS DE SHA, SEGUNDO ÍNDICES HIDROLÓGICOS.....	56
TABELA 4.4 - PARÂMETROS UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA COM AS METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE HUMIFICAÇÃO.	60
TABELA 4.5 - PARÂMETROS UTILIZADOS NA AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA.	65
TABELA 4.6 – SEQUÊNCIA PARA ADIÇÃO DAS ALÍQUOTAS DE SOLUÇÃO PADRÃO DE Cu^{+2} PARA DETERMINAÇÃO DA CC POR UF-FT.....	67
TABELA 5.1 - COMPOSIÇÃO ELEMENTAR (EM % LIVRE DE CINZA), RAZÕES N/C, H/C, C/O E TEOR DE CINZA DAS SHA, DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO 2003.....	69
TABELA 5.2 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE RLS EM SPINS G^{-1} DE $\text{C} \times 10^{17}$ NAS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO 2003.	71
TABELA 5.3 - CONCENTRAÇÃO DE RLS PARA DIFERENTES AMOSTRAS DE SH ENCONTRADAS NA LITERATURA.	71
TABELA 5.4 - ATRIBUIÇÕES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EM RMN ^{13}C A GRUPOS QUÍMICOS ESTRUTURAIS.....	73
TABELA 5.5 - VALORES DA CONCENTRAÇÃO RELATIVA (% DA ÁREA TOTAL) DAS BANDAS NOS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO 2003.....	74
TABELA 5.6 - PORCENTAGEM DE AROMATICIDADE E ALIFATICIDADE DAS AMOSTRAS DE SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO 2003.	76
TABELA 5.7 - VALORES DAS ABSORBÂNCIAS EM 254, 465, 665 NM E RAZÃO E4/E6 DAS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO 2003.	80
TABELA 5.8 - VALORES DOS ÍNDICES DE HUMIFICAÇÃO PROPOSTO POR ZSOLNAY ET AL., (1999) PARA AS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO.	84
TABELA 5.9 - VALORES DOS ÍNDICES DE HUMIFICAÇÃO PROPOSTO POR MILORI ET AL., (2002) PARA AS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO.	85
TABELA 5.10 - VALORES DOS ÍNDICES DE HUMIFICAÇÃO CALCULADOS A PARTIR DOS ESPECTROS DE VARREDURA SÍNCRONIZADA, PROPOSTA POR KALBITZ ET AL., (1999) PARA AS SHA DO RIO NEGRO EM DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO.....	87
TABELA 6.1 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS EXPERIMENTOS DE FOTODEGRADAÇÃO.	95
TABELA 6.2 - PORCENTAGEM DA PERDA GLOBAL DE ABSORBÂNCIA DURANTE A FOTODEGRADAÇÃO, MEDIANTE INTEGRAÇÃO DOS ESPECTROS DA FIGURA 6.1.	96

TABELA 6.3 - VALORES DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E DE AJUSTE PRODUTO DA LINEARIZAÇÃO.	99
TABELA 6.4 - DADOS REFERENTES À DIMINUIÇÃO DE COT DURANTE A FOTODEGRADAÇÃO.....	102
TABELA 6.5 - DADOS REFERENTES À DIMINUIÇÃO DE COT DURANTE A FOTODEGRADAÇÃO.....	103
TABELA 6.6 – VALORES DA ÁREA TOTAL DOS ESPECTROS DE EMISSÃO COM EXCITAÇÃO A 250 NM E DAS ÁREAS RELATIVAS DAS GAUSSIANAS COMPONENTES: SHA DE INVERNO.	117
TABELA 6.7 - VALORES DA ÁREA TOTAL DOS ESPECTROS DE EMISSÃO COM EXCITAÇÃO A 250 NM E DAS ÁREAS RELATIVAS DAS GAUSSIANAS COMPONENTES: SHA DE VERÃO.....	117
TABELA 6.9- VALORES DA CC DAS SHA INICIAIS DE INVERNO E VERÃO.	122

RESUMO

Um dos maiores interesses atuais no âmbito mundial, está focalizado no aumento da radiação ultravioleta (UV) e sua influência no equilíbrio dos sistemas aquáticos. O Rio Negro-AM, um dos principais afluentes da Bacia Amazônica, constitui-se em um lugar ideal para o estudo do impacto da radiação UV na biogeoquímica da matéria orgânica dissolvida (MOD), pelas elevadas concentrações de carbono orgânico (CO), altas taxas de radiação solar registradas e variabilidade sazonal do sistema.

O presente trabalho teve por finalidade avaliar a dinâmica e funcionalidade das substâncias húmicas aquáticas (SHA) do Rio Negro frente a fatores ambientais como índices fluvio e pluviométricos e a radiação UV-visível. Com este objetivo as SHA foram classificadas em relação às estações do ano (verão, outono, inverno e primavera) e caracterizadas, através da composição elementar, capacidade complexante (CC) com Cu^{+2} e das espectroscopias de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), absorbância e fluorescência de luz UV-visível. O resultado revelou o efeito das mudanças sazonais do rio na estrutura da MOD, sendo que as SHA do inverno (época de cheia) evidenciaram o maior carácter alifático por RMN ^{13}C , diretamente relacionado com altos níveis fluviométricos que favoreceriam o ingresso da MOD fresca de origem terrestre, hidrofílica e em vias de estabilização. Por outro lado, as SHA de verão e outono (época de seca), mostraram o maior carácter aromático com altos teores de radicais livres do tipo semiquinona, os maiores índices de humificação por fluorescência e as maiores absorbâncias a comprimentos de onda mais longos.

Em uma segunda parte, avaliaram-se os efeitos da radiação UV-visível nas propriedades ópticas e estruturais das SHA de verão e inverno, para isso empregou-se uma lâmpada de Hg-Xe (290 - 475 nm). Em geral observou-se uma diminuição progressiva da absorbância e da cor, uma mineralização com redução aproximada de 75% de CO e a formação de estruturas de menor complexidade, evidenciada através do deslocamento para menores comprimentos de onda dos máximos de fluorescência; uma acidificação do meio (6 - 4,5) e uma perda total da CC de Cu^{+2} , nos primeiros 300 minutos da irradiação.

Desse modo, a variabilidade estrutural sazonal também foi observada no comportamento na fotodegradação das SHA de verão e inverno. Assim, as de verão (com maior aromaticidade) apresentaram uma cinética lenta ($k=10,33 \times 10^{-4}$), embora mais efetiva com a perda total de absorbância do 87%, atribuída a uma maior ressonância dos grupos cromóforos presentes em maior quantidade. Em contrapartida, as SHA de inverno (com a maior alifaticidade) degradaram-se mais rapidamente ($k=12,33 \times 10^{-4}$) atingindo um estado limite estacionário, até uma perda de absorbância de 79%, devida à acelerada decomposição dos grupos alifáticos e/ou a produção de estruturas absorventes que são recalcitrantes e inertes aos comprimentos de onda da lâmpada.

Contudo, estes resultados contribuem para um melhor entendimento das tendências dos fluxos de CO nos rios e a subsequente quantificação de C das fontes terrestres e aquáticas e sua dependência com diversos fatores ambientais.

ABSTRACT

Nowadays, one of the major world concerning is focused in the increasing of the damaging ultraviolet (UV) radiation and its impact on the aquatic ecosystems. In addition, the Rio Negro, one of the principal tributaries of the Amazon Basin, is an appropriate site for studying the influence of the UV radiation in the dissolved organic matter (DOM) biogeochemistry, since its high level of organic carbon (OC) production, the high rates of solar exposition and the seasonal variation of the system.

The present research had the intent to evaluate the dynamics and functionality of the Rio Negro aquatic humic substances (AHS) influenced by environmental factors such as pluviometric and fluviometric levels and the UV-vis irradiation. In order to reach these objective, the AHS from one year were classified in seasonal groups (summer, autumn, winter and spring) and characterized through the elemental analysis, copper (Cu^{+2}) complexation capacity (CC) and through the spectroscopic techniques as electronic paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance of ^{13}C (NMR ^{13}C), Fourier transformed infrared spectroscopy and UV-visible absorbance and fluorescence.

The results revealed the river seasonal changes effects on the DOM structure, being that, the winter AHS (flooding season), evidenced the highest aliphatic character from the NMR ^{13}C analysis, that can be related with the high fluviometric levels that would increasing the presence of fresh hydrophilic and not totally stabilized (MOD) from terrestrial sources. In contrast, the summer and autumn AHS (dry season) showed the greatest aromatic presence, high concentration of semiquinone free radicals, the greatest humification degrees from the fluorescence and the elevated long wavelength absorbance.

Complementarily, the AHS optical and structural properties were assessed as a function of its exposure to UV-visible irradiation using an Hg-Xe lamp (290-475 nm). In general there were observed a progressive decreasing of absorbance and color, a mineralization with a 75% carbon loss and the formation of the less complex structures inferred from the change of the maximum fluorescence to shorter wavelengths. In addition there were registered the system acidification (6- 4,5) and a total loss of the Cu^{+2} CC during the first 300 minutes of the radiation exposure.

As expected, the structure seasonal dependence influenced in the photodegradation behavior of the winter and summer AHS. The summer AHS sample (with the highest aromaticity) showed slower kinetics ($k=10,33 \times 10^{-4}$), but higher susceptibility to the UV irradiation with a 87% loss of absorbance, explained by the highest concentration of aromatic structures more resonant with the irradiation applied. On the counterpart, the winter AHS (with the highest aliphaticity) presented faster kinetics ($k=12,33 \times 10^{-4}$), reaching rapidly a stationary state with a total absorbance loss of 79%, as a result of an accelerated decomposition of its aliphatic fractions and/or the production of absorbing light recalcitrant compounds, unreactive to the wavelengths applied in this study.

Finally, these results contribute for a better understanding of the OC river fluxes and the subsequent quantification of the terrestrial and aquatic C sources and its dependence with diverse environmental factors.

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

A acelerada e alarmante diminuição do ozônio estratosférico, ocasionada pela atividade antropogênica com o subsequente incremento da radiação ultravioleta (UV) tem focalizado as pesquisas ambientais nos diversos efeitos da radiação solar na ecologia e biogeoquímica da matéria orgânica dissolvida (MOD) em ambientes aquáticos (Amon & Benner, 1996; Zepp et al., 2003; Brachinni et al., 2006).

No entanto, a relação entre a MOD e a radiação UV é recíproca. Por um lado a MOD é reconhecida por exibir varias funções cruciais no desenvolvimento dos ecossistemas aquáticos, como a atenuação de luz solar e disponibilização de nutrientes para o crescimento da comunidade biótica (Vincent et al., 1998). Por outro lado, a exposição da MOD aquática à radiação UV resulta em uma série de reações fotoquímicas com impacto direto na sua funcionalidade ambiental e biogeoquímica (Williamson et al., 1999; Hunt et al., 2000; Stubbins et al., 2006).

As principais conseqüências que podem ser observadas como resultado desse fenômeno conhecido como fotodegradação, são: perda progressiva da absorbância e cor, quebra e decomposição estrutural com formação de estruturas mais simples como ácidos orgânicos de baixa massa molar (Corin et al., 1998; Obernosterer et al., 1999; Brinkmann et al., 2003), e finalmente mineralização com produção de moléculas de água, gases de carbono (CO e CO₂) e nutrientes como amônio e fosfato (Mopper & Kieber, 2000; Del Vecchio & Blough, 2002).

Esta fotomineralização é considerada como o principal parâmetro controlador dos fluxos de carbono (C) nos rios (Corin et al., 1996; Vähätalo et al., 1999; Grzybowski, 2000; Zepp et al., 2003; Hefner et al., 2006).

Além disso, sabe-se que a fração mais significativa e fotoreativa da MOD é constituída pelas substâncias húmicas aquáticas (SHA), que são materiais biogênicos e refratários conhecidos por serem derivados da biomassa decomposta de origem terrestre e lixiviados pelos cursos de água circundantes (Rocha et al., 1999; McKnight et al., 2001; McDonald et al., 2004). Estas apresentam estrutura complexa formada por combinações de diversas entidades funcionais, em especial grupos carboxílicos, fenólicos e quinonas, cuja própria estrutura molecular não é definida, sendo tema atual de controvérsia entre pesquisadores.

Adicionalmente o fator mais relevante que outorga as SHA suas excepcionais características fotoreativas é a presença na sua composição de estruturas aromáticas conjugadas, chamadas de cromóforas (absorvedoras de luz) e fluoróforas (emissoras de luz). Estas estruturas fornecem uma ampla variedade de sítios lábeis para a promoção de fotoreações com subseqüentes mudanças na sua estrutura e funcionalidade e que podem ser diretamente observadas em alterações das suas propriedades ópticas. Portanto as variações espectrais decorrentes oferecem uma janela para o esclarecimento da complexa estrutura química da fração reativa das SHA.

Atualmente, um dos principais interesses tem se concentrado no Rio Amazonas, pois representa a maior bacia hidrográfica do mundo em termos tanto de aporte de água no oceano (aproximadamente 18%) quanto no número de afluentes. A sua descarga diária de C é ao redor de 61.3 Gg, valor que representa um fluxo de carbono orgânico total de 36.1 Tg ano⁻¹ (Richey et al., 1990). Dentre seus diversos tributários o Rio Negro, rio de águas pretas é um dos três maiores afluentes do Amazonas, contribuindo com 30 % do seu volume total. Ele é o

maior afluente também em relação ao aporte das SHA, atingindo concentrações de até 10 mg L⁻¹ (Ertel et al., 1986; Benner & Hedges, 1993; Mounier et al., 1999).

A proximidade geográfica do Rio Negro ao Equador, lhe proporciona uma privilegiada exposição das suas águas à radiação UV; bem como as altas concentrações de SHA (Ertel et al., 1986; Dittmar et al., 2006) amplamente conhecidas por sua atividade fotoreativa (Aguer & Richard, 1996; Kulovaara et al., 1996; Grzybowski, 2000), fazem da Bacia hidrográfica deste rio um sistema ideal para o estudo dos efeitos da radiação UV- visível nos processos fotoquímicos das SHA.

Contudo o objetivo do presente trabalho foi avaliar as mudanças funcionais e estruturais das SHA do Rio Negro, assim a metodologia aplicada foi dividida em duas etapas: a primeira parte teve por finalidade determinar as características estruturais e as propriedades ópticas das SHA agrupadas sazonalmente como produto de uma amostragem mensal correspondente a um ano, visando identificar uma possível variabilidade estrutural do ponto de vista sazonal. Na segunda parte foram avaliados os efeitos da radiação UV nas propriedades ópticas e estruturais das SHA, para o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na fotodegradação. Os métodos analíticos utilizados foram: determinação da composição elementar e técnicas espectroscópicas como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear de ¹³C, ressonância paramagnética eletrônica, espectroscopia de absorção e espectroscopia de fluorescência de luz UV-visível.

Finalmente os resultados assim obtidos visam contribuir com um melhor entendimento na dinâmica sazonal e fotoquímica da MOD do Rio Negro e seu impacto no ecossistema do maior contribuinte mundial de C nos oceanos.

CAPITULO 2

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 DEFINIÇÃO DE MATERIA ORGÂNICA (MO)

A MO presente nos solos, turfas, sedimentos e águas, consiste em uma mistura de compostos, em vários estágios de decomposição, resultante da degradação química e biológica de resíduos vegetais e animais, e da atividade sintética de microrganismos (Stevenson, 1994; Rocha & Rosa, 2003).

Estes organismos decompositores utilizam a energia contida nos resíduos constituídos principalmente por proteínas, carboidratos, polissacarídeos, resinas, pigmentos, lipídeos e ácidos nucleicos para sua sobrevivência, dando origem aos processos de humificação e mineralização da MO sob ação de enzimas específicas (Rocha & Rosa, 2003).

Segundo Zech et al. (1997) a humificação é o processo de transformação de reservas macromorfológicamente identificáveis em compostos húmicos amorfos. Com isso, as principais transformações que ocorrem durante a humificação, são a degradação de polissacarídeos e compostos fenólicos, modificação das estruturas de lignina, e enriquecimento em estruturas aromáticas não lignínicas recalcitrantes. A humificação bem como a decomposição de resíduos, é promovida primeiramente por processos microbiológicos, controlados principalmente por variáveis locais específicas, tais como temperatura, regime de água no solo, pH e disponibilidade de nutrientes.

A MO terrestre e aquática tem um reconhecido impacto na química do solo e da água derivado das funções amplamente reconhecidas na literatura:

- ⇒ Influenciar na biodisponibilidade e toxicidade de metais no solo para organismos animais e vegetais da micro e macrofauna (Rocha et al., 1997; Frimmel & Huber, 1996; Davies et al., 1997; Laglera & Vanderberg, 2006);
- ⇒ Influenciar no transporte, acúmulo e concentração de espécies metálicas no ambiente (Rocha et al., 2000a);
- ⇒ Controlar as propriedades físico-químicas do solo e dos sedimentos (Wershaw, 1993; Zsolnay, 2003; Kalbitz et al., 2003);
- ⇒ Influenciar na redução de espécies metálicas para a atmosfera através das suas características oxidoredutoras (Martin-Neto et al., 1991; Rocha et al., 2000a; Laglera & Vanderberg, 2003).
- ⇒ Aprimorar as principais propriedades fertilizantes do solo aumentando a retenção de calor e umidade, permeabilidade, disponibilidade de nutrientes e equilíbrio do pH, evitando assim sua erosão e perda de água (Stevenson, 1994; Mielniczuk, 1999; Bayer et al., 2002; González-Pérez et al., 2006).
- ⇒ Atuar no mecanismo de sorção de gases atmosféricos orgânicos e inorgânicos no solo (Senesi, 1999; Tanaka, et al., 2005; Alvarez-Puebla & Garrido, 2005);
- ⇒ Quando presente em altas concentrações durante o processo de tratamento de água podem reagir com o cloro, produzindo compostos orgânicos halogenados que possuem características cancerígenas (Korshin & Voilleau, 2000; Carvalho, 2003; Carvalho et al. 2004);
- ⇒ Interagir com compostos orgânicos antrópicos como pesticidas e herbicidas, através de efeitos de adsorção, solubilização, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes (Si et al., 2004; Garbin, 2004; Garbin et al., 2006).

Entretanto, a MO é classificada tradicionalmente em substâncias húmicas (SH) e substâncias não húmicas. A base da diferenciação é que as substâncias não húmicas são de

natureza definida, e são representadas por moléculas orgânicas de estrutura bem estabelecida, como aminoácidos carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, ao passo que as SH são de estrutura química complexa, compondo um grupo de compostos heterogêneos (Stevenson, 1994).

2.2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH)

As SH são moléculas orgânicas amorfas complexas formadas por combinações de diversos grupos funcionais sendo identificados principalmente grupos carboxílicos, carbonílicos, fenólicos e quinonas, entre outros, cuja massa molar aparente varia de centenas a milhares de unidades de massa atômica (u.m.a.) (Stevenson, 1994; Schulten & Schnitzer, 1997).

As SHA estão constituídas operacionalmente por ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), frações reconhecidas tanto em solos como em águas. Os AH representam a fração das SH, solúvel em meio alcalino diluído, a qual precipita pela acidificação do extrato alcalino. No entanto os AF permanecem em solução quando o extrato alcalino é acidificado (Thurman & Malcolm, 1981).

As diferenças entre AH e AF podem ser explicadas em função das variações na massa molar, número de grupos funcionais (carboxílicos, fenólicos, etc.) e extensão da agregação e combinação molecular. Os AH de alta massa molecular, possuem mais carbono em sua composição, porém apresentam menor concentração de oxigênio em relação aos AF (Malcolm & Swift, 1989).

Uma outra distinção importante entre essas frações é que nos AF, o oxigênio pode ser considerado como parte integrante dos grupos funcionais como por exemplo -COOH , -C=O , -OH . Nos AH, entretanto, uma parte do oxigênio parece ser uma componente estrutural do esqueleto aromático, formando pontes entre os anéis aromáticos ou estando inseridos neles (Stevenson, 1994).

A estrutura das SH apresenta alta complexidade e heterogeneidade molecular, fortemente dependente da origem, mecanismos de decomposição e das condições nas quais a MO desenvolve o processo de humificação (Martin-Neto et al., 1998; Simões et al., 2005). Além disso sabe-se que fatores como pH, força iônica do meio, irradiação, presença de moléculas orgânicas e inorgânicas, influenciam na sua composição, reatividade e estrutura (Kalbitz et al., 2000b; Zsolnay et al., 1999; Chen et al., 2003; Piccolo 2002). Portanto nas ultimas décadas, se tem priorizado pesquisas visando caracterizar as propriedades estruturais das SH, não existindo ate hoje um consenso acerca da teoria estrutural das mesmas.

Como produto da variedade de estudos, técnicas e amostras utilizadas, foram sugeridos diversos modelos estruturais para as SH, assim Schulten & Schnitzer (1993), propuseram um modelo dominante por muitos anos, no qual a estrutura das SH estaria composta por um conjunto de estruturas macromoleculares com partes aromáticas e alifáticas e de comportamento similar às macromoléculas biológicas tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e ligninas (Stevenson, 1994).

A Figura 2.1 mostra a representação deste modelo para AH derivado da aplicação de varias técnicas espectroscópicas, microscópicas e degradativas, onde pode-se observar, a presença de grupos funcionais de oxigênio como carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos, ésteres, éteres e grupos funcionais de nitrogênio, como aminas; os quais estão ligados a estruturas heterocíclicas e nitrilas. Posteriormente, Schulten & Schnitzer (1995) acrescentaram o modelo macromolecular mediante evidências da existência de vazios na estrutura das SH, observados na Figura 2.2(a), os quais podem constituir-se em excelentes sítios de sorção para estruturas orgânicas não polares como pesticidas.

Entretanto, Wershaw (1986, 1993) postulou uma interpretação alternativa para a estrutura macromolecular, propondo que as SH em solução, formariam agregados mistos de moléculas anfifílicas provenientes de produtos da degradação de plantas e complexos de

ligninas-carboidratos, interagindo entre eles por mecanismos que envolvem ligações fracas como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Figura 2.1 – Modelo estrutural de AH proposto por Schulten e Schnitzer (1993).

Tanford (1980), também considerou o conceito de moléculas micelares para as SH, com partes internas de natureza hidrofóbica e uma superfície externa altamente carregada de natureza hidrofílica, tomando a forma de uma estrutura tipo membrana. Embora Tanford (1980), não tenha resolvido a questão referente a se estes domínios “pseudomicelares” são formados intra ou inter-molecularmente, o modelo permitiu um melhor entendimento da interação das SH com compostos não polares como poluentes hidrofóbicos.

Em vias de uma melhor explicação do comportamento das SH, frente a fatores ambientais, Swift (1989) propôs que a conformação estrutural das macromoléculas húmicas seguiria o modelo de um polieletrólito linear, podendo ser representada por aproximações em forma de espiral ou elipsoidal. A conformação de espiral pode tomar a aparência de uma “fita” com grupos polares e cargas negativas ao longo de sua extensão. Essa estrutura flexível

resulta em agregado molecular com aparência de esfera, sendo que a sua dimensão depende da extensão da estrutura, da densidade de carga, da solvatação, da ionização dos grupos ácidos, da concentração de solutos na solução, da extensão das ramificações e das ligações intermoleculares.

Figura 2.2 – Modelos conceituais propostos pela teoria macromolecular. (a) ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer (1995), carbono=azul; oxigênio=vermelho; nitrogênio=preto e hidrogênio=branco. As letras A, B e C indicam os espaços “vazios” presentes na molécula das substâncias húmicas capazes de interagir com outros compostos. (b) conformação em forma de “fita” aleatoriamente enovelada, mostrando sua flexibilidade (adaptada de Swift, 1989).

A Figura 2.2(b) mostra a conformação aleatória da estrutura em forma de fita, este modelo é útil para explicar diferentes propriedades das SH como irregularidades na estrutura química, ligações intramoleculares e cruzadas, que fornecem a sua capacidade para suportar cargas positivas e negativas.

No entanto, Piccolo et al. (1996) e Kenworthy & Hayes (1997) foram os primeiros a mostrar evidências diretas de que a estrutura das SH poderia não ser totalmente de natureza macromolecular.

Assim, Piccolo & Conte (2000) através da combinação de técnicas de cromatografia por exclusão de tamanho e electroforese capilar, sugeriram que apesar da grande heterogeneidade das SH, a entidade húmica poderia ser fracionada em compostos de natureza

simples, dando origem à teoria supramolecular, na qual as SH estariam conformadas por diferentes agregados moleculares com comportamento micelar, procedentes de varias origens. Essas frações húmicas heterogêneas estariam associadas por forças de interação fraca (van der Waals e/ou pontes de hidrogênio) e interações hidrofóbicas que outorgariam à molécula seu aparente elevado tamanho molecular. Dentro dessa entidade supramolecular se encontrariam domínios de natureza hidrofílica e hidrofóbica (ácidos orgânicos) que são os responsáveis por seu arranjo conformacional de acordo com fatores como pH, concentração iônica, temperatura, entre outros (Piccolo & Conte, 2000; Piccolo, 2002; Simpsom et al., 2002).

Figura 2.3 – Esquema de estrutura das SH proposto por Simpson et al. (2002). As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as unidades pretas os polissacarídeos, as unidades azuis os polipeptídeos, as unidades verdes as cadeias alifáticas e as unidades marrons os fragmentos aromáticos derivados da lignina.

Baseado na natureza supramolecular das SH Piccolo, (2001); explica que os AF são associações de pequenas moléculas hidrofílicas dispersas em solução devido à repulsão eletrostática das cargas negativas provenientes da dissociação dos grupos ácidos, como os carboxílicos, a qualquer valor de pH, e que os AH estariam constituídos por associações de estruturas predominantemente hidrofóbicas (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos e esteróides), que são estabilizadas em pH neutro por forças dispersivas hidrofóbicas (van der

Waals, π - π , e ligações CH- π) e que a influência do pH ocorreria por meio da protonação da molécula e conseqüente aumento das ligações de hidrogênio intermoleculares.

Posteriormente, Dialho et al. (2003), utilizaram a combinação de ferramentas de caracterização química com simuladores computacionais a nível atômico para sugerir modelos estruturais tridimensional das SH. Estes modelos se baseiam no tratamento de bases de dados proporcionados pela caracterização química e estrutural e propriedades termodinâmicas, fornecendo modelos aproximados que são capazes de prever outras propriedades relacionadas ao nível molecular, como densidade, solubilidade, espectros de ressonância magnética nuclear, etc.

Apesar de que esses modelos tridimensionais de AH caracterizaram com grande exatidão as amostras estudadas, eles não explicam a variabilidade de conformação macromolecular frente a diferentes meios, nem a concentração de ligações covalentes na sua estrutura (Schaumann, 2006; Buffle, 2006).

Contudo, a relevância de ter um modelo definitivo para as SH é extremamente óbvia, devido a sua determinante funcionalidade nos ecossistemas naturais terrestres e aquáticos. Embora, ainda exista debate ao respeito da teoria estrutural, existem características bem definidas outorgadas para a estrutura molecular das SHA como: a variabilidade e heterogeneidade estrutural em razão à origem e ao meio decorrente, a existência de sítios hidrofóbicos que são excelentes sítios de sorção para compostos não polares tais como pesticidas e outros xenobióticos orgânicos, a multiplicidade funcional e de sítios ligantes e a sua elevada fotoreatividade derivada da existência de grupos aromáticos e estruturas conjugadas chamados de cromóforos.

2.3 MATERIA ORGÂNICA DISSOLVIDA EM AMBIENTES AQUÁTICOS (MOD)

A MO em sistemas aquáticos pode ser dividida em matéria orgânica particulada (MOP) e MOD, a diferenciação entre ambas está baseada em critérios operacionais, assim

Thurman & Malcolm (1981); Kalbitz et al. (2000); McDonald et al. (2004); separam a MOP da MOD através da utilização de membranas de filtro de 0,45 µm sendo MOD a fração que passa pela membrana e que está constituída por uma mistura de macromoléculas orgânicas de natureza aromática e alifática, com massa molecular compreendida, aproximadamente, entre 500 e 1×10^6 Da (Bracchini et al., 2006).

A MOD é um importante componente nos ecossistemas aquáticos, por apresentar diversas funções específicas nos ciclos biogeoquímicos de diversos elementos (Williamson et al., 1999), constituindo-se tanto em reagente quanto em produto do ciclo do carbono, e disponibilizando assim biomoléculas lábeis, fonte de energia para a biota, controlando os níveis do oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre e numerosos íons metálicos na natureza (Leenheer & Croue, 2003).

A MOD é originada a partir de processos de degradação de diversos materiais orgânicos, usualmente espécies macrófitas e plâncton. Dessa forma, as principais fontes de MOD nos ecossistemas aquáticos, podem ser representadas pela biomassa viva e pela MO detritica. Segundo Wetzel (1983), o termo “detritico” pode ser definido como a perda não predatória de carbono orgânico proveniente de qualquer nível trófico (incluindo gestão, excreção, secreção etc) ou como sendo o ingresso de carbono orgânico a partir de fontes externas ao ecossistema (Wetzel, 1983; Munster & Chróst, 1990).

Diversos autores têm demonstrado que as características estruturais e químicas das moléculas da MOD controlam sua função e interação no meio ambiente, portanto mudanças na estrutura, massa molecular, composição elementar e teor de grupos funcionais podem alterar a solubilidade (Stevenson, 1994), capacidade tampão (Wilson, 1979), interações com íons metálicos e moléculas orgânicas (Thurman & Malcolm, 1995), a atenuação de luz (Tipping et al., 1998) e a biodisponibilidade de diversas estruturas e elementos (Zepp et al., 1998, 2003).

Baseados na sua natureza polar, Thurman & Malcolm (1981) e Frimmel et al. (1992) fracionaram a MOD mediante resinas macroporosas não iônicas, resultando em um rendimento de extração para as substâncias húmicas aquáticas (SHA) de aproximadamente 80%, estabelecendo assim que estas estruturas representam significativamente as características moleculares da MOD na sua totalidade.

2.3.1 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS (SHA)

As SHA são os principais constituintes da reserva de carbono orgânico dissolvido (COD) em águas superficiais e subterrâneas que outorgam a cor marrom-amarelada característica dos sistemas aquáticos ricos em MOD (Mopper et al., 1991; Miller & Zepp, 1995; Dittmar et al., 2006). Apesar das diferentes origens responsáveis pela variabilidade estrutural e composicional e dos diversos métodos de extração registrados na literatura, as SHA podem ser reconhecidas em geral como uma mistura polidispersa e heterogênea de moléculas orgânicas refratárias produto de reações de condensação e de degradação química e biológica (Abbt-Braun et al., 2004).

Por outro lado Thurman & Malcolm (1981) baseados em métodos cromatográficos de extração, definiram as SHA como a porção não específica e amorfa, constituída de MOD em pH 2,0 e adsorvida em coluna de resina XAD-8 com altos valores de coeficientes de distribuição.

As SHA podem ser também fracionadas por sua vez em AH e AF, os AH são definidos como a fração não solúvel em condições ácidas ($\text{pH} < 2$), mas solúveis a pH maiores, enquanto os AF representam a fração solúvel para todos os valores de pH. Embora esta classificação esteja baseada na química do solo, a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) assume a mesma terminologia para as SHA (McDonald et al., 2004).

A formação do húmus em águas está diretamente relacionada com o ambiente aquático e diagenético. Dessa forma, o tipo de água (rios, lagos ou mar), o solo circundante e os fatores

climáticos são variáveis determinantes na sua formação por processos de humificação (McDonald et al., 2004). Adicionalmente, verifica-se que a concentração das SHA varia de acordo com a profundidade da coluna de água, apresentando uma tendência crescente em relação ao estado trófico do ambiente (Thurman, 1985; Miller, 1998; Kieber, 2000).

Segundo Thurman (1985), várias são as hipóteses sobre a formação das SHA, incluindo:

- ⇒ Entrada de MO de plantas diretamente para a água e/ou através do solo, com subsequente modificação química e bioquímica;
- ⇒ Lixiviação de AF e AH originários do solo;
- ⇒ Ação bacteriana sobre algas e fitoplâncton;
- ⇒ Incidência de irradiação UV sobre a MO, presente na superfície de sistemas aquáticos, podendo catalisar as reações de condensação;
- ⇒ Reações de condensação entre grupos funcionais fenólicos, amino e aldeídos presentes em produtos biológicos, abundantes em lagos eutróficos e águas sedimentárias.

Nessa diversidade de mecanismos de formação, as SHA apresentam em geral dois tipos de origem (Hertkorn et al., 2002; Rocha & Rosa, 2003):

- ⇒ Origem alóctone, no qual as SHA são transportadas desde os solos por lixiviação e/ou erosão até os lagos, rios e oceanos pelas águas de chuvas, pequenos cursos de água e águas subterrâneas, e
- ⇒ Origem autóctone, no qual as SHA são derivadas dos constituintes celulares e da degradação de organismos aquáticos nativos.

As SHA diferem das SH terrestres fundamentalmente na composição elementar e concentração de grupos funcionais, pois as primeiras apresentam menor massa molar, maior teor de grupos carboxílicos e menor teor de grupos fenólicos (Schmitt-Kopplin et al., 1998;

Rocha & Rosa, 2003), resultando também em uma diferente proporção entre AH e AF, de maneira geral, as SHA são compostas por um 90% de AF e 10% de AH.

Por outro lado as SHA são também reconhecidas como os principais compostos absorvedores da radiação solar e como a fração com maior atividade óptica da MOD (Canônica et al., 1995; Bracchini et al., 2004; 2006). Assim as SHA são os maiores constituintes bio-ópticos na atenuação da radiação solar UV (290-400 nm) na coluna de água (Shindler et al., 1996), propriedade que se deve à elevada concentração de estruturas químicas ativas formadas por sistemas aromáticos e conjugados de carbonila, conhecidas como estruturas cromóforas.

Em razão da diversidade dessas estruturas, o espectro de absorção de luz UV-visível das SHA não apresenta nenhuma banda definida e exibe um aumento exponencial com a diminuição do comprimento de onda, provavelmente originada pela sobreposição de suas bandas máximas de absorção. Nesse contexto de diversidade, abundância e variabilidade das espécies cromóforas; as SHA fornecem uma elevada multiplicidade de sítios lábeis e excitáveis pela radiação para a promoção de fotoreações, com impacto direto nas suas propriedades ópticas, oferecendo assim informação estrutural derivada da fração reativa das SHA.

2.3.2 INTERAÇÕES ENTRE AS SHA E A RADIAÇÃO SOLAR

A relação entre as SHA e a luz solar é recíproca. Por um lado, a concentração das SHA é o principal fator controlador da atenuação da região UV nos ambientes riveirinhos (Kieber et al., 1990; Morris & Hargreaves, 1997; Bracchini et al., 2004) e por outro a interação das SHA e a radiação UV resulta em numerosas reações fotoquímicas com consequências bastante reconhecidas nos ambientes aquáticos (Lindell et al., 1995).

Atualmente, essa reciprocidade vem sendo alvo de crescente interesse devido ao fato do acelerado aumento de intensidade da radiação UV, com a subsequente redução do teor de ozônio na estratosfera (Shmitt-Kopplin et al., 1998; Kieber, 2000; Lepane et al., 2003).

Desse modo, o mencionado efeito protetor das SHA contra a perigosa radiação UV, depende de sua concentração, composição e estrutura nos ambientes naturais. Assim tem sido reportado (Moran & Zepp, 1997, Minor et al., 2006) que as SHA são significativamente afetadas e degradadas por processos fotoquímicos. Uma das principais manifestações das mudanças estruturais decorrentes, pode ser verificada na perda progressiva de cor e absorção de luz UV, este fenômeno conhecido como fotobranqueamento (do termo em inglês photobleaching), aumenta a transparência das águas com os possíveis efeitos negativos nas comunidades bióticas (Vincent et al., 1998).

Adicionalmente, a fotodegradação gera na seqüência uma série de fotoprodutos, classificados por Moran & Zepp, 1997 em quatro categorias:

- (i) Compostos orgânicos de baixa massa molecular como ácidos glioxílicos e metilglioxílicos, formaldeídos, cetonas, glioxilatos e piruvato (Kieber et al., 1990, Kieber, 2000; Lindell et al., 1995; Mopper & Kieber, 2000; Si et al., 2004);
- (ii) Gases de carbono (principalmente CO₂, CO e CH₄);
- (iii) MO não identificável e
- (iv) Compostos derivados de fósforo e nitrogênio (incluindo NH₄⁻ e PO₄³⁻)

Zagarese et al. (2001), demonstraram por meio de bioensaios, diferenças significativas no crescimento e desenvolvimento das comunidades de microrganismos presentes nos ecossistemas aquáticos quando comparou amostras de MOD irradiadas e não irradiadas, propondo que estas diferenças seriam causadas principalmente pela produção e consumo de nutrientes lábeis constituídos principalmente por derivados de ácidos carboxílicos e carbonílicos.

O impacto da fotodegradação nos processos biogeoquímicos também foi registrado na literatura (Ammon & Benner, 1996; Kieber 2000; Mopper & Kieber, 2000; Patel-Sorrentino et al., 2004; etc), estabelecendo seu papel significativo como fonte de mineralização e remoção do COD em ambientes aquáticos, com suas respectivas conseqüências na biogeoquímica de outros elementos como N, O e diversos metais.

Do ponto de vista estrutural, se sabe que uma molécula típica das SHA contém grupos conjugados como quinonas, cetonas e derivados, capazes de agir com os fótons emitidos por uma fonte de radiação (Zepp et al., 2003). Conseqüência disso a fotodegradação poderia ser definida como o processo pelo qual as macroestruturas das SHA são quebradas em compostos de menor complexidade molecular através de diversos mecanismos primários e secundários de oxido redução, diferenciados por meio das vias reativas envolvidas, assim são identificadas duas vias de transformação que podem ser paralelas e simultâneas (Miller, 1998):

- ⇒ Fotodegradação direta: que envolve principalmente reações de transferência de carga (fotosensibilização), transferência de energia e fotoincorporação. Nas reações de transferência de carga, as moléculas das SHA excitadas podem doar energia de excitação para uma molécula receptora que não absorve a radiação de excitação; entretanto nas reações de transferência de energia, a molécula das SHA pode reagir com outras moléculas orgânicas mediante a transferência fotoinduzida de um elétron; e finalmente nas reações de fotoincorporação, estão envolvidas reações como combinação de radicais ou cicloadição que resultam na incorporação de constituintes reativos de menor tamanho na molécula das SHA mediante formação de ligações covalentes.
- ⇒ Fotodegradação indireta: promovida pela formação de espécies reativas intermediárias derivadas da MOD, chamadas de fototransientes. Entre os quais podem se mencionar: singlete de oxigênio ($^1\text{O}_2$), radicais peroxila ($\text{ROO}^\cdot$), e

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), elétron aquoso ($e_{\text{aq-}}$), ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxil ($\text{OH}^\cdot$) e SHA excitadas em estado tripleto. Todas estas espécies são altamente reativas e têm tempos de vida curtos na ordem de nanosegundos, mas a sua relevância é devida a sua natureza catalizadora da fotodegradação das SHA e de outras moléculas de interesse ambiental (Goldstone et al., 2002).

Finalmente, as alterações estruturais fotoinduzidas nas SHA podem se resumir nos seguintes efeitos: redução do COD e massa molecular (Frimmel, 1998a; Munster, 1999), mudanças nas propriedades ópticas, produção de uma complexa mistura de espécies reativas de oxigênio (Goldstone et al., 2002) e fotoprodutos de carbono, onde a maior parte deles resultam em CO_2 e/ou espécies inorgânicas como carbonatos, decorrentes da mineralização (Lindell et al., 1995).

2.3.3 INTERAÇÕES ENTRE AS SHA E AS ESPÉCIES METÁLICAS

A propriedade da MOD de influenciar no destino, transporte e biodisponibilidade dos elementos metálicos, e de atuar como tampões metálicos é atribuída à capacidade de complexação (CC) apresentada pelas estruturas ligantes existentes (Frimmel, 1990, Zhang, 1996).

Burba et al. (1994) determinaram que a fração da MOD de massa molar entre 1000 e 10 000 Da. (intervalo de massa correspondente aos AF), apresenta a maior afinidade pelas espécies metálicas e os compostos orgânicos. Com isto as SHA são consideradas como ligantes macromoleculares polifuncionais que tornam íons metálicos tóxicos não disponíveis e que auxiliam na biodisponibilidade de micronutrientes importantes para os seres vivos (Nifant'eva, 1999; Jansen, et al., 2000).

As principais estruturas envolvidas no processo de complexação são mostradas na Figura 2.4, onde se observam estruturas como catecol, ftalato e salicilato, que podem formar

complexos com cátions polivalentes (Cu_2^+ , Fe_3^+ e outros) e/ou ligações coordenadas com moléculas orgânicas (Thurman, 1985).

Figura 2.4 - Exemplos de grupos funcionais existentes nas SHA disponíveis para reações de complexação (a) catecol; (b) ftalato; (c) salicilato.

O mecanismo de especiação e a estabilidade termodinâmica dos complexos formados são influenciados por diversos fatores como pH, potencial redox, tipo e concentração de ligantes orgânicos e inorgânicos como hidróxidos e bicarbonatos, material particulado e coloidal.

Além das propriedades composicionais inerentes às SHA como o alto teor de oxigênio estrutural, várias características baseadas nas propriedades macromoleculares têm sido referenciadas como responsáveis da sua excepcional afinidade pelas espécies metálicas (Zhang, 1996; Rocha & Rosa, 2003), entre elas podem se citar :

⇒ Propriedades polifuncionais: os grupos funcionais do oxigênio, predominantes na atividade complexante são os grupos carboxílicos e fenólicos, algumas das espécies destes grupos presentes nas SHA são listados na Tabela 2.1. Entre eles, os de maior estabilidade termodinâmica, são aqueles que formam complexos bi ou multidentados como os ácidos salicílicos ou difenóis (Fish & Morel, 1985). Outros grupos complexantes de elementos doadores de elétrons como o nitrogênio e o enxofre, estão distribuídos em grupos peptídeos, sulfônicos e tióis nas SHA (Buffle, 1990). Embora esses grupamentos possuam uma maior afinidade por

alguns metais, as suas baixas concentrações limitam a interação dos mesmos com metais presentes no meio.

Tabela 2.1 –Ligantes contendo oxigênio na estrutura das SHA.

Ligantes	Referências
Ácido Salicílico	Buffle (1990)
Fenólicos – Ácidos hidroxibenzóicos	Buffle (1990)
1-2 Difenóis	Buffle (1990)
Catecol	Buffle (1990)
Ácido ftálico	Buffle (1990)
Carboxílico - Ácido hidroxâmico	Burba (1998)
Ácido cítrico	Buffle (1990)

Adaptado de Rocha & Rosa, 2003.

- ⇒ Cargas conformacionais: a formação de complexos mistos é favorecida pela grande extensão da molécula e pela ocorrência simultânea de diversos tipos de interações: como ligações π , interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações apolares de sítios hidrofóbicos e interações de Van der Waals (Buffle, 1990). Segundo a teoria macromolecular das SHA, a agregação e conformação no meio, dependem da concentração iônica e pH na solução, fatores que influenciam nos processos de hidratação, desidratação e formação de pontes de hidrogênio e assim nas ligações com íons metálicos.
- ⇒ Propriedades polieletrólíticas: um aumento na ionização dos polieletrólitos orgânicos provoca um acréscimo na repulsão intermolecular, resultando na desagregação da molécula, portanto ligações com cátions metálicos permitem a neutralização dessas forças repulsivas, promovendo a contração do polímero. Altas concentrações de íons metálicos favorecem a compactação e hidrofobicidade da estrutura molecular das SHA, com uma elevada probabilidade de coagulação e precipitação dependendo da razão cátion/íon carboxilato e da carga do cátion. Em geral para baixas razões de metal/carboxilato, os complexos húmicos são solúveis em sistemas aquáticos (Gaffney et al, 1996).

- ⇒ Propriedades hidrofílicas: polímeros orgânicos e inorgânicos em sistemas aquáticos contêm grande número de sítios hidrofílicos (-OH; -COOH; -NH₂; -SH) causantes do alto grau de hidratação, assim o processo de hidratação influencia a estrutura tridimensional da macromolécula e a estabilidade dos sítios complexantes vizinhos (Gaffney et al, 1996).

Contudo devido a mudanças no tamanho e rearranjos conformacionais de agregação e desagregação derivados das ligações e forças interatômicas, as SHA são extremamente importantes no transporte e concentração de metais tóxicos e nutrientes no ambiente, pela capacidade de formar complexos estáveis e solúveis que podem migrar por grandes distâncias ou precipitar, estes fenômenos dependem principalmente da concentração e carga do cátion, grau de ionização da molécula orgânica e força iônica do meio.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SHA

Dada a vasta complexidade e heterogeneidade estrutural das SHA, diversos métodos analíticos têm sido usados para sua extração e caracterização, métodos que são continuamente desenvolvidos e aprimorados para poder gerar um melhor entendimento das frações componentes das SHA. Nos últimos tempos, tem surgido um especial interesse na procura do desenvolvimento de técnicas com uma alta sensibilidade que permitam a detecção e análise das SHA in natura (Abbt-Braun et al., 2004).

Embora, a complexa dinâmica das SHA e a variabilidade das suas propriedades no ambiente aquático tenham sido avaliadas com cada uma das técnicas analíticas atualmente disponíveis, os melhores resultados foram obtidos mediante a combinação delas, fornecendo dados determinantes em vias de uma caracterização estrutural mais precisa (McDonald et al., 2004).

As técnicas espectroscópicas representam uma das ferramentas mais poderosas para a caracterização estrutural das SHA, sendo que algumas podem ser aplicadas em amostras sem

tratamento prévio de extração, como por exemplo, as espectroscopias de fluorescência e de absorção de luz UV-visível. Assim também, a sua combinação permite a obtenção do máximo de informação possível acerca das características das SHA, e a comparação dos dados obtidos fornece ferramentas para sua validação e seu desenvolvimento.

2.4.1 MÉTODOS QUÍMICOS

2.4.1.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR (CNHS)

A composição elementar representa a caracterização mais fundamental dos compostos orgânicos e pode ser determinada com grande precisão (Hedges et al., 2000; Abbt-Braun, 2004). Esta se realiza principalmente em relação ao teor de nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre por meio da decomposição da amostra por combustão, sendo que a mistura de gases produzida é eluída e separada em uma coluna cromatográfica, possibilitando a detecção, na sequência de N₂, CO₂, H₂O e SO₂. O teor de oxigênio é calculado posteriormente por diferença.

As SHA variam em composição dependendo de diversos fatores, mecanismos e materiais de origem, micro e macro flora circundante, salinidade do ambiente aquático e método de extração utilizado, no entanto as semelhanças são mais significativas que as diferenças (Gaffney et al., 1996).

O intervalo de composição elementar característico das SHA é relativamente curto sendo aproximadamente de 40 – 60% para C; 30 – 50% para O; 4 – 5% para H; 1-4% de N; 1-2% de S e de 0 – 0,3% de fósforo (Rocha & Rosa, 2003).

A concentração de cinzas, em geral tipifica o método de extração utilizado, assim SHA isoladas com resina XAD 8, têm baixos teores de cinza, quando comparados com SHA isoladas com membranas, como é o caso da osmose reversa (Abbt-Braun et al., 2004).

Adicionalmente, aos valores da composição elementar a sua correlação por meio de razões atômicas H/C, O/C e N/C também fornece informação derivada da presença de grupos funcionais e reatividade das SHA (Abbt-Braun et al., 2004).

A razão H/C é um indicador do grau de saturação dos átomos de C e/ou estruturas ramificadas na molécula, uma baixa razão indica uma elevada presença de estruturas insaturadas e, uma menor concentração de ligações duplas (Frimmel, 1998b, Brinkmann, 2003). Uma outra informação que pode ser inferida dessa razão, está relacionada com o grau de humificação das SHA, menores relações indicam maior grau de humificação, devido a que este processo é definido como o enriquecimento de estruturas aromáticas conjugadas nas SH (Zech et al., 1997).

A razão O/C é indicada para fornecer informação comparativa do grau de oxidação e conteúdo de carboidratos e. Alguns autores a relacionam também com o teor de cinzas o a técnica de extração utilizada. Assim Abbt-Braun & Frimmel, (1999) acharam em SHA extraídas com osmose reversa que os altos valores de oxigênio corresponderiam à presença de material inorgânico (NO_3^- , SO_2^- e CO_3^{2-}). Estas considerações foram também relacionadas para altas concentrações de N e S.

Por outro lado os dados da razão N/C indicariam evidências sobre a origem das SH (Zech et al., 1997), seus valores elevados são associados com SHA derivadas de uma alta atividade microbiana (e.g. águas efluentes de esgoto doméstico), enquanto valores baixos de N/C são encontrados em SHA extraídas de sistemas com elevada presença vegetal (Abbt-Braun et al., 2004).

2.4.1.2 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM SHA

Qualquer modelo de especiação química deve ser capaz de distinguir as formas do íon metálico livre das formas complexadas. Na maioria dos casos, a concentração do íon metálico livre é determinada e em seguida é estimada a concentração do íon complexado (Romão,

2003). Portanto a quantificação de metais em SHA exige a utilização de métodos analíticos com elevada sensibilidade, pois sua escolha influencia nos resultados devido aos diferentes aspectos operacionais envolvidos.

Vários métodos têm sido utilizados para obter informações sobre a CC das SHA em relação ao cobre (Cu^{+2}), íon amplamente utilizado nesses estudos em razão a formar complexos estáveis com vários ligantes de ocorrência natural na água. Entre os métodos utilizados podem se citar a voltametria (Frimmel & Abbt-Braun, 1991), potenciometria (Burba, et al., 1994), ultrafiltração combinada com espectroscopia de absorção atômica (Rocha, et al., 2002), polarografia (Frimmel & Huber, 1996), fluorescência (Frimmel, 1992) e cromatografia (Buffle, 1990).

A ultrafiltração (UF) é um dos métodos citados na literatura para extrair, concentrar e fracionar as SHA em diferentes tamanhos moleculares por meio do uso de membranas porosas (Burba et al., 1995; Romão, 2003; Rocha & Rosa, 2003).

Burba et al. (2001); utilizaram a técnica de UF em fluxo tangencial e estágio simples (UF-FT) na determinação de propriedades de complexação de íons Cu^{+2} por ligantes macromoleculares. A Figura 2.5, mostra uma unidade de UF com fluxo tangencial que permite a filtração relativamente rápida e sem problemas por obstrução de poros, pois os compostos acumulados na superfície da membrana são deslocados pelo forte fluxo cruzado.

O procedimento de UF para avaliação da especiação de metais baseia-se na separação das espécies metálicas livres das complexadas com as SH por filtração em membrana de 1 kDa., onde a retenção do ligante e complexo pela membrana deve ser completa. Devido a que as SH apresentam tamanhos moleculares maiores a 1 KDa, elas e seus complexos ficam retidos na membrana, enquanto que o íon metálico deverá ser filtrado. A concentração do metal livre será igual á concentração determinada no filtrado e o metal complexado será obtido por diferença. Neste caso o procedimento é capaz de fornecer parâmetros de

complexação como CC, constantes de troca, estabilidade dos complexos e afinidade de espécies metálicas por SH (Rocha & Rosa, 2003; Burba et al., 2001; Romão et al., 2003).

Figura 2.5 - Esquema do procedimento de UF-FT para determinação da CC Cu²⁺. Adaptado de Burba et al. (2001).

A principal vantagem da UF-FT é não possuir limitação em relação à natureza do íon metálico, nem à natureza do ligante. Além disso, os limites de detecção dos metais são determinados pela sensibilidade da técnica empregada para sua detecção (e.g. espectrometria atômica) (Burba et al., 2001).

2.4.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Diversas técnicas espectroscópicas tem sido amplamente aplicadas para analisar qualitativamente e quantitativamente a estrutura húmica. Técnicas como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1 e de carbono 13 (RMN ¹H e RMN ¹³C), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), absorção e fluorescência de luz UV-visível e a combinação entre elas permitiram progressos significativos, no conhecimento da química das SH, principalmente no referente

aos grupos funcionais e sua dinâmica estrutural (Schnitzer & Kahn, 1978; Malcolm & Swift, 1989, Senesi et al., 1989 e 1990a; Martin Neto et al., 1991; Bayer et al., 2002; Milori et al., 2002; Chen et al., 2003).

Dentre elas a espectroscopia de FTIR tem sido aplicada para o estudo dos grupos funcionais em moléculas orgânicas, mas a sobreposição das bandas espectrais características das SH, levaram a busca de técnicas com maior resolução, assim a espectroscopia de RMN ¹³ C, com suas mais diversas técnicas associadas, possui um enorme potencial para o entendimento da natureza e grupos funcionais presentes na estrutura das SH (Gaffney et al., 1996; Abbt-Braun et al., 2004; McDonald et al., 2004).

Por outro lado, o interesse em técnicas espectroscópicas com alta sensibilidade como absorção e fluorescência de luz na região UV-visível tem se incrementado na atualidade, devido a que possibilitam uma caracterização simples e direta em amostras sólidas e líquidas evitando os controversos métodos de extração que representam mudanças na natureza química das SHA (Chen et al., 2003).

2.4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

A espectroscopia de RPE fundamenta-se no fenômeno de absorção de energia por elétrons desemparelhados em átomos, íons ou moléculas, quando sujeitos à ação de um campo magnético externo (H_0) gerado pela radiação de baixa energia na região de microondas (10^{12} - 10^9 Hz). As entidades que apresentam esta propriedade são chamadas de espécies paramagnéticas, dentro das quais incluem-se elementos de transição, semicondutores e radicais livres (Marques, 1998; Novotny, 2002).

As espécies paramagnéticas quando expostas a um campo magnético externo de alta intensidade (H_0), sofrem o chamado efeito Zeeman, ocorrendo um desdobramento dos níveis de energia que apresentem degenerescência. A separação entre esses níveis de energia é dada pela expressão:

$$\Delta E = g\beta H_0 \quad (2.1)$$

onde β o magnéton Bohr e g é a constante de proporcionalidade conhecida como fator giromagnético do elétron que representa a sua mobilidade na molécula em análise.

O espectro de RPE é obtido aplicando-se sobre a amostra um fluxo de radiação de baixa energia, ressonante com a transição electrónica da espécie em estudo. A absorção de energia incidente e a conseqüente transição do elétron desemparelhado são detetadas pelo equipamento de RPE na forma de pulso e apresentadas na forma de primeira derivada do sinal, como pode ser observado na Figura 2.6 (Garbin, 2004).

Figura 2.6 - Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico: (a) efeito Zeeman; (b) forma da linha de absorção de energia do campo de microondas e (c) primeira derivada da linha de absorção.

A espectroscopia de RPE não é destrutiva e não usa radiação ionizante, sendo capaz de detectar até 10^{12} spins em 0,1 mL em uma ampla variedade de sistemas com amostras sólidas, líquidas e gasosas, vantagens que permitem a sua aplicação na identificação e determinação de espécies paramagnéticas em sistemas complexos como as SH.

Os radicais livres presentes nas SH, podem influenciar significativamente nas propriedades oxido redutoras da MO natural e na reatividade de muitos substratos orgânicos e inorgânicos (Senesi, 1977; Senesi & Steelink, 1989; Scott et al., 1998). O sinal do radical livre nas SH é atribuído principalmente a estruturas do tipo semiquinona possivelmente conjugadas a anéis aromáticos e com contribuições menores de radicais metoxibenzoicos.

Os radicais livres do tipo semiquinona (RLS) nas SH são formados pela dehidrogenação oxidativa de compostos fenólicos (Riffaldi & Schnitzer, 1972) e estão em equilíbrio com as formas quinona e hidroquinona, como ilustra a Figura 2.7 (Martin Neto et al., 1991).

Os RLS são muito estáveis e estão relacionados com reações de polimerização/despolimerização (Jezierski et al., 1998), grau de humificação e estabilidade da MO (Riffaldi e Schnitzer, 1972; Martin-Neto, 1991; Jezierski et al., 1998; Olk et al., 1999) e interação com metais, pesticidas e poluentes orgânicos (Marques, 1998).

Figura 2.7 - Diagrama de estabilização do radical livre semiquinona (Senesi & Schnitzer, 1977).

Geralmente os espectros dos RLS em amostras sólidas das SH não apresentam estrutura hiperfina, o que torna impossível qualquer outra descrição da estrutura química destes radicais (Senesi, 1977; Cheshire & McPhail, 1996). Assim a área sob a curva de absorção de um sinal de RPE é diretamente proporcional ao número de centros

paramagnéticos que contribuem para a ressonância, desse modo a concentração de spins de uma amostra é obtida comparando-se a área do seu sinal com a de um padrão cuja concentração de spins seja conhecida.

A concentração de RLS nas SH depende de numerosos fatores tanto laboratoriais como: pH, irradiação, hidrólise ácida, metilação, temperatura, condições redox (Senesi & Schnitzer, 1977); quanto ambientais, que atuam na sua produção e estabilização, como material de origem; clima (Martin-Neto et al., 1998); e presença de íons metálicos (Jezierski et al., 1998; Novotny & Martin-Neto, 2002) e/ou poluentes como óxidos de enxofre, nitrogênio (Jezierski et al., 1998). Por tanto as medidas de RLS permitem monitorar a presença e reatividade das SH no meio ambiente (Sposito et al., 1996; Jezierski et al., 1998; Martin-Neto et al., 1998).

2.4.2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN ^{13}C)

A espectroscopia de RMN do isótopo de carbono 13 (^{13}C) tem sido utilizada como uma poderosa ferramenta para estudar as SH pois, fornece informação estrutural das características conformacionais dos núcleos de carbono e a sua dinâmica com alguns fatores ambientais, assim como dos seus processos de transformação e decomposição (Lu et al., 2001; Preston, 1996; Cook & Langford, 1996).

O recente crescimento no uso de RMN para o estudo da SH e a contínua sofisticação das suas metodologias, deriva-se nos grandes avanços na teoria e aparelhagem para a sua aplicação. Um dos maiores avanços que tem ajudado no estudo estrutural das SH é a introdução de instrumentos de alto campo, sondas invertidas, sondas criogénicas, sondas para estado sólido com maiores sensibilidades e sondas para altas velocidades no ângulo mágico. Além disso, na parte dos procedimentos experimentais registram-se novas seqüências de pulso e técnicas como ângulo mágico para atingir uma melhor resolução (Cook, 2004).

Como todas as formas de espectroscopia, a RMN trata da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Entretanto, diferencia-se da espectroscopia óptica em vários aspectos fundamentais, tais como: primeiro, a separação entre os níveis de energia é resultado da interação do momento magnético μ de um núcleo atômico com o campo magnético B_0 aplicado; segundo, a interação se realiza com a componente magnética da radiação eletromagnética em vez da componente elétrica (Bathista, 2005).

Quase todos os elementos químicos têm ao menos um isótopo com um núcleo atômico que possui momento magnético μ , e quando este é excitado por um campo magnético externo, na região de radiofrequência (**rf**) ressonante com sua frequência de precessão (ν_0), o núcleo é retirado de seu estado fundamental através de transições de dipolo magnético entre os dois estados de spins.

A separação entre os níveis energéticos gerados esta dada pela expressão matemática:

$$h \nu = \Delta E = g \gamma B_r \quad (2.2)$$

onde h é a constante de Planck, ν é a frequência da radiação incidente e g é a constante giromagnética característica de cada elemento, B_r é o campo magnético em que ocorre este fenômeno.

A equação 2.2 representa a condição de ressonância. Essa condição depende de constantes próprias da partícula em questão (g e γ) e do B_r aplicado, sendo que o campo magnético efetivo (B_{efet}) a que determinada partícula é submetida não é necessariamente apenas o B aplicado, devido à existência de campos magnéticos locais (B_{local}), decorrentes de outras interações magnéticas, que se somam vetorialmente ao B para produzir o B_{efet} que age sobre a partícula. Devido a isto, a condição de ressonância dada pela relação (2.2) ocorrerá em um valor de B diferente daquele para a partícula livre.

Após este estímulo na forma de um pulso, os spins nucleares excitados retornarão ao estado fundamental emitindo radiação eletromagnética cuja frequência depende de detalhes

estruturais como as nuvens eletrônicas próximas a este núcleo. Com isto núcleos do mesmo elemento, porém em diferentes ambientes químicos, poderão apresentar diferentes frequências de precessão (Novotny, 2002).

É comum as frequências de ressonância serem expressas em termos de uma quantidade empírica chamada de deslocamento químico (δ) que é obtida pela diferença entre as frequências de ressonância do núcleo em questão ($\tilde{\nu}$) e de um padrão usado como referência.

A metodologia mais amplamente usada para a caracterização de SH em geral é RMN ^{13}C em estado sólido, via polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP-MAS) (Preston, 1996). A aplicação de RMN em estado sólido apresenta muitas vantagens dentre as quais podem se incluir:

1. Não existem efeitos de solvente,
2. Minimização no manuseio da amostra,
3. Estabilidade das amostras sólidas,

A técnica de (CP-MAS) RMN ^{13}C é composta de três partes. Na primeira, conhecida como polarização cruzada (CP), a polarização observada nos ^1H (mais especificamente os spins dos prótons abundantes), é transferida à polarização dos ^{13}C (ou mais especificamente os spins dos núcleos raros). Na segunda parte, a amostra é precessionada fisicamente com uma inclinação de $54,74^\circ$ em relação ao campo magnético aplicado, esse valor conhecido como “ângulo mágico” corresponde à eliminação do segundo termo polinomial de Legendre $P_2=(3\cos^2\theta-1)$ utilizado na resolução dos operadores hamiltonianos do momento magnético dipolar do núcleo. Finalmente, a terceira parte envolve desacoplamento dos spins dos prótons durante a aquisição (Jeschke, 2003).

O elemento carbono possui dois isótopos estáveis, o carbono 12 ^{12}C e o carbono 13 ^{13}C , cujas abundâncias naturais são 98,9 e 1,1%, respectivamente. Destes somente o ^{13}C

possui momento magnético, com isto a espectroscopia de RMN do carbono limita-se a este isótopo, fazendo com que a sensibilidade seja também limitada a este isótopo (Cook, 2004).

Assim, para superar os problemas relativos à baixa sensibilidade dos núcleos raros e seus longos tempos de relaxação spin-rede foi proposto o método de dupla ressonância denominado polarização cruzada (Jelinski & Melchior, 2000). A idéia básica deste método é usar a relativamente intensa polarização dos spins abundantes para aumentar, por transferência de polarização a pequena polarização dos núcleos raros, intensificando o sinal dos núcleos raros e reduzindo os tempos de relaxação spin-rede.

Sabe-se que núcleos de ^1H e ^{13}C submetidos ao mesmo campo magnético precessionam a diferentes frequências (frequências de Larmor) porém, utilizando diferentes campos de rf para cada núcleo, é possível atingir uma situação em que ambos precessionem à mesma frequência nos seus respectivos sistemas girantes. Esta situação é chamada de condição de Hartmann-Hahn, onde o contato térmico entre os núcleos pode promover a transferência de energia entre eles, visto que se comportam como núcleos idênticos (mesma frequência de precessão).

No caso específico da CP de $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$, pode se atingir um aumento de intensidade do sinal do ^{13}C em um fator de quatro, devido ao fato de que a constante giromagnética dos prótons é quatro vezes da do carbono (Cook, 2004).

A questão da intensidade do sinal na caracterização das SH radica na sua natureza complexa e heterogênea. Pois esta é originada por uma entidade determinada (grupo estrutural) na amostra, correspondendo à concentração de dita entidade na estrutura total de modo geral é bastante baixa.

Com isto, a técnica de rotação no ângulo mágico (MAS) é usada em grande medida para diminuir a largura de banda, causada pela anisotropia do deslocamento químico originada pela distribuição não uniforme na densidade dos elétrons ao redor do núcleo. O

MAS também diminui a largura de linha ocasionada pelas interações dipolares. No caso de RMN em solução, estes inconvenientes mencionados são dissipados pelo rápido movimento aleatório das moléculas induzido pelo efeito browniano. A interação dipolar, assim com as outras interações anisotrópicas, que provocam alargamento dos sinais de RMN ^{13}C em sólido, têm dependências geométricas do tipo $(3\cos^2 \theta - 1)$, sendo θ o ângulo entre o vetor internuclear e o campo magnético B_r . Uma vez que a função $(3\cos^2 \theta - 1)$ é anulada para $\theta = 54,74^\circ$, alinhando todos os vetores internucleares segundo esse ângulo pode-se eliminar a interação dipolar, obtendo a condição natural do estado líquido, com velocidades de precessão o suficientemente altas. O valor do ângulo, que permite a ocorrência desta condição é $\theta = 54,74^\circ$, e é chamado portanto de “ângulo mágico”.

Por outro lado devido à natureza macromolecular e heterogênea das SH, o núcleo de ^{13}C pode experimentar uma ampla variedade de ambientes químicos, que são traduzidos nos diferentes deslocamentos encontrados nos seus espectros de RMN ^{13}C . Este fato permite a avaliação semiquantitativa dos mesmos mediante a integração das áreas relativas aos tipos de C em consideração ao espectro total, determinando desse modo a abundância percentual dos mesmos.

A Figura 2.8 mostra os respectivos grupos funcionais atribuídos às áreas de um espectro característico das SH, assim os deslocamentos representados são: alifáticos não substituídos (0-45 ppm), metoxil e N-alifáticos (45-60 ppm), O-alifáticos (60-110 ppm), aromáticos (110-140 ppm), fenólicos (140-160 ppm), carboxílicos (160-185 ppm) e carbonílicos (185-230 ppm) (Stevenson, 1994).

Uma outra aplicação bastante difundida da RMN ^{13}C é a sua combinação com técnicas degradativas para a identificação de blocos estruturais constituintes das SH, assim após utilização de métodos oxidativos, hidrolíticos e pirolíticos, diversos autores (Peuravouri et al.,

1999; Hertkorn et al., 2006) registraram a produção de mais de 100 compostos, onde a maior parte deles corresponde a estruturas de natureza ácida.

Figura 2.8 - Espectro de RMN ^{13}C típico de AH mostrando grupos funcionais associados às bandas correspondentes (Stuart, 1996).

A RMN auxilia na determinação da origem e processos de formação das SH, evidenciado que estas são constituídas por componentes parcialmente degradados de plantas e animais e que apresentam predominância de estruturas alifáticas frente às aromáticas (Wershaw, 1993).

No caso específico da utilização de RMN para a caracterização estrutural das SHA, o projeto europeu ROSIG (“ácidos orgânicos refratários em águas” do alemão “Refraktäre organische Säuren in Gewässern”) é registrado como uma das maiores aplicações da espectroscopia de RMN com suas diferentes variações. Foram usadas RMN ^1H , de ^{13}C e de nitrogênio ^{15}N , além de metodologias bi e tridimensionais (Abbt-Braun, 2004, Lambert & Lankes, 2002).

2.4.2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A porção na região de infravermelho de maior utilidade para a análise de moléculas orgânicas corresponde ao intervalo entre 4000 e 400 nm^{-1} . A energia dos fótons associada com este intervalo (1-15 kcal/mol) não é suficiente para excitar elétrons, mas pode induzir movimentos vibracionais de átomos e grupos ligados covalentemente.

Estas ligações podem apresentar diversos movimentos dependendo da sua natureza e dos átomos envolvidos assim, por exemplo, podem ser identificados movimentos rotacionais em grupos de ligações simples.

Basicamente, as vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos: vibrações de deformação axial (estiramento) e vibrações de deformação angular (bending), conforme mostrado na Figura 2.9. Os estiramentos, são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos no mesmo eixo da ligação, enquanto as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre as ligações apresentando dois modos de ocorrência, no modo de deformação assimétrica fora do plano ou alterações do ângulo entre o plano que contém as ligações e um plano de referência (Silverstein et al., 1994).

Quando as vibrações moleculares resultam em alterações de momento dipolar, causando variações na distribuição eletrônica ao redor das ligações, podem ser induzidas transições entre os níveis vibracionais. Este fenômeno é obtido com a aplicação de campos elétricos com frequências (energias) adequadas. Quando o dipolo oscilante se encontra em fase com a radiação incidente ocorre então a transferência de energia da radiação para a molécula resultando em uma transição.

Assim, a frequência específica na qual determinada vibração ocorre é estabelecida pela força das ligações e a massa dos átomos envolvidos, sendo requerida por exemplo, mais energia para estirar ou comprimir uma ligação que para deformá-la (Silverstein, 1994).

Nos espectros de IV a intensidade das bandas é dada normalmente em termos de transmitância ou absorbância com relação ao número de onda (cm^{-1}), que é o inverso do comprimento de onda.

Na prática, o espectro de infravermelho não mostra sinais de absorção para cada modo vibracional da molécula. O número de bandas de absorção pode ser acrescentado ou diminuído por interações adicionais que levam à combinação de modos vibracionais. Assim, por exemplo, a maioria de ligações simples provoca bandas de absorção em frequências entre $1200\text{-}700\text{ cm}^{-1}$; como as suas energias são semelhantes, interações fortes ocorrem entre ligações vizinhas, sendo as bandas de absorção compostas por essas várias interações e dependentes da estrutura geral do arcabouço da molécula (Skoog, 2002).

Figura 2.9 - Algumas vibrações típicas de átomos. Os sinais $+$ e $-$ significam vibrações perpendiculares ao plano do papel (Stuart, 1996).

A identificação de um composto orgânico a partir de um espectro de IV começa com a determinação de quais grupos funcionais são mais prováveis de estarem presentes examinando a região de frequência de grupos, seguida da comparação detalhada do espectro do composto com tabelas de correlação, pequenas diferenças na estrutura de uma molécula resultam em mudanças na distribuição das bandas de absorção. A interpretação exata de espectros nem sempre é possível por causa da complexidade dos espectros; por outro lado, é

essa complexidade que conduz à individualização e à conseqüente utilidade para propósitos de identificação final (Skoog, 2002).

Em razão da complexa mistura de moléculas orgânicas polieletrólíticas, o espectro característico das SH mostra sobreposição de bandas, indicativo da diversidade de grupos funcionais presentes (Stevenson, 1994). As SH apresentam bandas típicas, que são apresentadas, na Tabela 2.2.

Contudo, a aplicação da espectroscopia de infravermelho tem sido de grande utilidade na caracterização qualitativa de SH fornecendo considerável entendimento sobre a natureza, reatividade e arranjo estrutural dos seus grupos funcionais oxigenados como: grupos carboxila, amina, hidroxila, carbonila e outros (Schnitzer et al., 1972; Bloom & Leenheer, 1989; Stevenson, 1994).

Tabela 2.2 - Bandas no infravermelho do ácido húmic obtidas por Niemeyer et al. (1992), da “International Humic Substances Society, U.S. Geological Survey, Denver, CO”.

Região (cm-1)	Origem
3380	Estiramento OH do grupo fenólico (contribuição de OH alifático, H ₂ O e possivelmente NH)
3030	Estiramento CH aromático
2930	Estiramento CH assimétrico
2840	Estiramento CH simétrico
2600	Estiramento OH de H-ligado a –COOH
1720	Estiramento –C=O de –COOH
1610	Estiramento C=C aromático e/ou estiramento –COO- assimétrico
1525	Estiramento C=C aromático
1450	Deformação –CH de –CH ₃ e dobramento –CH de –CH ₂
1350	Estiramento –COO simétrico e/ou dobramento –CH de alifáticos
1270	Estiramento –C-O de fenólico
1225	Estiramento –C-O e deformação OH de –COOH
1170	Estiramento –C-OH de alifáticos OH

Além da caracterização estrutural qualitativa das SH através da identificação dos seus componentes moleculares como grupos polissacarídeos, alifáticos e peptídicos, a espectroscopia de FTIR tem sido utilizada para estudar processos de oxidação e mineralização revelando a dinâmica das SH frente a diversos fatores ambientais com pH, concentração de

metais, presença de poluentes, radiação, etc. (Vinkler et al., 1976; Stevenson, 1994; Davis et al., 1999).

2.4.2.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A espectroscopia de absorção de luz na região do UV (200 – 400 nm) e visível (400 – 800 nm), constitui-se em uma metodologia útil para a caracterização das mais variadas substâncias (Silverstein et al., 1994). O fenômeno no qual se baseia a técnica é o seguinte:

A região visível do espectro (400-800 nm) compreende energias entre 36-72 Kcal/mol, enquanto na região UV esta energia atinge 143 Kcal/mol. Estes valores são suficientes para promover transições eletrônicas para orbitais de maior energia. A Figura 2.10 representa a posição relativa dos níveis de energia referentes aos orbitais ligantes, anti-ligantes e os prováveis tipos de transições possíveis que podem ocorrer em moléculas orgânicas. De todas estas, as de maior probabilidade são aquelas que requerem menor energia para sua ocorrência ($n \rightarrow \pi^*$) e ($\pi \rightarrow \pi^*$) (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

Figura 2.10 - Transições eletrônicas possíveis durante a excitação de uma molécula e distribuição relativa entre seus orbitais ligantes, não ligantes e anti-ligantes.

A transição $n \rightarrow \pi^*$ pode ser promovida com radiação na região UV em moléculas com ligações insaturadas com O ou S, mas apresenta uma pequena probabilidade de ocorrência de acordo com as regras de seleção. A transição $\pi \rightarrow \pi^*$ tem uma probabilidade aproximada de

100 vezes maior ocorrência que a transição $n \rightarrow \pi^*$ devido ao maior entrelaçamento dos orbitais π , podendo ser observada com radiação na região UV-vácuo. Esta transição se apresenta em compostos aromáticos, e em qualquer molécula com ligações π .

Segundo a “lei de Lambert” a fração de radiação absorvida pela amostra depende da intensidade da radiação incidente em sistemas de baixa intensidade incidente. A “lei de Beer” estabelece que a quantidade de radiação absorvida pela amostra é proporcional à quantidade de moléculas absorvedoras presentes, em baixas concentrações. Quando estas condições são satisfeitas, a relação entre as intensidades de luz incidente e transmitida por uma amostra é dada pela conhecida “Lei de Lambert-Beer”:

$$I(\lambda) / I_0(\lambda) = 10^{-(\alpha_\lambda + \epsilon_\lambda \cdot C)L} \quad (2.3)$$

Onde α_λ é o “coeficiente de atenuação” da radiação incidente, que representa efeitos de espalhamento da amostra; ϵ_λ é o “coeficiente de extinção molar”, que depende da natureza química da amostra analisada; C é a concentração da amostra e L é o caminho óptico seguido pela radiação.

O espectrofotômetro de absorção basicamente compara as intensidades transmitidas em dois canais: um onde se coloca a amostra (I) e outro onde se coloca uma referência (I_0). Utilizando o mesmo solvente e assumindo que ambos canais tenham o mesmo caminho óptico e que não haja espalhamento no interior das amostras, atinge-se a seguinte relação:

$$I(\lambda) / I_0(\lambda) = 10^{-\epsilon_\lambda \cdot C L} \quad (2.4)$$

Sendo que a absorbância A é diretamente proporcional à concentração da amostra e está definida por:

$$A = \log (I(\lambda) / I_0(\lambda)) = \epsilon_\lambda C L \quad (2.3)$$

Através do registro dos comprimentos de onda nos quais acontece a absorção e a intensidade de luz absorvida, os espectros de absorção representam uma medida direta da

quantidade e tipo de moléculas com sistemas eletrônicos π , capazes de absorver na faixa de UV, chamadas de moléculas cromóforas (Garbin, 2004). A Tabela 2.3 mostra alguns cromóforos simples e seus comprimentos de onda correspondentes.

Tabela 2.3 - Estruturas cromóforas em moléculas orgânicas e transições eletrônicas.

Comprimento de Onda (nm)	Cromóforos	Transição
177	-C=C-	$\pi \rightarrow \pi^*$
280	-C=O	$\pi \rightarrow \pi^*$
204	-COOH	$n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$
214	-CNO	$n \rightarrow \pi^*$
339	-N=N-	$n \rightarrow \pi^*$
280	-NO ₂	$n \rightarrow \pi^*$
270	-NO ₃	$n \rightarrow \pi^*$

Para muitas das estruturas eletrônicas, esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do UV. Na prática, a espectroscopia de absorção no UV tem maior aplicabilidade para sistemas conjugados, permitindo que grupos característicos possam ser reconhecidos em moléculas de complexidade bastante variável (Silverstein et al., 1994). A conjugação dos sistemas moleculares (π - π^*) geralmente desloca a absorção para maiores comprimentos de onda (ocorrendo no visível), este fenômeno é chamado em espectroscopia de deslocamento batocrômico.

Na Figura 2.11 pode se observar o efeito mencionado através dos espectros correspondentes para um sistema de polienos, assim para cada dupla ligação adicional, é registrado um deslocamento batocrômico de aproximadamente 30 nm. Do ponto de vista eletrônico, a conjugação de duplas ligações provoca uma menor diferença energética nos orbitais, deslocando desta maneira o espectro característico para maiores comprimentos de onda.

No caso da conjugação de sistemas aromáticos, a adição de anéis na estrutura também ocasiona deslocamentos batocrômicos. Por analogia, um espectro característico do benzeno registra três bandas com diferentes intensidades: a primeira banda localizada em

comprimentos menores ou próximos a 190 nm, é designada como banda de excitação local (EL), a segunda banda localizada entre 190 e 240 nm, é designada como banda benzenoide (Bz), e a terceira banda correspondente a comprimentos de onda maiores a 240-250 nm é designada como banda de transferência eletrônica (TE).

Como pode se observar na Figura 2.12, nos espectros correspondentes ao naftaleno, antraceno e tetraceno, estas bandas exibiram deslocamentos em diferentes proporções para a região do vermelho em conformidade com o aumento de anéis na estrutura (Korshin et al., 1997).

A intensidade e localização destas bandas principalmente a banda TE é afetada pelo grau de substituição do anel aromático, experimentando significativos incrementos na absorção em relação ao grau de substituição (Korshin et al., 1997).

Figura 2.11 - Deslocamento batocrômico por conjugação de políenos.

Figura 2.12 - Deslocamentos batocrômicos em conjugação de sistemas aromáticos: Sistemas de conjugação: naftaleno, antraceno e tetraceno.

Em consideração à grande quantidade de condensações aromáticas e outros sistemas π conjugados presentes nas SH, estas apresentam absorção em comprimentos de onda da região UV-visível, mas devido a sua complexidade estrutural não é possível quantificar nem caracterizar um cromóforo em particular. Os espectros de absorção típicos mostram uma sobreposição de bandas sem a presença de nenhuma banda definida (Stevenson, 1994), sendo que seu formato apresenta um decréscimo gradual com o aumento no comprimento de onda.

As principais estruturas cromóforas identificadas nas SH que outorgam a conhecida cor que varia desde o marrom amarelado até o preto, são apresentadas na Figura 2.13, onde podem ser observados anéis aromáticos com diversos graus de substituição por diferentes tipos de grupos funcionais como carbonilas, ácidos carboxílicos e cadeias alifáticas (Baes & Bloom, 1990; Korshin et al., 1997)

Figura 2.13 - Cromóforos presentes nas SH.

Embora alguns autores tenham considerado o espectro de absorção das SH de pouca utilidade prática, uma importante quantidade de pesquisas (Chen et al., 1977; Kulovaara et al., 1996; Peuravouri & Pihlaja, 1997) têm demonstrado que uma adequada análise pode fornecer informações importantes acerca de sua estrutura química. Na literatura são utilizadas as absorbâncias em diversos comprimentos de onda específicos e/ou as razões entre elas para determinar o grau de humificação e/ou conteúdo de material húmico (McDonald et al., 2004). As absorbâncias são relacionadas com a natureza de elevada conjugação das estruturas alifáticas ou poliaromáticas e com a presença de sistemas moleculares doador–receptor de elétrons nas SH (Baes & Bloom, 1990).

Entre as razões registradas, a chamada razão E_4/E_6 (razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm) é a mais utilizada e controversa na literatura de ciência dos solos, no entanto a sua equivalente em limnología é a razão E_2/E_3 (razão entre as absorbâncias em 250 e 365 nm). Ambas as razões apresentam uma relação inversa com o grau de condensação de estruturas aromáticas e com o grau de humificação das SH (McDonald et al., 2004). Por outro lado, Kulovaara et al. (1996) associa a absorbância em comprimentos de onda próximos a 254 nm com transições tipo π - π^* encontradas em estruturas substituídas de benzeno e na maioria dos polienos conjugados. Enquanto a absorbância de luz visível próxima a 400 nm é relacionada com a intensidade da cor amarela causada por sistemas de cromóforos estendidos em estruturas conjugadas (Uyguner & Bekbolet, 2005).

Adicionalmente os estudos de Stevenson (1994); Korshin et al. (1997); Peuravuori & Pihlaja (1997); Abbt-Braun et al. (2004), entre outros demonstraram a utilidade das mencionadas razões e absorbâncias através de correlações positivas com outros parâmetros espectroscópicos como grau aromaticidade por RMN, concentração de RLS por RPE, etc.

2.4.2.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

No estado fundamental, os elétrons da maioria das moléculas ocupam o mesmo orbital, tendo spins antiparalelos ($\downarrow\uparrow$ emparelhados). Com isso o spin total S será zero ($-1/2 + 1/2 = 0$) e a multiplicidade, dada por $2S+1$, será 1, sendo chamados de estados singlete. Quando os spins estão em orbitais diferentes e são paralelos ($\uparrow\uparrow$ ou $\downarrow\downarrow$), o spin total será $+1$ ou -1 com multiplicidade igual a 3 (estado tripleto).

A partir da Figura 2.14 que mostra a configuração energética de uma molécula orgânica, podem se observar os processos de absorção de energia, entre o estado fundamental S_0 e os estados singletos S_1 , S_2 , S_3 , etc. e os consequentes mecanismos de dissipação da mesma, que envolvem transições radioativas e não-radioativas entre níveis eletrônicos. O fenômeno de absorção de energia possui um tempo de 10^{-15} s, intervalo suficientemente curto para que o núcleo atômico não sinta a transferência de momento, resultando na transição de um estado vibracional estável para outro instável. Como consequência, depois de 10^{-12} s, ocorre a dissipação de energia por vias não radiativas nas quais a energia de excitação é transferida na forma de vibrações, rotações e translações moleculares.

Figura 2.14 - Configuração energética de uma molécula orgânica e suas transições eletrônicas.

Entretanto, existem também transições radioativas que envolvem emissão de energia na forma de radiação, esta emissão é chamada “fluorescência”, que terá sempre uma menor magnitude que a energia de excitação da molécula, e embora possa ser produzida a partir de qualquer dos estados excitados singlete S_1 , S_2 e S_3 , a “fluorescência primária” geralmente ocorre a partir do menor estado excitado singlete S_1 , sem considerar o estado inicial de excitação. O tempo de vida deste estado é da ordem de 10^{-9} s. As transições radiativas a partir de níveis superiores S_2 , S_3 , etc. são pouco prováveis devido à competição do processo de conversão interna entre S_2 e S_3 . Por outro lado, transições eletrônicas entre estados tripleto e estados singlete são proibidas pelas regras de seleção da mecânica quântica (Lumb, 1978).

Os processos não radiativos também desenvolvem um papel importante no processo de fluorescência, entre eles podem se mencionar: conversão interna ou desativação colisional e cruzamento intersistemas. A conversão interna resulta em um mecanismo não radiativo para a relaxação do estado excitado. Em geral, fatores que aumentam a interação das moléculas com seu meio (solvatação, temperatura, flexibilidade molecular) aceleram a taxa de conversão interna por desativação colisional (Senesi, 1990b).

O cruzamento intersistemas decorrente da mudança do estado de spin da molécula (por exemplo: converta $\downarrow\uparrow$ em $\uparrow\uparrow$), envolve uma transferência não radiativa de energia do estado singlete até o estado tripleto e vice-versa ($S_1 \rightarrow T_1$ da Figura 2.14).

Se uma molécula excitada sofre este tipo de transição, ela tende a descartar sua energia, descendo os níveis vibracionais do estado tripleto ($T_3 \rightarrow T_2$), que possuem menor energia que o estado singlete correspondente (regra de Hund). Ao atingir o nível vibracional de menor energia do estado molecular eletronicamente excitado (T_1) a transição para o estado singlete fundamental a princípio não seria permitida, pois viola uma regra de seleção ($\Delta S = 0$, ou seja não pode haver variação no spin total da molécula). Porém, devido à proximidade entre os estados singlete e tripleto pode ocorrer uma conversão entre eles seguida da

relaxação vibracional. Se ao retornar para o estado fundamental, a diferença de energia é emitida na forma de radiação, ocorrerá o fenômeno de “fosforescência”, com menor energia e menor probabilidade que o fenômeno de fluorescência (Garbin, 2004).

Embora a técnica de fluorescência registre uma menor utilização ao longo dos anos, quando comparada com a espectroscopia de absorção UV-visível, para caracterizar a MOD em águas naturais, a sua elevada sensibilidade frente a diversos fatores ambientais pode fornecer maiores informações (Senesi, 1990b). Com isto a fluorescência esta sendo atualmente utilizada para identificar, diferenciar e classificar os diferentes tipos de SH na matriz aquática sem necessidade de métodos de extração (Peuravuori et al., 2002).

Essa técnica espectroscópica pode ser aplicada em três modos diferentes de aquisição espectral, emissão, excitação e com varredura sincronizada (Stewart & Wetzel, 1981; Senesi 1990b; Zsolnay et al., 1999; Kalbitz et al., 1999; Milori et al., 2002).

Os espectros de emissão são obtidos medindo a intensidade de radiação emitida em função do comprimento de onda (λ), mantendo fixo o λ de excitação, enquanto que os espectros de excitação são obtidos pela medida da intensidade de excitação, fixando o λ de emissão. Os espectros com varredura sincronizada são obtidos combinando os modos de excitação e emissão, com a variação dos λ tanto de excitação quanto de emissão fixando uma diferença constante entre eles de $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$, entre eles. Esta diferença pode aumentar a resolução espectral, permitindo a identificação de bandas adicionais.

A fluorescência é também uma técnica bastante seletiva, uma vez que ambos os comprimentos de onda, de excitação e emissão, dependem da estrutura molecular de interesse. Assim, a intensidade de fluorescência tem sido correlacionada com o tamanho molecular e o grau de policondensação de estruturas aromáticas (Chen et al., 2003), sendo observado que esta diminui com o incremento do tamanho molecular dos solutos húmicos.

Um outro alcance na análise estrutural é que nos compostos aromáticos, os substituintes receptores de elétrons como hidroxilas e aminas diminuem a intensidade, e os substituintes doadores como grupos carboxílicos a incrementam. Por outro lado, substituintes do tipo carbonila, hidroxila, álcoois e aminas tendem a deslocar a fluorescência para comprimentos de onda maiores (Senesi, 1990b). Fatores estruturais como linearidade na condensação de anéis aromáticos derivam-se numa baixa intensidade de fluorescência com deslocamentos a comprimentos de onda longos (Coble, 1996).

A espectroscopia de fluorescência tem sido também aplicada para avaliar processos de humificação da MO terrestre e aquática, pois podem ser diretamente correlacionados com parâmetros espectrais da técnica (Senesi et al., 1991; Fuentes et al., 2006). Este fato tem possibilitado o estabelecimento de diferentes índices em vias de quantificar o grau de humificação de diversos materiais orgânicos (Milorí et al., 2002).

Entre estes, os índices de Zsolnay et al. (1999); Kalbitz et al. (1999) e Milorí et al. (2002) mostraram boas correlações com o grau de humificação obtido por outras técnicas espectroscópicas como RPE (Milorí et al., 2002).

O índice de Zsolnay et al. (1999) é calculado a partir de um espectro de emissão com λ de excitação de 240 nm; no intervalo de 350 - 650 nm, o qual é dividido em quatro regiões, a partir das quais é calculada a razão entre o quarto maior (570–641 nm) e o quarto menor (356–432 nm). Esta razão, chamada de A_4/A_1 , tem sido proposta como um índice para medir o grau de humificação, baseado no fato de que as moléculas fluorescentes ao se tornarem mais condensadas, apresentam um espectro de emissão mais deslocado para comprimentos de onda maiores.

O índice proposto por Milorí et al. (2002) utiliza o espectro de emissão registrado no intervalo de 460–650 nm, obtido com excitação na região do azul $\lambda=440$ nm, devido a uma melhor ressonância com estruturas mais condensadas, cuja concentração aumentaria nos

processos de humificação. Com isso Milori et al. (2002) sugere que o valor da área integral do espectro de fluorescência é diretamente proporcional com o grau de humificação.

O índice de Kalbitz et al. (1999) utiliza um espectro de varredura sincronizada entre 300–520 nm, com uma diferença entre os λ de emissão e excitação de 20 nm. Como consequência o perfil do espectro se desloca para comprimentos de onda maiores conforme o aumento no grau humificação, que por sua vez é associado com o um alto grau de substituição dos anéis aromáticos e/ou sistemas insaturados de elevada conjugação (Kalbitz et al., 1999).

Embora os espectros de fluorescência das SH sejam resultado da soma das respostas dos diversos fluoróforos presentes, esta espectroscopia de alta energia tem sido útil para identificar a origem, composição e propriedades funcionais da MO e dos seus componentes. As propriedades espectrais como a posição, deslocamento e largura de bandas são as principais informações para sua interpretação.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a dinâmica e funcionalidade das SHA extraídas da Bacia do Rio Negro, frente a diferentes fatores ambientais como a variabilidade sazonal característica do sistema em estudo, e a influenciada radiação UV-visível na sua composição, estrutura e reatividade. Sendo os objetivos específicos os seguintes:

1. caracterizar as amostras das SHA, agrupadas de acordo com a estação do ano, visando identificar qualquer possível padrão sazonal, através das seguintes técnicas espectroscópicas: RPE, RMN ^{13}C , FTIR, absorção e fluorescência de luz UV-vis;
2. monitorar o processo de fotodegradação das SHA utilizando os seguintes indicadores:
 - ⇒ identificação das mudanças nas propriedades ópticas com espectroscopias de absorção UV-visível e fluorescência;
 - ⇒ quantificação do grau de mineralização por meio da determinação de carbono orgânico total (COT);
 - ⇒ caracterização das mudanças decorrentes nos grupos funcionais com FTIR;
 - ⇒ avaliação da variabilidade na CC das SHA com metais em consideração ao íon Cu^{+2} , como resultado da irradiação.

CAPITULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

As SHA em estudo, extraídas das águas do Rio Negro-AM e representativas das diferentes temporadas sazonais do ano 2003 (inverno, outono, verão e primavera), foram caracterizadas por métodos analíticos como análise elementar e por espectroscopias como RPE, RMN ^{13}C , FTIR, absorção e fluorescência de luz UV-visível. A caracterização foi realizada com o intuito de determinar a influência de fatores climáticos na sua estrutura e dinâmica.

Além disso, soluções aquosas das SHA foram expostas à radiação UV-visível, e analisadas através da concentração de carbono orgânico total (COT), CC de Cu^{+2} e as espectroscopias de FTIR, absorção e fluorescência de luz UV-visível, avaliando assim sua cinética e as mudanças estruturais induzidas. A seguir apresenta-se a descrição detalhada de cada uma das metodologias utilizadas, durante o desenvolvimento experimental.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA ÁREA DE AMOSTRAGEM

O ponto de amostragem encontra-se localizado nas coordenadas de 30° 08' de latitude sul e 60° 01' de longitude oeste, situando-se à margem esquerda do Rio Negro-AM, entre as confluências dos Rios Tarumã Mirim e Tarumã Açu, a uma distância aproximada de 20 km da cidade de Manaus-AM, conforme é ilustrado na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Mapa de identificação da área de amostragem de água do Rio Negro-AM entre as confluências dos rios Tarumã-Mirim (TM) e Tarumã-Açu (T).

O Rio Negro é um dos maiores afluentes da Bacia Amazônica. Após a sua confluência com o Solimões para formar o Amazonas, é responsável por uma contribuição referente às SHA equivalente a 2,5 vezes quando comparado com o Solimões (Ertel et al., 1986).

Por outro lado, o principal mecanismo de ingresso das SHA no Rio Negro está constituído pela drenagem dos rios de águas pretas (igarapés), cor característica originada pela alta concentração de MOD que outorga a natureza ácida às águas (3,5-5,0). A MOD destes rios é de origem predominantemente terrestre, derivada dos solos das florestas circundantes. Uma outra contribuição importante é representada pela percolação e lixiviação de MOD dos solos geradas pelas fontes de águas subterrâneas (Rocha et al., 2000b).

Contudo, essas contribuições variam ao longo do ano, sendo que durante períodos de menor índice pluviométrico, a drenagem diminui paulatinamente. Como consequência disso, os igarapés, transportam somente águas e íons estocados por algum tempo no solo argiloso, aumentando assim sua alcalinidade e seu teor iônico e diminuindo a coloração das águas.

Entretanto, no começo de temporada de chuvas, as águas tornam-se novamente escuras e ácidas, incrementando por sua vez a contribuição de MOD nos seus percursos (Ertel et al., 1986).

O solo da região do Rio Negro caracteriza-se por uma enorme variedade de micro-ecossistemas bem como por uma elevada acidez e pobreza generalizada de nutrientes (oligotrofia), apresentando coloração vermelha ou amarela. Dentro desta variedade os solos predominantes são os espodossolos, areias quartzosas e latossolos vermelho-amarelos e amarelos (Dubroeuq & Volkoff, 1998; Mounier et al., 1999).

Adicionalmente, a vegetação encontrada na região é constituída por formações florestais peculiares aos igarapés, em planícies inundadas e sujeitas às cheias sazonais, com ocorrência de solos arenosos. A principal espécie representante desta vegetação, é a campinarana também conhecida como caatinga do Rio Negro, cujos principais representantes são a caraná (*Mauritia carana*), tamaquaré (*Caraipa grandiflora*), pau-amarelo (*Lissocarpa benthami*) e casca-doce (*Pradosia rigidifolia*) (Ambiente Brasil, 2006).

4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DA ÁREA

A flutuação anual do nível do Rio Negro em Manaus é de aproximadamente 15 m, variação ocasionada pelo fenômeno de cheias fluviais, que fazem parte do ciclo normal das águas nas bacias hidrográficas. As cheias da bacia hidrográfica Negro/Solimões apresentam um longo tempo de percurso, devido ao gigantesco tamanho do sistema e à pequena declividade observada que é de 40 m nos leitos dos seus principais corpos das águas. As figuras 4.2 (a) e (b) mostram essa diferença significativa representada na paisagem.

O nível mais baixo da água ocorre entre novembro e dezembro e o mais alto entre junho e julho. Com o período de enchente do Rio Negro tem-se o alagamento das florestas, várzeas e igarapés. A partir de junho inicia-se a enchente, retirando as águas da floresta e no

período da seca, entre setembro e janeiro, os igarapés permanecem em seus pequenos canais (Rocha et al., 2000b).

(a)

(b)

Figura 4.2 - Vistas ilustrativas do Rio Negro em diferentes temporadas (a) Temporada de cheia (julho) e (b) Temporada de seca (dezembro).

Segundo dados fornecidos pela Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM) do Serviço Geológico do Brasil, o evento de cheia do sistema hidrográfico em estudo, referente ao ano de 2003, atingiu seu pico máximo no dia 01/07/2003 com a cota de 28,27 m, demandando 240 dias no processo de subida. Foi a 36ª cheia em ordem decrescente de grandeza, verificada em todo período das observações que se estende desde setembro/1902 (Relatório Técnico CPRM, 2003; 2004).

A seguir, são apresentados na Tabela 4.1, dados de registros mensais dos níveis fluviométricos e pluviométricos do Rio Negro, coletados pelo CPRM.

Tabela 4.1 - Evolução mensal das características hidrológicas do Rio Negro (2003).

Mês de coleta	Índice pluviométrico (mm)⁽¹⁾	Índice fluviométrico (m)⁽¹⁾
01/2003	112,8	22,12
02/2003	183,5	22,30
03/2003	235,5	23,20
04/2003	318,1	24,97
05/2003	208,9	26,87
06/2003	115,7	28,08
07/2003	77,4	28,00
08/2003	71,1	26,92
09/2003	31,6	24,22
10/2003	117	20,18
11/2003	163,9	19,19
12/2003	143,7	19,17

(1) Valores médios fornecidos pela estação pluviométrica de Manaus do CPRM. Ministério de Minas e Energia. Instituto Nacional de Meteorologia, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

4.1.2 AMOSTRAGEM DE ÁGUA

Foram feitas amostragens de água durante o período de janeiro até dezembro do ano 2003, para verificar a influência da sazonalidade nas características estruturais das SHA, coletando-se 12 amostras (100 litros cada) a 50 cm da superfície.

Tabela 4.2 - Parâmetros físico-químicos das amostras de águas.

Mês de coleta	pH	Temp (°C)	Condutividade (µScm⁻¹)
01/2003	4,7	31	13
02/2003	4,8	31	12
03/2003	4,5	29	13
04/2003	4,5	26	12
05/2003	4,5	25	13
06/2003	4,5	35	10
07/2003	4,5	32	9
08/2003	4,5	34	11
09/2003	5,0	32	10
10/2003	5,0	34	11
11/2003	4,5	33	11
12/2003	4,4	33	11

As coletas mensais foram executadas por um pesquisador colaborador do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA). Após coleta, as amostras de água foram caracterizadas por

meio de parâmetros físico-químicos como pH, temperatura e condutividade. Os valores resultantes são apresentados na Tabela 4.2.

4.2 EXTRAÇÃO DAS SHA

A extração das SHA foi realizada no INPA de Manaus, segundo metodologia sugerida pela IHSS. O procedimento adotado é descrito por Thurman & Malcolm (1981).

4.2.1 METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO

As amostras de água correspondentes a cada mês foram filtradas em membrana de 0,45 μm e acidificadas com solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ até pH de 3.

A seguir, cada amostra foi percolada através de coluna de vidro contendo resina XAD 8 (resina macroporosa não iônica) com fluxo de 3,8 mL min⁻¹.

4.2.2 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DAS SHA

Posteriormente, os extratos das SHA foram purificados mediante diálise através de membranas previamente purificadas e imersas em béqueres contendo água deionizada sob agitação mecânica por 12 horas (Santos, 1999).

Após esse período, determinou-se a presença de íons cloreto (Cl⁻) mediante testes com solução de AgNO₃, com a constante troca de água até teste negativo para Cl⁻.

Os extratos aquosos das amostras das SHA foram congelados e liofilizados, conforme descrito por Sargentini et al. (2001).

4.3 CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS SHA

As amostras de SHA foram classificadas em grupos mostrados na Tabela 4.3; levando em consideração as variações nos níveis fluviométricos mensais da Tabela 4.1. Dessa análise resultaram quatro grupos compostos de SHA correspondentes às quatro estações do ano (inverno, primavera, outono e verão), cujos valores médios dos parâmetros avaliados para cada uma delas se apresentam na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Classificação das amostras compostas das SHA, segundo índices hidrológicos.

Amostra SHA	Meses de Amostragem	Índice pluviométrico¹(m)	Índice pluviométrico¹(mm)
Verão	Dez, jan, fev	21,19	146,67
Outono	Mar, abr, maio	25,01	254,17
Inverno	Jun, jul, ago	27,67	88,07
Primavera	Set, out, nov	21,20	104,17

¹ Valores médios da Tabela 4.1.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SHA.

4.4.1 MÉTODOS QUÍMICOS

4.4.1.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

A determinação do teor de cinzas das amostras foi realizada em duplicata para cada uma das amostras compostas de SHA liofilizadas, submetendo-se a calcinação 20 mg de SHA a uma temperatura de 600°C por 2 horas. Os cadinhos de platina utilizados foram previamente calcinados por 2 horas a 800°C. Assim, o teor de cinzas foi calculado a partir da diferença entre a massa inicial e final, registradas em uma balança eletrônica METTLER AE 200, (precisão de $\pm 0,5$ mg), usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{(Cc) - (Cd)}{\text{massa da amostra}} \times 100\% \quad (4.1)$$

Cc = massa do cadinho + as cinzas.

Cd = massa do cadinho.

4.4.1.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR E RAZÕES ATÔMICAS

A análise química da composição elementar (C, N, H e S) foi feita para as 4 amostras de SHA, utilizando o equipamento CE – Instruments EA 1110, pertencente ao Centro de Análises Químicas (CAQI) do Instituto de Química da de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP).

A concentração de oxigênio foi obtida por diferença:

$$\% \text{ O} = [100 - (C+N+H+S+\text{cinzas})\%] \quad (4.2)$$

As razões atômicas: N/C, H/C e O/C foram calculadas a partir dos percentuais de C, N e H, divididos pela massa atômico do respectivo elemento, segundo as seguintes expressões:

$$N/C = (N\% / \text{massa atômica N}) / (C\% / \text{massa atômica C}) \quad (4.3)$$

$$H/C = (H\% / \text{massa atômica H}) / (C\% / \text{massa atômica C}) \quad (4.4)$$

$$O/C = (O\% / \text{massa atômica O}) / (C\% / \text{massa atômica C}) \quad (4.5)$$

4.4.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

4.4.2.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

A concentração de radicais livres do tipo semiquinona (RLS) foi determinada a partir das medidas de RPE de acordo com a metodologia proposta por Martin-Neto et al. (1991). Os valores dos parâmetros utilizados foram: potência de microondas = 0,2 mW; frequência de modulação = 100 KHz; H_0 = 3400 G; amplitude de modulação=1,0 G pico a pico; número de varreduras 16 e a temperatura ambiente. Parâmetros que foram utilizados na forma de não saturação e distorção do sinal de RPE.

O equipamento utilizado foi um espectrômetro marca Bruker, modelo EMX com cavidade retangular operando em banda X ($\approx 9,0$ GHz), pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária. Para as análises, uma quantidade aproximada de 20 mg das SHA liofilizadas e secas foi inserida em tubos de quartzo com diâmetro interno de 2,5 mm e colocadas no espectrômetro para a detecção dos RLS.

A concentração de RLS (spin $g^{-1}C$) foi obtida após cálculo da área do sinal de RPE utilizando a aproximação $I \times \Delta H^2$, onde I corresponde à intensidade do sinal e ΔH é a largura de linha tomada pico a pico (Pooloe & Farach, 1972). O valor assim obtido, foi comparado com um padrão “Strong Pitch” de concentração de spins conhecida (3×10^{15} spins cm^{-1}) fornecido pela Bruker. Também foi utilizado o rubi sintético (Cr^{3+}) como padrão secundário (Singer, 1959) para correção de possíveis alterações do fator de qualidade da cavidade. Finalmente, a concentração de RLS foi normalizada pela respectiva massa de cada amostra.

4.4.2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C (RMN ^{13}C)

Os experimentos de RMN ^{13}C em estado sólido com polarização cruzada (CP) e amplitude variável (VA), com rotação do ângulo mágico (MAS) foram feitos em um espectrômetro marca Varian modelo Unity Inova 400 que opera em 400 MHz para o ^1H , pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária. As amostras foram acondicionadas em um rotor cilíndrico de zircônia, com 5 mm de diâmetro, marca Doty Supersonic, com tampas de Kel-F da mesma marca, girando a 6,4 kHz em um probe da marca Doty, modelo Supersonic, para amostras sólidas.

Os espectros de RMN ^{13}C VACP/MAS foram obtidos nas seguintes condições experimentais: frequência de ressonância de 100.58 MHz para o carbono, banda espectral de 50 kHz; tempo de contato de 1 ms; tempo de aquisição de 12,8 ms e tempo de espera para relaxação de 500 ms. A rampa no canal de hidrogênio foi de 110-60% (em kHz) para obtenção da condição de Hartmann-Hahn (Novotny, 2002). A varredura foi realizada no intervalo de 0-230 ppm e os valores de deslocamentos químicos expressos em ppm em relação ao hexametilbenzeno (HMB), que possui linha bem definida em 17,2 ppm. O número de acumulações do sinal dependeu de cada amostra de SHA, na procura da melhor relação sinal/ruído.

Os espectros de RMN ^{13}C resultantes permitiram calcular a concentração relativa de diferentes agrupamentos químicos do carbono, a partir da integração das suas áreas segundo metodologia de Stevenson (1994) e Knicker (2000), como segue: alifáticos não substituídos (0-45 ppm); metoxil e N-alifáticos (45-60 ppm); O-alifáticos (60-110 ppm); aromáticos (110-140 ppm), fenólicos (140-160 ppm), carboxílicos (160-185 ppm) e carbonílicos (185-230 ppm).

Finalmente, obtiveram-se os graus de alifaticidade e aromaticidade segundo Preston (1996):

$$\text{Alifaticidade (\%)} = \frac{\text{Área dos sinais de C alifáticos (0-110 ppm)}}{\text{Área (0-160 ppm)}} \times 100\% \quad (4.6)$$

$$\text{Aromaticidade (\%)} = \frac{\text{Área dos sinais de C aromáticos (110-160 ppm)}}{\text{Área (0-160 ppm)}} \times 100\% \quad (4.7)$$

4.4.2.3 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia de FTIR, foi aplicada às SHA segundo metodologia estabelecida por Stevenson (1994), a qual utiliza para as medidas, pastilhas de 1 mg de amostra (SHA) em 100 mg de KBr, previamente seco em estufa. Para confecção das pastilhas as amostras foram prensadas sob vácuo por 2 minutos com uma carga equivalente a 10 toneladas.

O espectro foi obtido por meio de 64 varreduras no intervalo de 4000–400 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} e intervalo de 1 cm^{-1} . Realizou-se também a correção da linha de base nos pontos referenciais a 4000, 2000 e 200 cm^{-1} .

O espectrômetro de FTIR utilizado foi um Perkin-Elmer modelo Spectrum 1000, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos-SP.

4.4.2.4 ABSORÇÃO DE LUZ UV-VISÍVEL

Os espectros de absorção UV-visível foram obtidos a partir de soluções de 2 mg de SHA em 10 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,05 mol L^{-1} , com pH ajustado em 8, segundo procedimento sugerido por Stevenson (1994). A varredura foi realizada na região de 200-800 nm, com resolução de 0,1 nm e velocidade de 300 nm min^{-1} . A informação espectral foi adquirida a partir das leituras de absorbância nos comprimentos de onda a 254, 465 e 665 nm. O espectrômetro utilizado foi um Shimadzu modelo UV-1601PC pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos-SP.

4.4.2.5 FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL

Soluções de SHA em NaHCO_3 (0,05 mol L^{-1}) foram dissolvidas em uma concentração de 20 mg L^{-1} , com pH ajustado em 8. Os espectros de fluorescência a partir dessas soluções foram adquiridos nos modos de emissão e de varredura sincronizada, segundo as

metodologias propostas por Zsolnay et al. (1999); Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999).

Os parâmetros dos métodos anteriormente citados são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Parâmetros utilizados para obtenção dos espectros de fluorescência com as metodologias para determinação do índice de humificação.

Metodologia	Modo de aquisição	Parâmetro de aquisição	Varredura (nm)	Filtro	Índice
Zsolnay et al. (1999)	Emissão	$\lambda_{\text{exc}} = 240 \text{ nm}$	300-700	290 nm	$A_4/A_1 = \text{Área}_{570-640} / \text{Área}_{356-432}$
Milori et al. (2002)	Emissão	$\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$	480-700	Aberto	$A_{465} = \text{Área}_{\text{total}}$
Kalbitz et al. (1999)	Sincronizado	$\Delta\lambda = 55 \text{ nm}$	300-520	Aberto	$I_4/I_3 = \text{Int}_{470} / \text{Int}_{350}$

O espectrômetro de luminescência utilizado para obtenção dos espectros foi da marca Perkin Elmer modelo LS-50B pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos-SP.

4.5 FOTOIRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Uma vez realizada a caracterização das SHA correspondentes às 4 estações do ano foram escolhidas 2 amostras representativas das épocas mais contrastantes: SHA de inverno e verão, com o intuito de avaliar sua dinâmica em relação à radiação nos comprimentos de onda em estudo.

A seguir, fizeram-se testes de fluorescência das SHA a diferentes concentrações (0-100 mg L⁻¹) visando estabelecer o intervalo de trabalho ideal para evitar os efeitos do filtro interno. A metodologia é descrita no Item 4.5.2.3.

Assim, as SHA foram dissolvidas em água Milli Q ultrapura em duas concentrações de trabalho (10 e 30 mg L⁻¹) e submetidas à irradiação objetivando a aquisição de informação estrutural derivada da reatividade de determinados grupos envolvidos no processo e analisada através das técnicas de monitoramento.

A concentração de 10 mg L⁻¹ foi usada inicialmente para estimar a cinética da fotodegradação. Posteriormente, na etapa de avaliação estrutural com os espectros de FTIR,

trabalhou-se com a concentração de 30 mg L^{-1} . Este valor foi determinado como limite máximo, a partir do qual começaria o fenômeno de filtro interno.

Figura 4.3 - Lâmpada de Hg-Xe, UV-Spot Light, modelo Lightningcure 200 Hamamatsu.

Por tanto, utilizou-se uma lâmpada de alta potência de mercúrio-xenônio (Hg-Xe) UV-Spot Light, modelo Lightningcure 200 Hamamatsu, com emissão na região UV-visível, predominantemente entre 290-475 nm, a qual está ilustrada na Figura 4.3.

Figura 4.4 - (a) Esquema da montagem experimental com a lâmpada Hg-Xe Hamamatsu para a fotodegradação das soluções aquosas das SHA. (b) Espectro de emissão da fonte.

A luz é conduzida até as amostras por meio de um cabo óptico com 1 m de extensão e 5 mm de diâmetro, acoplado à saída da fonte como esquematizado na Figura. 4.4 (a). A distribuição espectral da Lâmpada, apresentada na Figura 4.4 (b) foi obtida com um mini-espectrômetro OCEAN OPTICS, modelo S2000 (UV-visível fiber optic spectrometer). Os experimentos foram realizados em sistemas abertos sob pressão atmosférica e agitação constante com barra magnética previamente esterilizada, verificando continuamente a temperatura e pH por meio do medidor de pH da marca Qualxtron, modelo 8010.

As principais especificações da lâmpada de trabalho foram:

- ⇒ Voltagem da lâmpada (DC) ----- ~ 23 V.
- ⇒ Corrente da lâmpada (DC) ----- $8,0 \pm 0,5$ A.
- ⇒ Potencia Máxima de Trabalho---- 650 mW
- ⇒ Intensidade média ----- $5,8 \text{ mWcm}^{-2}$

Esta intensidade, determinada a uma distancia média entre a saída da irradiação e a base do béquer, representa 4 vezes a intensidade da luz solar natural em um dia ensolarado na Amazônia ($1,4 \text{ mW cm}^{-2}$). O valor da intensidade solar foi calculado a partir do programa RADIASOL, versão 2.1 criada em Abril de 2001. Esse programa foi elaborado no Laboratório de Energia Solar do Grupo de Estudos Térmicos e Energéticos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (GESTE-UFRGS, 2005).

4.5.1 MONITORAMENTO DA CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO

Com o objetivo específico de obter informação espectral da cinética de degradação e a variação das propriedades ópticas das SHA, foram preparadas soluções aquosas das amostras de verão e inverno, na concentração de 10 mg L^{-1} . Essas soluções (volume = 250 mL) foram colocadas em béqueres e irradiadas em duplicata por um período de 48 horas com o constante monitoramento de alíquotas de 4 mL ao longo do processo. Essas alíquotas foram conservadas em recipientes opacos, e sob refrigeração (4°C), até o final do experimento e

posterior análise por meio da espectroscopia de absorção UV-visível, para determinação da cinética.

Os espectros de absorção foram obtidos no espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC utilizado para a caracterização espectroscópica, sob os mesmos parâmetros experimentais descritos no Item 4.4.2.4 e utilizando água MilliQ como branco de referência. Com o objetivo de quantificar a concentração das estruturas cromóforas ao longo do processo de fotodegradação, foram monitoradas as absorbâncias em 254 nm, 360 nm e 460 nm. Da literatura sabe-se que alterações nos valores da absorbância em 254 nm estão associadas com a remoção de estruturas aromáticas (Kulovaara et al., 1996; Uyguner & Bekbolet, 2005), enquanto que a absorbância de luz no UV-visível, próxima aos 460 nm, é relacionada por Cuthbert & Giorgio, (1992) com a intensidade da coloração amarelada dos AF, causada por extensos sistemas de cromóforos em estruturas conjugadas e condensadas (Milori et al., 2002; Carvalho, 2003).

4.5.2 AVALIAÇÃO DAS MUDANÇAS ESTRUTURAIS

Nesta etapa, foram preparadas soluções aquosas das SHA de inverno e verão em uma concentração de 30 mgL⁻¹.

A irradiação foi realizada sobre alíquotas de 40 mL, colocadas em béqueres de 50 mL, por períodos de 0, 60, 120, 180, 300, 660, 1500, 2100, 3000 e 5000 minutos. As condições experimentais foram descritas no Item 4.5. Após a irradiação as soluções foram avaliadas segundo sua concentração de COT, CC de Cu⁺² e pelas espectroscopias de FTIR e fluorescência.

4.5.2.1 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)

As medidas de COT em solução foram determinadas através do método de combustão catalítica sob atmosfera de oxigênio em duplicata a partir das alíquotas de monitoramento. O equipamento utilizado foi o Total Organic Carbon Analyzer modelo TOC-V, marca

Shimadzu, pertencente ao laboratório de Química Ambiental do IQSC-USP. As curvas de calibração de 0-20 mg L⁻¹ de COT foram feitas utilizando padrões de biftalato de potássio.

4.5.2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As aquisições dos espectros de FTIR foram realizadas com um espectrômetro da marca Perkim-Elmer, modelo Spectrum 1000, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, usando pastilhas preparadas através do seguinte procedimento: alíquotas de 20 mL das soluções de SHA irradiadas por diferentes períodos foram misturadas com 100 mg de KBr. A seguir, as soluções foram depositadas separadamente em balões volumétricos para ser liofilizadas em um equipamento Savant Speed Vac. As amostras em pó foram acondicionadas no dessecador com sílica gel até a confecção da pastilha por prensagem.

Os espectros foram registrados a partir de 254 varreduras no intervalo de 400 – 4000 cm⁻¹ com resolução espectral de 4 cm⁻¹, e com a correspondente correção de linha de base nos pontos referenciais a 4000, 2000 e 200 cm⁻¹.

4.5.2.3 FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL

A presente técnica auxiliou na determinação da máxima concentração inicial das SHA nas soluções a serem irradiadas (30 mgL⁻¹), a qual permita paralelamente a melhor resolução possível nos espectros de FTIR.

Para determinar a concentração ideal de fluorescência, foram feitas medidas do comportamento da intensidade de fluorescência com excitação em 240 nm em função da concentração das SHA. Em um primeiro momento, observou-se um crescimento quase linear da intensidade em função da concentração, no entanto a partir de 30 mg L⁻¹ a intensidade começou a decair. Este comportamento é originado pelo efeito do “filtro interno”, fenômeno causado pela re absorção da luz emitida pelas SHA de modo tal que a fluorescência medida é menor que aquela efetivamente gerada. Baseados em estas observações a concentração de trabalho foi determinada em 30 mg L⁻¹.

Por outro lado através da identificação dos comprimentos de onda de emissão nos espectros de fluorescência das SHA, podem-se inferir mudanças estruturais antes e após diferentes períodos de irradiação.

As medidas de fotoluminescência foram realizadas utilizando-se o espectrômetro da marca Perkin Elmer modelo LS50B. Após, varreduras bidimensionais no modo de excitação para determinação dos comprimentos de onda de emissão representativos das SHA estudadas, foram estabelecidos os parâmetros experimentais para a aquisição dos espectros de fluorescência apresentados na Tabela 4.5. A velocidade de aquisição foi de 300 nm min^{-1} com uma abertura da fenda de 10 nm.

Tabela 4.5 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência.

Modo	Varredura (nm)	Comprimento de onda (nm)
Emissão 1 (EM 1)	300 – 600	$\lambda_{\text{exc}} = 250$
Emissão 2 (EM 2)	360 – 620	$\lambda_{\text{exc}} = 325$
Excitação (EX)	220 – 410	$\lambda_{\text{em}} = 425$

Posteriormente, visando uma informação mais localizada e pontual das variações espectrais em diferentes regiões, efetuou-se a deconvolução dos espectros EM1 (Tabela 4.5) correspondentes aos diferentes tempos de irradiação. A ferramenta computacional utilizada para a obtenção das gaussianas componentes dos espectros foi o programa PeakFit, versão 4.11. O Peak Fit realiza sucessivas iterações, variando parâmetros como largura e intensidade das gaussianas até atingir a melhor descrição possível do espectro original sem perda significativa de informação.

O resultado final da deconvolução consistiu em um novo conjunto de dados matriciais baseados nas áreas relativas de cada gaussiana em função do tempo.

Este sistema de matrizes foi tratado estatisticamente mediante a técnica de Análise de Componentes Principais (PCA), cujo objetivo principal é reduzir as numerosas variáveis e

procurar combinações das mesmas que expliquem melhor o sistema, na tentativa de uma possível correlação com os grupos estruturais das SHA.

4.5.2.4 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO (CC) PARA ÍONS Cu^{2+}

Utilizou-se o sistema de ultrafiltração com fluxo tangencial (UF-FT) (Sartorius Ultrasart X) equipado com membrana polietersulfônica de 1 kDa (Gelman PallFiltron OMEGA), pertencente ao laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da UNESP de Araraquara. Antes da adição da solução de cobre, deixou-se o sistema bombeando por aproximadamente 10 min para condicionamento da membrana. A seguir, filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), a qual corresponde ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução de Cu^{2+} . Essa alíquota contém uma pequena quantidade de Cu^{2+} correspondente à fração livre não complexada às SHA além da fração ligada naturalmente nas SHA com tamanho molecular menor que 1 kDa. Volumes de 50 μL até 2,0 mL de uma solução de Cu^{2+} $4,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados à solução até concentração total de $0,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu^{2+} . A sequência das adições é apresentada na Tabela 4.6.

O tempo estabelecido para atingir o equilíbrio depois de cada adição com agitação permanente foi de 10 min. Após este período foram coletadas frações da solução (cerca de 2 mL) contendo íons Cu^{2+} isolados pelo procedimento de UF-FT. O Cu^{2+} foi determinado por espectrometria de absorção atômica, utilizando o espectrômetro marca Shimadzu modelo AA-6800, com forno de grafite, modelo GFA-EX7, pertencente ao laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

O eletrodo combinado marca ORION, modelo 90-02, foi utilizado para medir o pH, de forma que este seja mantido no intervalo de 5,0-6,0 via adição de alíquotas de NaOH em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; neutralizando assim o efeito dos prótons liberados via reação de complexação e/ou via adição da solução padrão ácida de Cu^{2+} .

Tabela 4.6 – Sequência de adição das alíquotas de solução padrão de Cu^{+2} para determinação da CC por UF-FT.

Número de Alíquota	Volume (mL)	Concentração de Cu^{+2} acumulada $\text{mol L}^{-1} * 10^{-3}$
T1	0,05	0,00
T2	0,05	0,00
T3	0,05	0,00
T4	0,10	0,01
T5	0,10	0,01
T6	0,10	0,01
T7	0,25	0,01
T8	0,25	0,02
T9	0,25	0,03
T10	0,50	0,04
T11	0,50	0,05
T12	0,50	0,06
T13	1,00	0,08
T14	1,00	0,10
T15	1,00	0,12
T16	2,00	0,16
T17	2,00	0,20
T18	2,00	0,25

CAPITULO 5

RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO INICIAL

As SHA caracterizadas no presente capítulo foram isoladas a partir de amostragens sazonais de água do Rio Negro segundo metodologia especificada no Capítulo 4 de Materiais e Métodos.

Conforme o descrito na secção 4.3, as SHA foram agrupadas em quatro amostras compostas segundo o índice fluviométrico do Rio Negro, resultando em amostras de SHA correspondentes às estações do ano: verão, outono, inverno e primavera. No presente capítulo apresentam-se os resultados da caracterização das SHA em relação a sua composição elementar, conteúdo de RLS por RPE, presença de grupos funcionais através de RMN ^{13}C e FTIR e grau de humificação e complexidade estrutural por espectroscopia de absorção e fluorescência de UV-visível.

5.1 COMPOSIÇÃO ELEMENTAR

A Tabela 5.1 lista a composição elementar (C, N, H e O) e as correspondentes razões elementares das SHA livres de cinza (o oxigênio foi obtido por diferença) coletadas no Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003 (outono, inverno, primavera e verão).

Os valores encontrados para a composição elementar das SHA avaliadas são similares aos reportados para outras SH extraídas na Bacia do Rio Negro (Leenheer, 1980; Ertel et al., 1986; Rocha et al., 2000a), que apresentaram intervalos de distribuição elementar variando entre: 49-42% para C; 5,2-4,1% para H; 48-41% para O e 2,2-0,7% para N.

Estes dados também são usados na identificação de características e mudanças estruturais da MO em estudo, como por exemplo, é conhecido que o conteúdo de hidrogênio está relacionado com o grau de saturação, isto é, um aumento no teor de hidrogênio indica maior número de carbonos alifáticos (Rocha & Rosa 2003). Portanto, segundo os resultados fornecidos na Tabela 5.1 as SHA de primavera e inverno possuem um caráter mais alifático. Estas amostras foram coletadas durante e após a temporada de cheia do rio, quando são registrados os maiores níveis de água.

Tabela 5.1 - Composição elementar (em % livre de cinza), razões N/C, H/C, C/O e teor de cinza das SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

Amostra SHA	N	C	H	O	N/C	H/C	O/C	Cinzas
Verão	1,2	41,1	4,5	48,6	0,02	1,31	0,64	4,7
Outono	1,2	41,9	4,6	48,2	0,03	1,32	0,65	4,1
Inverno	1,5	43,8	4,9	44,6	0,03	1,34	0,74	5,2
Primavera	1,5	41,5	5,0	46,5	0,03	1,44	0,67	5,6

Além disso de acordo com Lu et al. (2000) e Abbt-Braun et al. (2004) as razões atômicas O/C, H/C e C/N fornecem informações valiosas na estimativa do grau de aromaticidade e de humificação das SH.

Um alto teor de hidrogênio indica um maior nível de saturação, conseqüentemente, valores elevados da razão molar H/C, sugere a presença de carbonos de caráter mais alifático para a amostra de primavera. No entanto, uma relativamente baixa razão H/C reflete uma maior presença de compostos aromáticos nas amostras de verão e outono, que foram coletadas após um período de seca no rio.

Coincidentemente, Scott et al. (1998, 2001) observaram o mesmo fenômeno para SH de turfa, as quais exibiram decréscimos graduais da razão H/C com o tempo após períodos de seca.

De maneira similar, a relação O/C, também seria um indicativo da concentração de grupos funcionais contendo O, como grupos metoxílicos, carboxílicos, carbonílicos, álcoois e fenólicos (Visser, 1984). Como se observa na Tabela 5.1, o maior valor da razão O/C corresponde à amostra de inverno com uma porcentagem de 12% acima da média (0,65), indicando que temporadas após elevados níveis fluviométricos (outono e inverno) coincidem com uma elevada presença de O e seus grupos funcionais (Lu et al., 2000 e Kim et al., 2006). Estes resultados, associados com as maiores concentrações de estruturas saturadas observadas pela relação H/C, sugerem uma natureza alifática dos decorrentes grupos funcionais oxigenados.

Por outro lado, a relação N/C fornece informações sobre o estado de humificação e a sua relação com a presença de nitrogênio na estrutura húmica, segundo Almendros et al. (1996) e Lu et al. (2001) as altas relações N/C nas SH são devidas à presença de formas resistentes de compostos de nitrogênio, remanescentes do processo de estabilização da MO e associadas a estruturas heterocíclicas como piridina e pirimidina, identificadas como produtos da pirólise de proteínas.

Conforme a Tabela 5.1 as maiores razões N/C correspondem para as SHA de primavera e inverno que são consideradas mais alifáticas de acordo com as razões H/C e O/C, o que sugere que as estruturas nitrogenadas presentes nestas amostras sejam principalmente de caráter alifático.

Desta forma, através das informações derivadas da comparação dos valores na composição elementar, pode se inferir uma maior presença de estruturas alifáticas para as SHA de inverno e primavera, enquanto o caráter mais humificado corresponderia às de verão e outono.

5.2 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

O sinal do RLS presente nas SH é produzido por grupos do tipo semiquinona, formados pela dehidrogenação oxidativa de compostos fenólicos em equilíbrio com as formas quinona e hidroquinona (Riffaldi & Schnitzer, 1972; Stevenson, 1994; Cheshire & McPhail, 1996).

Em geral, tem sido mostrado que quanto maior a concentração de RLS, maior a humificação das SH (Martin-Neto et al., 1998; Olk et al., 2000; Pajaczkowska et al., 2003). Normalmente, o caráter mais humificado é associado com a formação de compostos mais condensados que favorecem a estabilização destes radicais, possibilitando a sua detecção pela técnica (Leinwebe et al., 1993). Com isso, a determinação da concentração de RLS fornece uma estimativa indireta do grau de estabilidade das SH.

Tabela 5.2 - Valores da concentração de RLS em spins g^{-1} de C x 10^{17} nas SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

Amostra SHA	Concentração de spins $(\text{g C})^{-1} \times 10^{17}$
Verão	$2,34 \pm 0,02$
Outono	$3,20 \pm 0,06$
Inverno	$2,19 \pm 0,06$
Primavera	$2,22 \pm 0,02$

Tabela 5.3 - Concentração de RLS para diferentes amostras de SH encontradas na literatura.

Amostra	Concentração spins $(\text{g C})^{-1} \times 10^{17}$	Referência
AH de Solo	7,2	Martin-Neto et al., 1998
AH de Solo	4,55	Scott et al., 1998
AF de Sedimento	2,3	Scott et al., 1998
AF de Lago	1,0	Scott et al., 1998
SHA de rio	2,07	Carvalho, 2003
AF Suwannee River	2,69	Garbin, 2004

A Tabela 5.2 apresenta resultados da ordem de 10^{17} na quantificação de RLS para as SHA analisadas, fato concordante com Senesi et al. (1990a) que determinaram um intervalo de concentração de RLS para SHA no intervalo de 10^{16} - 10^{18} spins $(\text{g C})^{-1}$. Adicionalmente, a

Tabela 5.3 fornece alguns dados encontrados na literatura observando-se que os resultados experimentais do presente estudo são similares aos reportados para AF aquáticos por Garbin, (2004) e Carvalho, (2003), porém, menores que os valores reportados para AH de solos por Scott et al. (1998); Martin-Neto et al. (1998). Esse fato pode estar relacionado aos AH terrestres apresentarem compostos com maior grau de condensação aromática, o que favorece a concentração de RLS na sua estrutura (Senesi et al., 1990a).

A partir da comparação dos resultados para as SHA da Tabela 5.2, a amostra que apresentou o maior valor corresponde à estação de outono, com uma concentração de spins 30% maior em relação à média encontrada ($2,49 \text{ spins (gC)}^{-1} \times 10^{17}$). Além disso, um desvio padrão de 0,5 entre os valores de RLS sugere que existem alterações substanciais na concentração de estruturas químicas com diferentes graus de condensação na MO decorrentes da sazonalidade da Bacia do Rio Negro.

A análise anterior permite determinar a seguinte sequência crescente em função à concentração de RLS: inverno < primavera < verão < outono.

Essa sequência segue uma tendência similar ao índice fluviométrico na Bacia do Rio Negro, indicando que os maiores teores de RLS, seriam produto de processos de oxidação, favorecidos nas condições de baixa umidade durante as épocas de chuva. De maneira antagônica, após períodos de altos índices fluviométricos (SHA de primavera e inverno), estes radicais estariam sendo diluídos pelo ingresso de MO lábil que ainda não foi estabilizada.

5.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN ^{13}C correspondentes às SHA das quatro estações do ano de 2003, estão mostrados na Figura 5.1. Embora apresentem sinais semelhantes nas mesmas regiões, as diferenças encontradas foram produto da comparação entre as áreas associadas às estruturas alifáticas (0-110 ppm) e aromáticas (110-160 ppm).

A Tabela 5.4 mostra as atribuições fornecidas na literatura para os diferentes tipos de carbono presentes nas SH e os respectivos deslocamentos químicos (Abbt-Braun et al., 2004; Lambert & Lankes, 2002; Schnitzer & Preston, 1986; Preston, 1996).

Tabela 5.4 - Atribuições de deslocamentos químicos em RMN ^{13}C a grupos químicos estruturais.

Deslocamento químico (ppm)	Grupos Estruturais
0-45	Estruturas de cadeias alifáticas, grupos metila e aminas primárias alifáticas.
45-60	Grupos metoxila, C terciários e quaternários com hibridação sp^3 , éteres alifáticos, C α de aminoácidos, aminas secundárias alifáticas.
60-110	Grupos alquil, C-substituídos por oxigênio, C com hibridação sp^3 com simples ou dupla substituição O/N hidroxilas, açúcares, éteres.
110-140	C aromático com hibridação sp^2 , com ou sem substituição.
140-160	C aromático com hibridação sp^2 , com substituição O/N, fenóis.
160-185	Grupos carboxila e amidas.
185-230	Grupos carbonila.

Adaptado de Abbt-Braun et al. (2004); Preston (1996).

Figura 5.1 - Espectros de RMN ^{13}C de amostras sólidas das SHA do Rio Negro em diferentes estações do ano.

A Tabela 5.5 apresenta os valores relativos de cada grupo estrutural de carbono nas amostras sazonais avaliadas, após integração das áreas relativas da Tabela 5.4.

Tabela 5.5 - Valores da concentração relativa (% da área total) das bandas nos espectros de RMN ^{13}C das SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

Amostra SHA	Deslocamento químico (ppm)						
	0-45	45-60	60-110	110-140	140-160	160-185	185-230
Verão	22,4	9,6	29,5	12,9	7,1	11,0	7,5
Outono	23,0	10,31	30,1	13,7	7,3	10,5	5,1
Inverno	28,3	11,50	30,5	10,2	5,8	9,6	4,1
Primavera	22,2	10,1	33,5	11,7	6,6	10,5	5,4

A partir dos valores na Tabela 5.5, pode-se verificar que as diferenças mais acentuadas correspondem às regiões de 0-45 ppm, deslocamento representativo das cadeias de carbono alifático e parafínico, sendo que a amostra de inverno coletada nos meses de Junho e Julho (temporada de cheia), registra o maior valor, atingindo uma diferença de 28% acima da média. Em contraposição, um outro grupo que registra variações significativas corresponde aos carbonos aromáticos de 110-140 ppm e fenólicos de 140- 160 ppm; com isso as SHA de outono apresentaram o maior valor, através de uma diferença de 12% acima da média.

Adicionalmente, a integração das áreas correspondentes aos grupos carbonila, aldeídos e cetonas, permitem atribuir uma maior concentração destes grupos nas SHA de verão, com alto teor de estruturas aromáticas, o que infere que os grupos funcionais de oxigênio estariam ligados principalmente às frações aromáticas.

A informação obtida mediante a presente técnica também pode ser correlacionada com a concentração de RLS obtida por RPE, na tentativa de evidenciar a estabilidade dos diferentes grupos estruturais de carbono.

Como se pode verificar na Figuras 5.2 (a) e (b), os valores das áreas relativas às espécies aromáticas, mostraram uma relação ascendente com a concentração de RLS determinada por RPE.

(a)

(b)

Figura 5.2 - Correlações entre a concentração de RLS por RPE e os valores da integração de áreas dos espectros de RMN ^{13}C (a) Integração da área entre 110-140 ppm (concentração de C aromáticos) e (b) Integração da área entre 140-160 ppm (concentração de C fenólicos).

O formato de crescimento exponencial apresentado nas figuras pode sugerir a mesma tendência para o processo de formação e concentração de estruturas aromáticas, observando-se que as SHA de inverno, primavera e verão, apresentam aumentos significativos dos grupos aromáticos entre as estações de inverno até verão, entretanto o aumento mais importante de RLS aconteceu nas épocas coincidentes com uma estabilização na concentração de C aromáticos e fenólicos (transição de outono-verão). Fato que demonstra que os processos

promotores da concentração de RLS são favorecidos pela presença de estruturas aromáticas condensadas, quantificadas principalmente nas SHA de verão e outono.

Na Tabela 5.6 são apresentadas as porcentagens de alifaticidade e aromaticidade, calculadas a partir dos espectros da Figura 5.1, segundo metodologia proposta por Preston (1996).

Tabela 5.6 - Porcentagem de aromaticidade e alifaticidade das amostras de SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

Amostra	% Aromaticidade	% Alifaticidade
Verão	24,5	75,5
Outono	24,9	75,1
Inverno	18,5	81,5
Primavera	21,8	78,2

Em geral, pode se observar através das porcentagens de aromaticidade e alifaticidade das SHA (Tabela 5.6), uma maior presença de estruturas alifáticas para as épocas de inverno e primavera, coletadas durante e após temporadas de cheia, nas quais ocorre um contínuo e significativo aporte de MO fresca, reconhecida pelo elevado caráter alifático da sua estrutura. Esta MO alifática ao ser dissolvida nos cursos de água apresenta uma alta facilidade para ser degradada e decomposta até atingir processos de humificação. Hipótese que estaria complementada no maior grau de aromaticidade das amostras coletadas após épocas de menor nível do rio (verão e outono), quando seriam favorecidos os processos de humificação e concentração de estruturas aromáticas.

5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Dentre os vários métodos espectroscópicos propostos para a caracterização das SHA, a espectroscopia de FTIR tem sido amplamente utilizada por diversos pesquisadores (Mccarthy et al., 1990; Piccolo & Stevenson, 1982; Stevenson 1994; Baes & Bloom, 1989; Alvarez-Puebla et al., 2006) para a detecção dos principais grupos funcionais presentes nas SH.

Figura 5.3 - Espectros na região do infravermelho para as SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

A Figura 5.3 mostra os espectros na região do infravermelho para as SHA analisadas no presente estudo. Os espectros apresentam bandas largas, comuns nos espectros de SH, atribuídas à extensiva superposição de absorções individuais. Portanto, a análise e interpretação dos espectros baseiam-se fundamentalmente na correlação entre o espectro observado e as bandas de grupos funcionais identificadas na literatura (Piccolo e Stevenson, 1982; Stevenson, 1994; Bloom e Leenheer, 1989; Silvertein, et al., 1994; Canellas et al., 2001; Polak et al., 2005).

A comparação entre as bandas encontradas nos espectros das SHA em estudo, permitiu observar uma tendência similar no que se refere às regiões de absorção. As suas principais atribuições são discutidas a seguir:

As intensidades consideráveis entre 3600 e 3070 cm^{-1} , podem se dever às vibrações dos estiramentos das ligações O-H de fenóis, álcoois e/ou ácidos carboxílicos e/ou estiramentos N-H de aminas, enquanto as bandas ao redor de 2930 cm^{-1} são devidas aos estiramentos C-H nos grupos alifáticos, C-H, C-H₂ e C-H₃ (Kim et al., 2006).

Podem-se observar também bandas intensas nas regiões de 1710 e 1640 cm^{-1} que são devidas a vibrações de estiramento C=O de ácidos carboxílicos e/ou cetonas, e a vibração de C=C de aromáticos conjugados a C=O, C=N e estiramento de grupos carboxilatos (Baes & Bloom, 1989; Canellas et al., 2001).

As bandas de 1450-1410 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento simétrico de íons COO⁻, deformação OH e -CH, -CH₂, -CH₃ e estiramento OH de grupos fenólicos.

A região entre 1200-1100 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico C-O e deformação O-H de grupos COOH. Também são detectadas vibrações de deformação C-H de grupos metil e alifáticos e estiramentos C=O em ligações duplas em compostos cíclicos e alicíclicos, cetonas e quinonas (Antonelli et al., 2001; Kim et al., 2006).

Os picos em torno a 1390 cm^{-1} e as bandas na região de 1035-1100 cm^{-1} podem estar associados ao estiramento assimétrico C-O e/ou a deformação C-O-H dos COOH e estiramento simétrico dos íons COO⁻ e estiramento CO de polissacarídeos, ésteres, éteres e fenóis, respectivamente (Kim et al., 2006).

A maior intensidade no ombro a 1720 cm^{-1} é associada com grupos carboxílicos da SHA de inverno além disso, a maior largura da banda de absorção na região de 1200 cm^{-1} sugere a maior concentração de grupos carboxílicos nesta amostra. Segundo resultados de Kalbitz et al. (1999, 2000a) um decréscimo na razão entre as absorções em aproximadamente 1710 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} pode estar associado com um aumento no conteúdo de estruturas aromáticas quando comparado ao conteúdo de grupos carboxil, podendo ser indicativo do aumento do grau de humificação. Assim, a amostra que apresentou a maior intensidade e a

maior largura na banda de 1640 cm^{-1} , foi a SHA de verão, indicando a maior presença de estruturas do tipo aromático. Em contrapartida, observa-se que as áreas relativas registradas nos picos $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 800\text{ cm}^{-1}$ da mesma amostra são as menores, o que sugere um menor conteúdo de estruturas cetona associadas com estruturas fenólicas.

Grupos funcionais como ésteres e fenóis encontrados na mesma região, têm uma maior presença nas SHA de outono e verão, como se pode deduzir pela maior intensidade nas bandas (Kim et al., 2006).

5.5 ABSORÇÃO DE LUZ UV-VISÍVEL

A figura 5.4 ilustra os espectros de absorção de luz na região UV-visível obtidos para as SHA extraídas sazonalmente do Rio Negro. Observa-se uma diminuição da densidade óptica com o aumento do comprimento de onda, não sendo identificadas bandas de absorção independentes que pudessem ser atribuídas a um determinado tipo de cromóforo ou grupo funcional específico (DelVecchio et al., 2002; Kalbitz, et al., 1999). Da mesma forma não foram observadas variações significativas no formato das curvas.

Portanto, uma forma de caracterizar as SH a partir dos espectros de UV-visível é através de parâmetros como as absorbâncias a comprimentos de onda específicos (e.g. $A_{465\text{ nm}}$ ou $A_{540\text{ nm}}$) e/ou as razões entre elas como E_{465}/E_{665} , E_{260}/E_{400} ou E_{230}/E_{310} , as quais são relativas à inclinação da tangente no espectrograma entre dois comprimentos de onda determinados (Senesi & Schnitzer, 1977).

No presente estudo, e para fins comparativos considerou-se a razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm, normalmente conhecida como E_4/E_6 , a qual baseia-se no fato de que estruturas mais condensadas como anéis aromáticos, apresentam uma maior absorbância a maiores comprimentos de onda (Kononova, 1966). Portanto, esta razão é inversamente proporcional à complexidade molecular e grau de condensação aromática

(Stevenson, 1994). Sendo utilizado como índice de humificação e indicativo de diferenças na complexidade molecular e conteúdo de carbono nas SH (Schnitzer & Khan, 1972).

Figura 5.4 - Espectros de absorção de luz UV-visível obtidos para as SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

Tabela 5.7 - Valores das absorbâncias em 254, 465, 665 nm e razão E₄/E₆ das SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

Amostra SHA	Absorbância $\lambda=254$ nm	Absorbância a $\lambda=465$ nm	Absorbância a $\lambda=665$ nm	Razão E ₄ /E ₆	Aromaticidade (% RMN)
Verão	0,8761	0,0784	0,0103	7,65	24,54
Outono	1,0847	0,0940	0,0088	10,68	24,88
Inverno	0,9336	0,0858	0,0106	8,13	18,54
Primavera	0,9096	0,0892	0,0086	10,43	21,76

Segundo resultados da Tabela 5.7, os valores para a razão E₄/E₆ foram contraditórios com os dados de aromaticidade obtidos por RMN ¹³C, composição elementar e conteúdo de RLS por RPE (Tabelas 5.1 e 5.2). Devido esta metodologia ser alvo de diversas discussões na literatura (Peuravouri & Pihlaja, 1997; Piccolo, 2001) e apresentar resultados controversos, precedeu-se à avaliação e correlação de outros comprimentos de onda com os parâmetros anteriormente mencionados.

A metodologia de espectroscopia diferencial sugerida por Visser (1984); Kulovaara et al. (1996); Abbt-Braun et al. (2004) associa comprimentos de onda específicos com determinadas unidades estruturais (e.g. $\lambda=254$ nm e $\lambda=460$ nm). Eles atribuíram a absorbância em comprimentos de onda próximos a 254 nm às transições tipo $\pi-\pi^*$ em estruturas substituídas de benzeno e na maioria dos polienos conjugados. A absorbância de luz visível a acima de 400 nm é responsável pela cor amarela das SH atribuída à presença de sistemas de cromóforos estendidos em estruturas conjugadas.

Figura 5.5 - Correlação entre valores de absorbâncias de luz UV-visível com a porcentagem de aromaticidade. (a) A_{254} nm, (b) A_{460} nm.

No presente estudo, estas atribuições podem ser corroboradas a partir de correlações entre as absorbâncias mencionadas e as porcentagens de aromaticidade obtidas por RMN ^{13}C , visando avaliar o grau de complexidade das SHA em relação a sua sazonalidade. Os valores destas correlações no presente estudo são apresentados nas Figuras 5.5 (a) e (b).

A partir da comparação entre ambas correlações representadas nas Figuras 5.5 (a) e (b), observa-se melhor correspondência nos maiores comprimentos de onda, sugerindo que a absorbância a 460 nm é favorecida pelo aumento de estruturas aromáticas de natureza mais complexa e conjugada.

5.6 FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL

Os espectros característicos de fluorescência das SHA representam a soma das respostas dos diferentes fluoróforos nelas presentes, assim esta técnica espectroscópica tem sido usada para tentar elucidar não só os componentes das SHA procedentes de diferentes origens, mas também as suas principais propriedades funcionais (Chen et al., 2003).

Características espectrais como o posicionamento e o deslocamento da banda, a intensidade e a largura das bandas parecem ser as informações mais úteis, podendo ser correlacionadas com atributos moleculares como tamanho molecular, grau de policondensação ou conteúdo de grupos funcionais nos anéis aromáticos por grupos carboxílicos e hidroxílicos. Com isso, a fluorescência também é amplamente utilizada para avaliar o grau de humificação e complexidade das SH, neste sentido foram desenvolvidas várias metodologias de avaliação. Os métodos usados foram descritos na secção 4.4.2.5 de Materiais e Métodos, os quais consistem na aquisição de dois espectros de emissão com excitação em 240 nm (Zsolnay et al., 1999) e com excitação em 465 nm (Milori et al., 2002) e um espectro de varredura sincronizada (Kalbitz et al., 1999).

5.6.1 Espectro de Emissão 1

Os espectros de emissão com excitação a 240nm (Zsolnay et al., 1999) são apresentados na Figura 5.6. Como pode-se observar, eles mostram formatos semelhantes devido à sua mesma origem. Em todos eles o pico de emissão máxima foi ao redor de 450 nm, mas as suas intensidades relativas variam numa porcentagem de 12% em relação à média.

Figura 5.6 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 240 \text{ nm}$) das SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano 2003.

Zsolnay et al. (1999) estabeleceram que a irradiação UV ($\lambda=240\text{nm}$) provoca uma excitação geral das moléculas fluorescentes, quantificando a resposta de estruturas simples como anéis aromáticos e estruturas mais complexas, condensadas e/ou substituídas.

Estas moléculas, ao se tornarem mais condensadas e humificadas tenderão a exibir um deslocamento para maiores comprimentos de onda podendo, portanto, ser associados a sistemas insaturados conjugados (hidrocarbonetos aromáticos condensados de estrutura linear, tipo antraceno ou de estrutura cíclica, tipo pireno) e ou/ a núcleos aromáticos altamente substituídos por C=O e COOH. (Senesi, 1990b; Rivero et al., 1998; Olk et al., 1999).

Assim, Zsolnay et al. (1999) propõem a fragmentação do espectro de emissão ($\lambda_{exc}=240\text{nm}$) em 4 regiões, baseando o índice de humificação na razão entre as áreas do último quarto (570-641 nm) dividido pela área do primeiro quarto (356-432 nm), denominado índice A_4/A_1 .

Tabela 5.8 - Valores do índice de humificação proposto por Zsolnay et al. (1999) para as SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano.

Amostra SHA	A_4	A_1	Média $A_4/A_1 \cdot 10^{-2}$ ⁽¹⁾
Verão	883	1107	80 ± 1
Outono	585	653	90 ± 2
Inverno	793	1064	75 ± 1
Primavera	761	1002	76 ± 1

⁽¹⁾ Índice de Zsolnay et al. (1999): razão das áreas do último quarto (570-641 nm) e primeiro quarto (356-432 nm) do espectro de fluorescência ($\lambda_{exc} = 240 \text{ nm}$).

Os índices de humificação obtidos pela metodologia de Zsolnay et al. (1999) para as amostras sazonais do Rio Negro são mostrados na Tabela 5.8. O maior valor corresponde à amostra de outono, portanto a seqüência das amostras segundo o grau de humificação seria o seguinte: outono > verão > primavera > inverno, ordem que apresenta a mesma tendência mostrada no grau de aromaticidade por RMN ^{13}C .

5.6.2 Espectro de Emissão 2

A metodologia proposta por Milori et al. (2002) consiste na excitação na região do azul ($\lambda_{exc} = 465 \text{ nm}$), sendo este comprimento de onda altamente seletivo com estruturas mais complexas e altamente substituídas as quais ocasionam deslocamentos batocrômicos no espectro e cuja concentração é relacionada com o grau de humificação nos AH.

O grau de humificação proposto por Milori et al. (2002) baseia-se na integração da área total dos espectros, sendo uma medida relativa das estruturas aromáticas mais complexas e/ou substituídas das SH, sendo qualificadas como mais humificadas.

Figura 5.7 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$) de SHA do Rio Negro.

Tabela 5.9 - Valores do índice de humificação proposto por Milori et al. (2002) para as SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano.

Amostra SHA	A_{465}	A_{465}	Média $A_{465} \times 10^3(^2)$
Verão	9956	10277	$10,1 \pm 0,2$
Outono	11595	12234	$11,9 \pm 0,5$
Inverno	10779	10971	$10,9 \pm 0,1$
Primavera	11024	11079	$11,05 \pm 0,04$

(2) Índice Milori et al. (2002): área do espectro de emissão de fluorescência com $\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$.

Os espectros observados na Figura 5.7 são simétricos e apresentam uma única banda larga centrada em 520 nm. Contudo, houve uma variação da fluorescência total, proporcional à área dos espectros de 16% entre as amostras que apresentaram maior (outono) e menor fluorescência (verão). Assim, os índices de humificação A_{465} apresentados na Tabela 5.9, permitem ordenar as amostras avaliadas na seguinte ordem: outono > primavera > inverno > verão.

A alta aromaticidade quantificada por RMN ^{13}C e baixo índice de humificação obtido pela excitação em azul nas SHA de verão, pode ser relacionado com a alta seletividade do método de Milori et al. (2002), na detecção de estruturas complexas, observando-se que existe

uma diferenciação dentro da elevada presença de estruturas aromáticas e que a fração fluorófora nas SHA de verão estaria constituída principalmente por estruturas de natureza mais simples e com baixo grau de substituição.

5.6.2 Espectros de Varredura Síncronizada.

A distinção entre amostras com diferentes graus de humificação também pode ser avaliada mediante a obtenção dos espectros de fluorescência no modo bidimensional de varredura sincronizada, onde os comprimentos de onda de excitação e emissão são variados simultaneamente e mantendo uma diferença constante entre eles.

No presente trabalho adotou-se a metodologia proposta por Kalbitz et al. (1999), determinando-se experimentalmente um $\Delta\lambda$ de 55 nm como parâmetro para atingir a melhor resolução espectral. Espectros típicos de SH em geral apresentam duas bandas com a intensidade máxima em torno de 360 nm e 465 nm, além de um ombro em 470 nm. Os pequenos deslocamentos destes máximos, dependem principalmente da origem e concentração de núcleos aromáticos altamente substituídos e/ou sistemas conjugados insaturados capazes de exibir ressonância nos comprimentos de onda de excitação da presente metodologia.

A Figura 5.8 apresenta os espectros de varredura sincronizada das SHA do Rio Negro, apresentando-se uma banda centralizada em 398 nm e dois ombros a 350 nm e 470 nm. A partir dessas informações, Kalbitz et al. (1999) sugeriram a relação entre as intensidades nesses comprimentos de onda para avaliar o grau de humificação. Estas relações estariam dadas pelas intensidades em 398 e 350 nm e/ou 470 e 350 nm.

Kalbitz et al. (1999) associam altos valores do índice com núcleos aromáticos altamente substituídos e/ou sistemas insaturados conjugados. Os índices de humificação calculados são apresentados na Tabela 5.10.

Figura 5.8 - Espectros sincronizados de fluorescência ($\Delta\lambda$ de 55 nm) das SHA do Rio Negro.

Tabela 5.10 - Valores do índice de humificação proposto por Kalbitz et al. (1999) para as SHA do Rio Negro em diferentes épocas do ano.

Amostra SHA	I_{470}	I_{398}	Média $I_{470}/I_{398}^{(3)}$
Verão	111,56	253,99	$0,44 \pm 0,02$
Outono	127,25	219,43	$0,580 \pm 0,005$
Inverno	121,54	245,61	$0,495 \pm 0,008$
Primavera	122,29	241,20	$0,507 \pm 0,002$

(3) Índice de Kalbitz et al. (1999): razão entre as intensidades nos comprimentos de onda a 470 nm e 398 nm do espectro sincronizado.

Observa-se, uma diferença de 14% entre os graus de humificação que permite ordenar as amostras na seguinte sequência: outono > primavera > inverno > verão.

Esta ordem, concorda com os resultados obtidos pelo método de Milori et al. (2002) mostrando que ambas metodologias outorgam uma maior complexidade molecular à amostra de outono, que a um princípio mostrou similar no grau de aromaticidade similar por RMN ^{13}C .

Em resumo, a variabilidade observada nos graus de humificação calculados a partir das três metodologias de fluorescência, pode se dever a sua seletividade na excitação dos distintos

tipos de fluoróforos decorrentes. Assim enquanto a metodologia de Zsolnay et al. (1999) utiliza a excitação na região no UV, quantificando uma grande parte de grupos fluoróforos (simples e complexos), a metodologia de Milori et al. (2002) usa a excitação na região do azul, sendo seletiva com estruturas mais condensadas e complexas e excluindo a porção de fluoróforos mais simples que foi quantificada pelo método de Zsolnay et al. (1999).

Já o método de varredura sincronizada proposto por Kalbitz et al. (1999) é também mais seletivo com estruturas mais complexas, apresentando a mesma tendência que Milori et al. (2002). Um alto grau de humificação calculado através de Kalbitz et al. (1999) é associado com um aumento de núcleos aromáticos altamente substituídos e/ou sistemas insaturados conjugados.

5.7 DISCUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, a avaliação espectroscópica mostrou que as características químicas apresentadas pelas SHA do Rio Negro, diferem na composição e estrutura, quando comparadas com outras SHA extraídas de outros afluentes da Bacia Amazônica, por Ertel et al. (1986); Demanster & Pope, (1996); Quay et al. (1995); Rocha et al. (2004). Por conseguinte, parâmetros como acidez elevada, baixo grau de saturação relativo e baixo conteúdo de nitrogênio, seriam evidências segundo Ertel et al. (1986) de um alto estado de degradação de lignina, aproximando sua composição com aquela das SH terrestres.

Por outro lado, Ertel et al. (1984) e Demanster & Pope (1996), referiram que a formação das SHA do Rio Negro através de vias biodegradativas acontece principalmente nos horizontes aeróbios dos solos, neste caso Espodossolos e Latossolos.

O maior grau de degradação apresentado deve-se tanto ao tempo de residência no solo, quanto à abundância de MO com elevado conteúdo de carbono, que representa um substrato facilmente degradável pelos microorganismos mais ativos nos ambientes com maior oxigenação.

Adicionalmente, variáveis ambientais como altas temperaturas e características típicas do solo Podzólico circundante, como a alta taxa de retenção da umidade e elevada capacidade de oxigenação, têm sido já referenciadas por Tipping & Woof, (1990); Blough et al. (1993); Zanardi et al. (2004) como fatores relevantes na concentração dessas estruturas aromáticas na MO do solo.

Entretanto, uma comparação entre os resultados obtidos para as SHA coletadas em diferentes épocas da Bacia do Rio Negro permite inferir um maior caráter aromático para as amostras de outono e verão, sendo que os parâmetros utilizados que sustentam a afirmação anterior são:

- ⇒ Baixa relação H/C, derivada da análise elementar;
- ⇒ Maior índice de aromaticidade, determinada por RMN ^{13}C ;
- ⇒ Maior concentração de RLS, determinada por RPE;
- ⇒ Maior concentração de estruturas fluorescentes detectadas com excitações pouco seletivas a 240 nm.

Embora ambas as SHA (verão e outono) apresentem altos teores de estruturas aromáticas, estas parecem ter graus de complexidade diferentes. Por meio das metodologias de fluorescência propostas por Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999) detectou-se claramente uma elevada concentração de estruturas aromáticas de maior complexidade na amostra das SHA de outono, devida a sua alta ressonância quando excitadas em comprimentos de onda mais longos. Anéis condensados como pireno, perileno e tetraceno e/ou moléculas aromáticas altamente substituídas, são conhecidas por absorver radiação nos comprimentos de onda utilizados pelas mencionadas metodologias (Lumb, 1978).

Uma elevada concentração relativa de estruturas aromáticas complexas é devida por tanto, à procedência sazonal das amostras de SHA de outono, pois foram coletadas durante março e abril, meses imediatos após época de seca no Rio Negro, e no começo da elevação do

nível fluvial. Este fato sugere que a presença significativa de grupos aromáticos nas SHA de verão e outono, representativas da época de seca, são produto da formação, acumulação e posterior liberação de estruturas de natureza hidrofóbica, que apresentam um maior tempo de residência nos horizontes do solo favorecendo sua maior complexidade molecular.

Em contraposição, as amostras de inverno e primavera coletadas nos meses de junho-julho e setembro-outubro, respectivamente, apresentaram um comportamento antagônico, mostrando uma predominância de moléculas alifáticas em sua estrutura. Observação que concorda com os estudos de Tipping & Woof (1990) que registraram que a liberação das SH do solo para os corpos de água está intimamente ligada à carga molecular e ao conteúdo de grupos funcionais. Assim, a percolação da água do solo favorecida pelos altos índices fluviométricos do rio, contribuiria inicialmente com uma fração mais hidrofílica da MOD do solo, preferencialmente dissolvida e associada a um carácter mais alifático.

No entanto, os compostos mais hidrofóbicos de natureza mais aromática seriam retidos durante mais tempo por fenômenos de adsorção e/ou agregação, fato que retardaria a sua liberação, refletida na menor concentração em épocas de aumento do nível do rio.

Uma outra fonte de natureza alifática estaria constituída pelo aporte de MO fresca do ambiente circundante, em etapas preliminares de degradação, processo promovido pelo aumento no volume de água.

Visando um melhor entendimento das características espectroscópicas das SHA e a significância nos fenômenos geoquímicos anteriormente discutidos, são apresentadas nas Figuras 5.9 (a) e (b) a correlação entre a concentração de RLS e os graus de aromaticidade por absorção UV-visível (Abs_{460}) e RMN ^{13}C .

Figura 5.9 - Correlação entre a concentração de RLS por RPE com (a) absorbância a 460 nm e (b) porcentagem de aromaticidade de RMN ^{13}C .

Observa-se através das Figuras 5.9 (a) e (b), que no decorrer das estações de inverno-primavera-verão acontecem aumentos significativos tanto na absorbância a 460 nm causada pela concentração das estruturas cíclicas conjugadas e/ou substituídas (Figura 5.9(a)), quanto na porcentagem de aromaticidade por RMN ^{13}C (Figura 5.9(b)). Porém, na transição verão-outono é observada uma estabilização na concentração de estruturas aromáticas e um importante aumento na concentração de RLS, decorrente do processo de humificação que envolve reações de conjugação nas estruturas aromáticas existentes.

Tais correlações utilizadas também por Barancikova et al. (1997); Chen et al. (2003) verificaram comportamentos similares quando foram analisados AH de solos e turfas.

Os grupos fenólicos formados durante processos de degradação da MO (Zech et al., 1997), são oxidados em processos de decomposição, produzindo estruturas tipo quinonas. Estas estruturas, precursoras dos RLS, contribuem significativamente na fluorescência das SHA devido a sua natureza aromática (Vodacek, 1992; Leenheer & Croué, 2003). Assim, as Figuras 5.10 (a) e (b) apresentam a correlação dos RLS com o grau de humificação obtido pelas metodologias de fluorescência utilizadas, visando determinar a natureza e grau de complexidade das estruturas promotoras da estabilização da MO, nas amostras em estudo.

A correlação direta observada entre o grau de humificação derivado da metodologia de Zsolnay et al. (1999) com a concentração de RLS (Figura 5.10 (a)), permite afirmar que o processo de estabilização da MOD aconteceria principalmente em estruturas tipo semiquinona simples e/ou baixo grau de condensação, como por exemplo: benzoquinonas e naftoquinonas, que apresentam uma forte ressonância nos comprimentos de onda de excitação utilizados pela metodologia mencionada.

Figura 5.10 - Correlação entre a concentração de RLS por RPE e as metodologias de fluorescência (a)Zsolnay et al. (1999) e (b) Milori et al. (2002).

Evidências apresentadas pela técnica de fluorescência fornecem importante informação estrutural além do grau de humificação, permitindo identificar e estabelecer diferenças entre as populações de fluoróforos excitados a distintos comprimentos de onda. Aplicações deste tipo já foram reportadas em Limnologia por Coble, (1996); Mayer et al. (1999); McKnight et al. (2001, 2003); Baker & Spencer, (2004) Minor et al. (2006). Assim a interdependência encontrada entre o comprimento de onda de excitação e o grau de complexidade das amostras de SHA em estudo, sugere no caso, a presença de dois grupos de fluoróforos:

1. Fluoróforos excitados com luz na região UV: cuja resposta se deveria preferencialmente a anéis aromáticos de estrutura simples tipo benzeno, tolueno ou fenol e;

2. Fluoróforos excitados com luz na região azul; que poderiam estar constituídos de estruturas aromáticas mais complexas, como antraceno tetraceno e pireno, anéis com um relativo maior grau de condensação que poderiam adicionalmente apresentar substituição por grupos carbonila, hidroxila e amina.

A diferenciação anterior concorda com pesquisas de Coble, (1996); Sierra et al. (2005); Boehme & Wells (2006) que relacionaram comprimentos de onda de emissão específicos com grupos de fluoróforos de diferentes origens (derivados da decomposição de proteínas e derivados de AF), através de matrizes de excitação/emissão, estabelecendo assim a procedência e natureza da MOD em diferentes ambientes aquáticos.

Com base nas evidências e afirmações anteriores, pode-se inferir que a variabilidade estrutural apresentada pelas amostras das SHA correspondentes ao ano 2003, sugere um modelo de transformação cíclica, o qual começaria com o ingresso de MO lábil (de natureza mais alifática), em épocas de elevados níveis do rio, e o subsequente processo de estabilização (transição verão-outono), mediado pela atividade biodegradativa e favorecido pelas elevadas temperaturas. Estes fatores contribuiriam com a presença de estruturas aromáticas de maior complexidade procedentes da MOD de origem terrestre.

Além deste processo de produção autóctona, um outro fator determinante na maior complexidade molecular das SHA de verão e outono estaria constituído pela liberação tardia das estruturas hidrofóbicas (aromáticas) dos solos circundantes, as que levariam maiores tempos para serem dissolvidos nos cursos de águas subterrâneas.

CAPITULO 6

RESULTADOS DA FOTODEGRADAÇÃO

Após a caracterização inicial das SHA por métodos analíticos e espectroscópicos do Capítulo 5, iniciaram-se os estudos para avaliar a sua fotodegradação. Com esse fim, selecionaram-se as SHA de inverno e verão, pois pertencem a épocas contrastantes do Rio Negro: época de seca no verão e época de cheia no inverno. Essas amostras foram dissolvidas em água Milli Q em duas concentrações distintas, avaliando-se assim dois parâmetros no processo de fotodegradação: a cinética e as mudanças estruturais sequenciais durante a fotomineralização. A Tabela 6.1 mostra o resumo das condições experimentais do processo:

Tabela 6.1 - Condições experimentais dos experimentos de fotodegradação.

Parâmetro avaliado	Concentração inicial mg L ⁻¹	Volume mL	Técnicas utilizadas	Tempo de irradiação (min)
Cinética de fotodegradação	10	250	Absorção UV-visível	2400
Mudanças estruturais	30	50	Fluorescência, FTIR, CC Cu ²⁺ e COT	5000

Todos os experimentos foram feitos nas mesmas condições de irradiação, com o controle contínuo do volume, temperatura e pH.

6.1 CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO

Segundo Tabela 6.1, os experimentos de avaliação da cinética da fotodegradação, tiveram uma duração de 48 horas de irradiação com uma lâmpada de Hg-Xe, na região UV-visível.

A figura 6.1 apresenta os espectros correspondentes aos tempos iniciais e finais do processo para as SHA (inverno e verão), observando-se em geral uma perda significativa da cor (desde marrom até atingir transparência) e uma drástica perda geral de absorbância ao longo do intervalo de 200-800 nm que foi centralizada ao redor dos 250-360 nm.

A quantificação dessa perda foi feita a partir da integração e diferença dos espectros inicial e final, como mostrado na Tabela 6.2:

Figura 6.1 - Variação do formato e perda global da absorbância dos espectros de absorção UV-visível produto da irradiação de 48 horas. (a) Solução SHA inverno, (b) Solução SHA verão.

Tabela 6.2 - Porcentagem da perda global de absorbância durante a fotodegradação, mediante integração dos espectros da Figura 6.1.

Amostra SHA	Área Inicial	Área Final	% de Perda Absorbância
Inverno	31,69	6,64	79,05
Verão	30,75	4,19	86,38

Através da Tabela 6.2 pode se inferir que a perda mais significativa de absorbância, corresponde à amostra de verão. De acordo com a caracterização estrutural feita com RMN ^{13}C (seção 5.3), estas SHA contêm um maior grau de aromaticidade que estaria associado com estruturas cromóforas (frações oleofínicas e aromáticas), mais susceptíveis nos comprimentos de onda da radiação aplicada (280-420 nm).

Apesar das diferenças na eficiência de degradação, ambas as amostras apresentaram a mesma tendência durante o processo, exibindo um rápido decréscimo nos espectros de absorção em função do tempo, comportamento que pode ser descrito segundo uma cinética de decaimento exponencial de primeira ordem, mostrado na Figura 6.2(a), (b) e (c).

Figura 6.2 - Curvas de decaimento exponencial da absorbância na fotodegradação das SHA de inverno e verão a diferentes comprimentos de onda. (a) 254 nm, (b) 360 nm, (c) 460 nm.

Visando avaliar a cinética do processo, foram escolhidos três comprimentos de onda:

$\lambda = 254$: comprimento de onda característico das estruturas aromáticas-cromóforas da MO (sinal associado com transições $\pi\text{-}\pi^*$ em benzenos substituídos e/ou em polifenóis (Korshin et al., 1997; Kalbitz et al., 1999));

$\lambda = 360$: comprimento de onda de maior intensidade no espectro da lâmpada;

$\lambda = 460$: comprimento de onda relacionado com estruturas mais complexas como aromáticos condensados e substituídos que foram avaliados no Capítulo 5 (Cuthbert & Giorgio, 1992).

O monitoramento e quantificação da absorbância durante o tempo nestes comprimentos de onda deram origem às curvas de degradação da Figura 6.2, podendo ser descritas matematicamente através da equação exponencial 6.1.

$$A_t = A_1 + B e^{-t/\tau} \quad (6.1)$$

Onde:

A₁: representa a absorbância limite residual atingida após um longo período de irradiação superior a 2880 minutos ($t \rightarrow \infty$), **B**: representa a diferença entre a absorbância inicial A_0 e a absorbância limite A_1 e **τ** : é o tempo característico da curva de degradação (tempo de vida médio).

Para um melhor entendimento e comparação dos parâmetros cinéticos, realizou-se a linearização da equação 6.1 por meio da equação da reta 6.2.

$$\ln [(A_0 - A_t) / (A_t - A_1)] = K \cdot t \quad (6.2)$$

onde a inclinação da reta K é diretamente proporcional à velocidade da fotodegradação.

Na Figura 6.3 mostram-se os gráficos da linearização a partir da equação 6.2, para as duas amostras avaliadas correspondentes aos comprimentos de onda 254, 360 e 460 nm, adicionalmente a Tabela 6.3 apresenta os valores obtidos para a tangente K (velocidade da fotodegradação) e R^2 (coeficiente de correlação linear).

Figura 6.3 - Representação linear da cinética de degradação de primeira ordem da fotodegradação das SHA de inverno e verão após 48 horas de irradiação a diferentes comprimentos de onda. (a) 254 nm, (b) 360 nm, (b) 460 nm.

Tabela 6.3 - Valores dos parâmetros cinéticos e de ajuste produto da linearização.

Amostra SHA	Comprimento de onda (nm)	K (1 x 10 ⁻⁴) min ⁻¹	R ²
Inverno	254	11,0 ± 0,3	0,98
	360	13,0 ± 0,3	0,99
	460	13,0 ± 0,6	0,94
Verão	254	10,0 ± 0,4	0,96
	360	10,0 ± 0,1	0,98
	460	11,0 ± 0,4	0,96

A partir da comparação dos valores das velocidades da degradação (K), pode-se observar uma cinética mais rápida para as SHA de inverno, inferindo que a quantidade maior de grupos alifáticos (quantificados por RMN ¹³C) promove uma velocidade maior do processo. Esses grupos alifáticos seriam mais lábeis no início da degradação em relação às

estruturas aromáticas e fenólicas. As SHA de verão, com maior quantidade de estruturas aromáticas levariam um tempo maior para serem degradadas.

O comportamento observado de uma velocidade maior, porém com menor eficiência de degradação para as SHA de inverno, poderia se explicar em relação com as energias de dissociação eletrônica que estariam sendo diretamente atingidas pelos comprimentos de onda da radiação aplicada (280-420nm), proporcionando um mecanismo de decomposição mais efetivo, embora mais lento, para as SHA de verão, dada a maior concentração em estruturas aromáticas. Segundo Gaydon (1953), as principais ligações químicas que correspondem a estas energias são: C-H ($\lambda=290$ nm), C-C ($\lambda=345$ nm), C-N ($\lambda=392$ nm) e C-O ($\lambda=334$ nm), os resultados sugerem que no caso das SHA de inverno, o processo seria mais rápido e atingiria um limite máximo de fotodegradação inferindo a formação de estruturas resistentes nos comprimento de onda de trabalho.

Além disso a degradação mais efetiva, porém com menor velocidade mostrada pelas SHA de verão, poderia envolver fenômenos de fotosensibilização e geração de reações secundárias promovidos pela formação de radicais livres os quais apresentariam uma alta seletividade com as estruturas aromáticas mais condensadas das SHA de verão.

6.1.1 AVALIAÇÃO DIFERENCIAL DA PERDA DE ABSORBÂNCIA

Visando avaliar os comprimentos de maior efetividade na fotodegradação, foram calculadas e plotadas as curvas de dependência da perda de absorbância no tempo (Figura 6.4) mediante a subtração do espectro inicial, dos espectros obtidos ao longo do tempo de irradiação como sugerido por Del Vecchio & Blough (2004).

Em uma primeira abordagem, na Figura 6.4 (a) e (b) observa-se que a perda geral de absorção não foi uniforme ao longo do espectro, pois apresenta pelo menos duas bandas de maior intensidade no fotobranqueamento, o que confirma a hipótese da diferença de susceptibilidade nas diversas frações cromóforos presentes. Inicialmente as principais bandas

de perda de absorbância localizadas ao redor dos 270 e 215 nm, mostram a mesma intensidade, mas após aproximadamente 300 min, começa uma intensificação da banda de perda de absorbância correspondente ao menor comprimento de onda.

Figura 6.4 - Espectros diferenciais obtidos a partir da subtração de espectros após irradiação do espectro da solução de SHA inicial. a) irradiação de SHA inverno e b) irradiação de SHA verão.

Devido ao deslocamento dessas bandas não coincidirem com as linhas de maior intensidade no espectro de irradiação, pode-se sugerir uma fotodegradação indireta favorecida pela produção de compostos intermediários reativos (fototransientes) que promovem a destruição de estruturas cromóforas através de processos secundários.

Del Vecchio & Blough (2004), atribuíram este fenômeno à presença de grupos doador-receptor (**D-A**) de elétrons, que promovem interações do tipo intramolecular de transferência de carga e a subsequente perda de absorbância e intensificação das bandas observadas. Os principais grupos reconhecidos como **D** seriam os aromáticos polihidroxilados derivados da degradação da lignina, fenóis e indóis, e os grupos reconhecidos como **A** seriam quinonas e outros aromáticos oxidados, estruturas referenciadas como partes componentes das SH (Kujawinski et al., 2004 e Del Vecchio & Blough, 2004).

6.2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DECORRENTES DA FOTODEGRADAÇÃO

Os seguintes resultados são produto da aplicação da metodologia descrita no Capítulo 4, onde foi determinada uma concentração inicial das SHA de 30 mg L⁻¹ nas suas soluções aquosas. Os tempos de irradiação UV-visível foram: 0, 60, 120, 180, 300, 660, 1500, 2100, 3000 e 5000 minutos, após os quais monitoraram-se as mudanças decorrentes através COT, CC de Cu⁺² e pelas espectroscopias de FTIR e fluorescência.

6.2.1 CONCENTRAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)

Os valores da diminuição da concentração do COT nas soluções de SHA irradiadas em função do tempo são mostrados na Tabela 6.4. Pode-se assumir que a perda constante de COT é devido à mineralização com a formação final de gases de carbono (CO₂, CO) e H₂O. Segundo os valores dos resultados, é observado em geral, que um 70% do carbono orgânico presente nas SHA é mineralizado depois de 5000 minutos (~80 horas).

Tabela 6.4 - Dados referentes à diminuição de COT durante a fotodegradação.

Tempo (minutos)	Concentração de COT (mg L ⁻¹)	
	Inverno	Verão
0	11,2 ± 0,2	10,9 ± 0,5
60	11,0 ± 0,1	10,2 ± 0,2
120	10,1 ± 0,1	9,1 ± 0,1
180	9,5 ± 0,1	8,6 ± 0,1
300	8,8 ± 0,1	7,9 ± 0,1
660	7,6 ± 0,1	5,4 ± 0,1
1500	4,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1
2100	3,3 ± 0,1	2,9 ± 0,1
3000	3,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1
5000	3,6 ± 0,1	2,3 ± 0,1

Esta transformação de carbono orgânico em inorgânico, já tem sido reportada por vários autores em diversos ambientes aquáticos (Miller & Zepp, 1995; Frimmel, 1998a). Estudos complementares destacaram também a importância da acidez e do elevado teor de MOD, como fatores relevantes na maior efetividade e velocidade de perda de COD em águas

naturais (Amon & Benner, 1996; Schmitt-Kopplin et al., 1998), reportando também que maiores concentrações de oxigênio favoreceriam taxas de cinéticas mais elevadas através de promoção de reações secundárias.

A representação gráfica da concentração de COT em função do tempo de irradiação segue o comportamento de uma curva de decaimento exponencial como se observa na Figura 6.5. Pode-se verificar que a maior parte da mineralização acontece no início do processo (perda de COT > 50%) para ambas amostras, devido a uma quebra inicial de estruturas complexas e a produção de ácidos orgânicos de baixa massa molar, reconhecidos por diversos autores através de técnicas de cromatografia e eletroforese (Bertilsson et al., 2004; Hertkorn et al., 2002; Kulovaara et al., 1996).

Figura 6.5 - Representação gráfica da perda de COT resultado da fotodegradação das SHA de inverno e verão (a) Cinética de primeira ordem (b) Representação linear.

Tabela 6.5 - Dados referentes à diminuição de COT durante a fotodegradação.

Amostra SHA	Diminuição de COT (%)	K (min ⁻¹)	R ²
Verão	78,87	11,0 ± 0,8	0,96
Inverno	68,28	13,0 ± 1,0	0,96

A linearização da curva de decaimento (Figura 6.5 (b)), permitiu a obtenção da velocidade de mineralização (K) para fins comparativos, corrobora-se a partir dos valores de K da Tabela 6.5, a cinética de decaimento exponencial de primeira ordem apresentado na

avaliação da cinética da fotodegradação na secção 6.1, conferindo uma degradação 16% mais rápida para a amostra mais alifática (inverno), mas com uma efetividade 14% maior para a amostra mais aromática (verão).

Da mesma maneira que o COT, o pH monitorado diminui principalmente nos primeiros minutos de irradiação com um intervalo de variação entre 5.9 - 4.7 para a SHA de inverno, e entre 6 - 4.5 para a SHA de verão. Esta redução é atribuída principalmente à formação de ácidos orgânicos de baixa massa molecular como se tem reportado previamente por Brinkmann et al. (2003); Xie et al. (2004).

6.2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A presente técnica foi utilizada com o objetivo de um melhor entendimento das mudanças estruturais acontecidas durante a fotodegradação, pois a maioria das técnicas utilizadas na literatura, como as espectroscopias de absorção e fluorescência de UV-visível estão baseadas na detecção de grupos fotosensitivos podendo subestimar a concentração de outras estruturas fotoquimicamente modificadas.

As Figuras 6.7 e 6.8 apresentam os espectros de FTIR das SHA após diferentes tempos de irradiação, os quais mostram similaridade quanto à posição das principais bandas de absorção. As atribuições das bandas foram feitas segundo Silvertin (1994); Da Silva et al. (1997) e Dalvi, et al. (2000).

A pesar dessa similaridade e sobreposição de bandas nos espectros de SHA, pode se observar que as principais mudanças estruturais são registradas nas regiões de $3400\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ e de $1730\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$. Com isso a variabilidade na largura das bandas na região de $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ é atribuída aos estiramentos OH. Essa modificação na largura poderia ser explicada através do comportamento do hidrogênio no grupo hidroxila, no início da fotodegradação este grupo seria polarizado, deixando o hidrogênio com carga parcialmente positiva e com a

capacidade de interagir eletrostaticamente com outros íons e/ou grupos moleculares de carga oposta, assim estas interações intramoleculares seriam traduzidas diretamente nas diferenças de largura na banda a 3150 cm^{-1} (Silverstein, 1994; Dalvi, et al., 2000).

Figura 6.6 - Comparação entre os espectros de FTIR das SHA (inverno) sem irradiar e submetidas a diferentes tempos de irradiação.

Figura 6.7 - Comparação entre os espectros de FTIR das SHA (verão) sem irradiar e submetidas a diferentes tempos de irradiação.

A diminuição de intensidade na banda de 3400 cm^{-1} , infere uma perda de ligações intermoleculares do tipo ponte de hidrogênio, dipolo-dipolo e íon dipolo, fenômeno que originaria a abertura da molécula e o conseqüente favorecimento do sinal das ligações intramoleculares (Dalvi et al., 2000).

O ombro evidenciado ao redor de 2950 cm^{-1} , devido aos estiramentos assimétricos ou simétricos de ligações alifáticas, apresentou variações sistemáticas em intensidade em função do tempo até sua diminuição significativa a 5000 minutos de irradiação, registrando a maior susceptibilidade das estruturas alifáticas no começo do processo. Essa hipótese é confirmada com a banda de absorção de $1740\text{--}1720$ que é atribuída a ao estiramento do grupo C=O de

estruturas carbonila, a qual sofre uma diminuição de intensidade mais evidente no espectro correspondente aos 2100 minutos, quando haveria uma significativa conversão de ácidos orgânicos de baixa massa molar a CO_2 , após ionização e formação de radicais carboxilato, coincidentes com uma estabilização do pH, reportada por Dalvi et al. (2000).

Outra banda com grandes variações durante o desenvolvimento do processo foi registrada no intervalo entre 1700 e 1500 cm^{-1} . A largura da banda é devido à sobreposição de bandas correspondentes aos múltiplos modos vibracionais das SHA (Da Silva et al., 1997). Nessa região podem se encontrar: estiramentos do $\text{C}=\text{C}$ em aromáticos, $\text{C}-\text{C}$, ligações duplas conjugadas $\text{C}=\text{O}$ ou COO , ocorrentes em estruturas de aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos (Bloom & Leenheer, 1989; Silvertin et al., 1994; Dalvi et al., 2000).

Apesar da presença de vários grupos funcionais contendo $\text{C}=\text{O}$ que registram estiramentos na mesma região, o momento dipolar do grupo $\text{C}=\text{O}$ do carboxílico (ou carboxilato) é mais intenso que o momento dipolar do $\text{C}=\text{O}$ das quinonas, cetonas, ésteres ou éteres, contudo, as intensidades relativas das bandas ao redor de 1650 cm^{-1} , são também dependentes das variações do pH decorrentes da fotodegradação (Da Silva et al., 1997).

Em um primeiro momento, esta banda larga não permite a identificação de nenhum pico, mas conforme o avanço do processo é observado um desdobramento da mesma, nas bandas correspondentes a 1670 cm^{-1} e 1632 cm^{-1} , sugerindo o favorecimento da formação de estruturas de menor complexidade molecular, o que aumentaria a resolução do espectro.

As intensidades na região de 1280-1200 cm^{-1} e de 1100-1000 cm^{-1} , que correspondem aos estiramentos simétrico e assimétrico de ligações éter e éster, parecem aumentar com o tempo da irradiação. Contudo já foram reportadas na literatura (Da Silva et al., 1997; Fukushima & Tatsumi, 2001; Lu et al., 2001), reações de condensação e acoplamento entre radicais fenólicos e benzênicos mediante terminações carboxílicas, decorrentes da irradiação derivando na formação de éteres e ésteres benzênicos e fenólicos.

Por outro lado, as variações nas bandas a 1270 cm^{-1} são também associadas aos grupos fenólicos. A melhor resolução observada nos espectros dos tempos finais pode inferir a formação de estruturas fenólicas simples, enquanto a sua intensificação após os primeiros momentos de irradiação, indica uma concentração dessas estruturas resultado da decomposição inicial dos grupos alifáticos.

6.2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As observações derivadas da fluorescência, são interessantes tanto do ponto de vista espectroscópico, quanto pela informação inferida das reações da MO nos estados excitados e sua interação com outros componentes de ambientes aquáticos (Spark & Swift, 1994; Frimmel, 1998b).

A Figura 6.8 (a) e (b) ilustra os espectros de excitação com emissão em 425 nm, obtidos para as SHA de inverno e verão respectivamente. Estes espectros mostraram bandas nas regiões de 225 e 350-375 nm comuns nas SH, sendo geralmente reportada a sua ocorrência nos seguintes comprimentos de onda 220-260, 345-360 e/ou 390 nm (Senesi, 1990b).

As variações observadas no decorrer do tempo tem sido relacionadas por alguns autores (Lepane et al., 2003; Kujawinski et al., 2004) com mudanças na distribuição de massa molecular e nas proporções relativas de alguns grupos funcionais. Assim, a aplicação de fluorescência tridimensional, permitiu identificar por alguns autores (Coble, 1966; Leenheer & Croue, 2003; Baker & Spencer, 2004) dois tipos de fluoróforos nas SH em geral, bandas apresentadas em 290 - 390 nm são atribuídas ao material de origem húmico e as bandas em 250 - 280 nm e 300 - 370 nm são relacionadas com a presença de frações de aminoácidos derivados da decomposição das proteínas de plantas, animais e bactérias.

Os comprimentos de onda de excitação para a aquisição dos espectros de emissão foram estabelecidos após identificação dos máximos de intensidade das bandas no espectro excitação com emissão em 425 nm.

Figura 6.8- Espectros de excitação de fluorescência, com emissão a 425 nm, correspondentes a diferentes tempos de irradiação. a) SHA inverno e b) a) SHA verão.

As Figuras 6.9 e 6.10 apresentam os espectros de fluorescência no modo emissão com excitação em 250 e 325 nm e a variação de suas intensidades em função do tempo de

irradiação (0, 60, 120, 180, 300, 660, 1500, 2100, 3000 e 5000 minutos), para amostras das SHA de inverno e verão respectivamente, com uma concentração inicial de SHA de 30 mgL^{-1} .

Figura 6.9- Comparação dos espectros de emissão de fluorescência, com excitação a 250 nm, correspondentes a diferentes tempos de irradiação. a) SHA inverno e b) SHA verão.

De forma geral, são registradas bandas de máxima intensidade na região do azul (≈ 430 nm), como resultado da elevada conjugação e complexidade estrutural (Boehme & Coble, 2000). Além disso, outros fatores como a existência de anéis aromáticos linearmente

condensados ou a presença de substituintes do tipo carbonila, hidroxil, álcoois e aminas, deslocam a fluorescência para comprimentos de onda mais longos (Peuravuori et al., 2002)

Figura 6.10 - Comparação dos espectros de emissão de fluorescência, com excitação a 325 nm, correspondentes a diferentes tempos de irradiação. a) SHA inverno e b) SHA verão.

Por outro lado, um primeiro fenômeno na fotodegradação observado nas Figuras 6.9 e 6.10, é manifestado no acréscimo contínuo da intensidade de fluorescência até aproximadamente 660 minutos de irradiação para ambas as amostras. Canônica & Hoigne (1995) e Bruccoli et al. (1993), indicaram que este efeito é produzido pela desprotonação

preliminar durante a quebra de ligações de hidrogênio, fenômeno corroborado através das mudanças registradas na largura das bandas de 3100 e 3400 cm^{-1} de FTIR. Esta desprotonação deixaria livres radicais H^+ , ocasionando uma conformação mais estendida da molécula, configuração que favorece a ativação de sítios fluoróforos inibidos inicialmente dentro dos agregados húmicos, com um aumento subsequente na intensidade de fluorescência. Adicionalmente Chen et al. (2003) sugeriram que a liberação de grupos doadores de elétrons como hidroxilas e metoxilas intensificaram inicialmente a intensidade por meio da diminuição na probabilidade da atenuação de fluorescência por vias não radiativas como cruzamentos inter-sistemas.

Uma outra mudança significativa em ambas as Figuras 6.9 e 6.10 é o deslocamento progressivo das bandas iniciais para menores comprimentos de onda durante a irradiação. O aparecimento de uma nova banda deslocada para a região do violeta nos tempos de irradiação mais prolongados é consistente com a formação de produtos fluorescentes de menor complexidade molecular por meio de processos com fragmentação de uma macroestrutura e/ou o rearranjo dos agregados húmicos (Frimmel, 1998a; Boehme & Coble, 2000)

Visando avaliar as mudanças quantitativas nos espectros, foi determinada a área total dos mesmos mediante integração. Os valores deste parâmetro chamado de fluorescência total (FT), assim como a sua variação durante o tempo de irradiação são mostrados nas Tabelas 6.6 e 6.7; e representados nas Figuras 6.11 (a) e (b), a partir das quais pode se inferir que o processo de degradação dos fluoróforos acontece em duas etapas:

- ⇒ A primeira, de 0 a 660 minutos, com uma maior velocidade e acréscimos de FT da ordem de 115 % e 98% para as SHA de inverno e verão respectivamente, que corresponder à ativação de sítios fluoróforos inibidos inicialmente na conformação de agregado molecular e/ou a possível formação de outras estruturas relativamente

simples e com maior capacidade de fluorescer (Boehme & Coble, 2000; Chen et al., 2003).

⇒ A segunda etapa, de 660- 5000 min, envolve um processo mais lento de perda de FT com decréscimos totais de 67% e 81% em relação aos espectros iniciais das SHA de inverno e verão, respectivamente. Resultados que são associados à degradação contínua de estruturas fluorescentes mediante a quebra de ligações duplas conjugadas (Moran & Zepp, 1997; Bertilsson, 2004).

Figura 6.11 - Áreas dos espectros de fluorescência como função do tempo de irradiação para as soluções das SHA. a) Espectro de emissão com excitação em 250 nm e b) Espectro de emissão com excitação a 325 nm.

O efeito observado da degradação mais efetiva de estruturas fluorescentes para as SHA de verão, poderia estar associado com seu maior grau de aromaticidade, que favoreceria uma taxa maior de formação de radicais livres nas SHA como a produção de singlete oxigênio, via fotoionização e fotoxidação intramolecular. A correlação entre a reatividade fotoquímica das SHA e o grau de aromaticidade é também demonstrada pela maior perda de absorbância UV-visível apresentada pelas SHA de verão, na seção 6.1 e a maior largura do seu espectro final ocasionada pela alta diversidade de fluoróforos (Boehme & Coble, 2000).

A fim de obter informações mais localizadas e pontuais das regiões fluorescentes, procedeu-se à deconvolução dos espectros de fluorescência, $\lambda_{\text{exc}} = 250$, em curvas de distribuição gaussiana com a utilização do programa Pick Fit.

As Figuras 6.12 (a) e (b) ilustram as oito componentes espectrais geradas, uma linha de base P1 e 7 gaussianas chamadas de P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8 a partir dos espectros das SHA de inverno nos tempos inicial e final da degradação, enquanto as Figuras 6.13 (a) e (b) mostram as mesmas componentes para a SHA de verão. Pode-se observar que o espectro resultante da soma das gaussianas mostrou um ajuste de 99% com os espectros de emissão experimentais das Figuras 6.9 (a) e (b).

As gaussianas componentes do espectro total são dependentes e representam a resposta tanto de um único tipo de estrutura fluorescente (um fluoróforo com diversos comprimentos de onda de fluorescência) quanto uma associação de diversos tipos de estruturas fluorescentes. Nas Tabelas 6.7 e 6.8 pode-se observar a localização de cada gaussiana gerada, assim como a variação da sua área relativa em função do tempo de irradiação.

(a)

(b)

Figura 6.12 - Deconvolução dos espectros de emissão de fluorescência com $\lambda_{exc}=250$ nm para as soluções das SHA de inverno. (a) espectro da amostra inicial (b) espectro após 5000 minutos de irradiação.

(a)

(b)

Figura 6.13 - Deconvolução dos espectros de emissão de fluorescência com $\lambda_{exc}=250$ nm para as soluções das SHA de verão. (a) espectro da amostra inicial (b) espectro após 5000 minutos de irradiação.

Tabela 6.6 – Valores da área total dos espectros de emissão com excitação a 250 nm e das áreas relativas das gaussianas componentes: SHA de inverno.

Tempo Irradiação (min)	Integral Área Total	% da Área Total						
		P2 345 nm	P3 367nm	P4 405nm	P5 430nm	P6 458nm	P7 490nm	P8 520nm
0	53586	1,02	2,69	24,63	11,01	22,96	9,70	14,85
60	70479	0,48	2,37	25,85	11,53	24,04	9,87	13,93
120	76833	1,48	3,27	25,11	11,3	23,61	9,51	13,15
180	91132	0,81	2,55	25,48	11,84	24,19	9,73	13,41
300	110520	0,68	2,86	27,71	9,93	23,15	9,21	11,90
660	115500	4,11	6,56	26,91	8,66	20,12	7,31	9,27
1500	19418	2,47	3,31	24,41	3,49	15,54	7,02	3,93
2100	29075	36,04	18,67	13,77	0,85	5,07	1,21	~ 0
3000	12549	18,53	15,63	35,16	~ 0	1,76	8,74	5,92
5000	17558	34,48	19,41	24,81	0,067	1,62	6,04	4,92

Tabela 6.7 - Valores da área total dos espectros de emissão com excitação a 250 nm e das áreas relativas das gaussianas componentes: SHA de verão.

Tempo Irradiação	Integral Área Total	% da Área Total						
		P2 341nm	P3 366nm	P4 409nm	P5 432nm	P6 454nm	P7 476nm	P8 527nm
0	54661	0,47	7,52	22,91	10,65	8,57	28,70	9,59
60	68763	0,36	6,22	25,46	10,52	9,82	27,95	11,02
120	78460	0,32	6,51	28,30	7,40	8,60	28,70	11,35
180	78046	0,32	4,78	28,74	7,57	8,53	29,91	11,50
300	87764	0,24	4,89	28,83	7,78	8,60	29,07	10,90
660	1081060	~ 0	10,05	25,22	9,82	6,98	30,36	8,72
1500	73184	0,09	10,32	26,11	18,08	11,53	18,75	3,71
2100	18036	6,69	20,54	30,37	3,72	4,76	20,91	9,67
3000	52878	12,68	7,18	25,44	19,21	10,39	12,58	0,39
5000	10627	14,32	17,78	20,97	14,67	8,95	13,83	4,33

Neste conjunto de espectros multicomponentes, formaram-se três grupos de matrizes mediante tratamento estatístico por PCA. A associação das gaussianas foi feita segundo à proximidade mostrada no plano de representação do PCA das Figuras 6.14 (a) e (b), assim as matrizes resultantes foram distribuídas da seguinte maneira: matriz 1: P2+P3; matriz 2: P4+P7+P8; matriz 3: P5+P6.

O novo conjunto de dados, permitiu avaliar a variabilidade do comportamento no tempo de degradação, observando-se na Figura 6.15 (a) e (b), uma intensificação das bandas

de fluorescência ressonantes com os menores comprimentos de onda (P2+P3), nos tempos finais de degradação e em uma porcentagem maior a 300%-100% em relação a suas intensidades iniciais.

Figura 6.14 – Agrupamento das áreas das gaussianas das Tabelas 6.7 e 6.8 com o tempo de irradiação, resultado da análise de PCA em três dimensões (a) amostra de SHA inverno (b) amostra de SHA verão.

Figura 6.15 - Variação no tempo de degradação da associação dos componentes espectrais resultado da deconvolução (a) SHA inverno (b) SHA verão.

A presença dos grupamentos formados por P5+P6 e P4+P7+P8 diminui no tempo, o que concorda com o fato de que a fluorescência em comprimentos de onda longos, é característica dos sistemas eletrônicos complexos de ligações π (Senesi, 1990b; Zsolnay et al., 1999), as quais estariam dando passo à formação de sistemas de fluoróforos mais simples (P2+P3) no decorrer do tempo da irradiação.

Uma comparação entre as Figuras 6.15 (a) e (b) permite diferenciar o comportamento dos fluoróforos presentes entre as SHA de inverno e verão, como se apresenta na Figura 6.15(a), a SHA de inverno exibe uma degradação quase total das matrizes (P5+P6) e (P4+P7+P8) para dar origem à formação e intensificação da presença da matriz (P2+P3). A população de estruturas que apresentam fluorescência nesta região de (347-365nm), estaria relacionada com a fração recalcitrante que absorve na região UV-visível observada nos experimentos de avaliação da cinética de fotodegradação das SHA na seção 6.1. Em contraposição, a fotodegradação apresentada pelas SHA de verão tem como resultado uma população mais uniforme de fluoróforos, observando-se uma presença relativamente similar das três matrizes avaliadas no espectro final.

6.2.4 CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO (CC) PARA ÍONS Cu^{+2}

Sabe-se que a CC é um importante parâmetro de qualidade de águas, que exerce controle determinante na disponibilidade das espécies metálicas (Rocha et al., 2000b; Patel e Sorrentino et al., 2004). Contudo, os ácidos carboxílicos são citados na literatura (Dahlén et al., 1996; Schmitt-Kopplin et al., 1998; Laglera & Van der Berg 2003, 2006), como uns dos principais produtos intermediários da fotodegradação que afetam significativamente a química dos metais por sua reconhecida CC.

A CC para os íons de Cu^{+2} foi obtida através do gráfico do Ln da concentração do metal livre (mmol L^{-1}) versus o Ln da concentração do metal adicionado (mmol L^{-1}). A mudança na inclinação da curva corresponde ao aparecimento dos íons metálicos livres, assim, o ponto de intersecção entre as duas tangentes observadas, determina a concentração máxima de Cu^{+2} que pode ser complexada (CC do Cu^{+2}) (Tuschall, 1983; Morrison, 1989). A Figura 6.16 (a) e (b) representa as curvas empregadas para a determinação da CC do Cu^{+2} das soluções das SHA de inverno e verão iniciais, obtidas a partir da titulação com solução padrão de Cu^{+2} utilizando o procedimento de UF-FT.

A determinação da concentração de Cu^{+2} foi feita por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. Inicialmente fizeram-se sucessivas adições de uma solução com concentração conhecida do Cu^{+2} em água sem SHA (*solução branco*). Em seguida foi determinada a concentração de Cu^{+2} na solução e no filtrado.

Com base nas diferenças entre a curva referencial (Cu^{+2} total adicionado) e as curvas de complexação das amostras iniciais SHA de inverno e verão, nas Figuras 6.16 (a) e (b), observa-se que ambas as amostras possuem ligantes capazes de complexar o Cu^{+2} , mas com uma diferença em relação à concentração de sítios complexantes. Para a SHA de inverno, o ponto de inflexão foi determinado na adição da alíquota correspondente ao ponto T6 da curva,

enquanto para as SHA de verão em T5, o valor de T6 é um indicativo do maior efeito de complexação do Cu^{+2} pelas amostras de inverno.

Figura 6.16 – Curvas de determinação da CC com Cu^{+2} das soluções das SHA sem irradiação. Concentração inicial da solução: 30 mg L^{-1} (a) SHA inverno, (b) SHA verão.

As Figuras 6.17 (a) e (b) ilustram a análise da CC de Cu^{+2} nas SHA de inverno após tempos de irradiação de 300 e 1500 minutos, observando-se que a degradação fotoquímica resultou na total eliminação da CC, pela semelhança entre as curvas de referência e as curvas de titulação.

Figura 6.17 – Curvas de determinação da CC Cu^{+2} das soluções das SHA de verão submetidas à diferentes tempos de irradiação. (a) 300 min., (b) 1500 min

O fenômeno deve-se provavelmente às reações de descarboxilação que estariam acontecendo após os primeiros momentos da irradiação, com a conseqüente quebra e

destruição de estruturas ligantes e a conversão a estruturas orgânicas de baixa massa molecular como piruvatos, glioxilatos, etc. (Obernosterer, 1999).

Efeitos similares, de diminuição e remoção total de sítios ligantes após radiação solar, já foram reportados na literatura (Zwolsman et al., 1997; Laglera & Van den Berg, 2006), determinando tempos de meia vida de aproximadamente 20 horas para amostras de águas naturais. Considerando que a intensidade de trabalho foi aproximadamente 4 vezes maior que a intensidade da radiação solar nos comprimentos de onda irradiados, é de se esperar tempos de vida menores para as estruturas responsáveis da CC do Cu^{+2} .

A Tabela 6.9 apresenta os resultados referentes à CC, obtidos para as de SHA do Rio Negro das estações avaliadas. A CC das SH, em geral é convencionalmente expressa em $\text{mmol Cu}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ COT}$ e caracteriza a quantidade máxima de íons Cu^{+2} que podem ser complexados às SH em solução aquosa. Devido à irradiação diminuir a concentração de COT nas soluções com o tempo de irradiação, foi necessário normalizar a densidade de sítios complexantes e expressá-la em função do teor de COT para representar intrinsecamente esta propriedade.

Tabela 6.9- Valores da CC das SHA iniciais de inverno e verão.

Amostra SHA	COT (mg L^{-1})	Ponto de Inflexão Cu_{livre} vs Cu_{total}	CC Cu^{+2} ($\text{mmol Cu gr}^{-1} \text{ COT}$)
Inverno sem irradiar	11,19	$T6 = 7,3 * 10^{-3}$	0,72
Verão sem irradiar	10,93	$T5 = 6,4 * 10^{-3}$	0,55

Ao comparar os resultados da Tabela 6.9 pode-se observar que a amostra mais alifática (SHA de inverno) apresentou concentrações significativamente superiores de sítios ligantes, que podem estar associadas com estruturas carboxílicas, derivando na elevada susceptibilidade fotoquímica após tempos curtos de irradiação.

Embora a estimativa da constante de estabilidade (K_1) dos complexos Cu-SHA, seja convencionalmente obtida pelo método de Scatchard (Stevenson, 1994), este não é aplicável para as baixas concentrações de trabalho de Cu^{+2} , pois K_1 depende de valores medidos no

início da titulação, onde ocorre baixa saturação de sítios ligantes. Portanto, no presente estudo não foi considerado este cálculo dada a baixa concentração de COT nas soluções irradiadas (inferiores a 10 mgL^{-1}), as que precisam também de baixas concentrações nas adições de Cu^{+2} , provocando uma ampla dispersão dos valores experimentais.

6.3 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos, é observado que a irradiação das soluções aquosas de SHA tiveram como resultado uma significativa mineralização, refletida em um decréscimo no conteúdo de COT em concentrações que variam entre 68-78%.

As técnicas de FTIR e fluorescência, evidenciam que esta mineralização começaria com uma desagregação e produção intermediária de ácidos orgânicos de baixa massa molecular (formaldeídos, acetaldeídos, glioxilatos e piruvatos), que incrementariam a acidez do sistema, e se derivariam finalmente em CO_2 , CO e H_2O .

Além disso, foram observadas variações significativas nas propriedades ópticas através da perda global de absorbância UV-visível e fluorescência, associada com a diminuição da concentração de estruturas cromóforas e fluoróforas, sendo que a fluorescência conseguiu detectar mudanças no sistema até os tempos finais de irradiação (80 horas).

As alterações mais significativas nos espectros de fluorescência foram em geral uma perda de intensidade do sinal de fluorescência e um deslocamento progressivo das bandas desde a região do azul até a região do UV, devido a uma quebra e transformação das estruturas cromóforas conjugadas em compostos menores.

As variações nas principais bandas de FTIR, sugeriram três processos de transformação decorrentes da irradiação:

- ⇒ Alterações nas ligações inter e/ou intra moleculares de H, que provocam uma desagregação da molécula húmica e favorecem uma estrutura mais estendida.

- ⇒ Ionização de grupos carboxílicos e carbonílicos e posterior descarboxilação para a formação dos produtos da mineralização.
- ⇒ Formação de éteres e ésteres fenólicos e benzílicos através das ligações livres dos íons carboxilato formados.

Uma série de processos simultâneos e competitivos, estaria acontecendo via fotoquímica através de reações de sensibilização, transferência de carga e/ou fotoincorporação de estruturas (Fukushima et al., 2001). Estes processos, cuja consequência final é a degradação da estrutura húmica seriam os seguintes:

1. Fotólise direta derivada em processos de desprotonação e descarboxilação nos primeiros 300 minutos da irradiação e corroborada pela perda total de sítios ligantes observada na CC com o Cu^{+2} . Outras manifestações deste mecanismo seriam a acidificação inicial do sistema e o aumento da intensidade de fluorescência, favorecida pela desagregação molecular da SHA. Além disso, Xie et al. (2004); demonstraram que os grupos carboxílicos estão envolvidos em processos de formação de radicais carboxilato RCOO^* , mediadores na produção de transientes fotoquímicos como superóxido, hidroxila e peróxila, importantes catalizadores da fotooxidação das SHA.
2. Fotólise indireta provocada principalmente pelos radicais livres anteriormente mencionados que são responsáveis pelas reações intramoleculares de estruturas condensadas que requeriam uma maior quantidade de energia para seu desenvolvimento. Estas reações, citadas por Canônica et al. (1995); Schmitt-Kopplin et al. (1998); compreendem a abertura de anéis aromáticos e a subsequente mineralização. Corroborando esta informação, Vahatalo et al. (1999) indicaram que a radiação solar pode converter átomos de carbono aromáticos em

CO₂, demonstrando que nem todos os átomos de carbono fotoquimicamente transformados em CO₂ procedem necessariamente de grupos carboxílicos.

No presente estudo, este mecanismo fotoquímico pode ser confirmado através da perda de absorbância e fluorescência em comprimentos de onda longos e o favorecimento da fluorescência em comprimentos de onda na região do UV, e além das altas taxas de mineralização observadas pela diminuição na concentração de COT.

CAPITULO 7

CONCLUSÕES

A combinação de métodos espectroscópicos (RPE, RMN ^{13}C , FTIR, absorção e fluorescência de UV-visível) revelou satisfatoriamente o efeito das mudanças sazonais do sistema hidrográfico do Rio Negro. Através da caracterização estrutural das SHA, constatou-se que dentro do grupo de amostras avaliado (SHA de verão, outono, inverno e primavera) as SHA do inverno (época de cheia) evidenciaram um maior carácter alifático, diretamente relacionado com os altos níveis fluviométricos favorecendo o ingresso de MO fresca, de natureza hidrofílica e em vias de estabilização na corrente do rio.

Por outro lado as SHA de verão e outono, mostraram uma maior concentração de estruturas aromáticas com elevados graus de estabilização identificados através das maiores concentrações de RLS por EPR, dos maiores índices de humificação por fluorescência e dos maiores valores das absorbâncias a comprimentos de onda mais longos.

Além disso, a diferenciação estrutural em função a sazonalidade evidência também dois mecanismos de formação e produção das SHA no Rio Negro:

- ⇒ A via alóctone, a qual deriva-se da filtração e lixiviação da MO fresca desde as camadas de solos podzólicos. Este mecanismo é favorecido durante as épocas de inundação das planícies amazônicas e é refletido na natureza mais alifática das SHA de inverno.
- ⇒ A via autóctone, derivada da produção microbiana, manifesta-se nas SHA de verão e outono com maior grau de condensação e aromaticidade. Esta via de produção microbiana é favorecida pelas altas temperaturas registradas no intervalo

de verão - outono e a conseqüente diminuição do aporte de MO terrestre nos meses de menor nível do rio (época de seca).

A relevância de cada mecanismo na produção das SHA é diretamente dependente da interação de variáveis climáticas como temperatura, umidade, precipitações, fluxos de água e disponibilidade de oxigênio. Assim, estas variáveis apresentam um impacto direto sobre os processos de produção química e microbiana da MO e posterior liberação por lixiviação e drenagem dos solos circundantes.

Por outro lado, a fotoirradiação das SHA com luz UV-visível (290-475 nm) teve como conseqüências globais:

- ⇒ redução aproximada de 75% de COT, verificando-se a mineralização;
- ⇒ diminuição progressiva da cor e dos valores de absorbância detectados pela espectroscopia de absorção UV-visível evidenciando o desaparecimento de estruturas cromóforas;
- ⇒ formação de estruturas de menor complexidade molecular, demonstrada através do deslocamento dos máximos de fluorescência para menores comprimentos de onda;
- ⇒ acidificação do meio (6 - 4,5), fenômeno que sugere uma desagregação, quebra de ligações e decomposição estrutural com a formação de estruturas mais simples como ácidos orgânicos de baixa massa molar, e finalmente a mineralização com a formação de moléculas de água, gases de carbono (CO e CO₂).
- ⇒ perda total da CC das SHA com o Cu⁺², observada depois dos 300 minutos da irradiação.

Dentre as técnicas utilizadas (determinação de COT, espectroscopia de absorção de luz UV-visível, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de FTIR e CC com Cu⁺²), a análise de fluorescência mostrou-se a mais sensível para monitorar a fotodegradação, pois

permitiu a detecção de mudanças estruturais até os tempos finais de irradiação (5000 min), mudanças que foram evidenciadas na variação dos máximos de intensidade das bandas nos espectros de emissão, assim como no deslocamento das mesmas para menores comprimentos de onda (440-330 nm).

Por meio da correlação de fluorescência com os métodos analíticos do trabalho, pode-se atribuir que os deslocamentos espectrais seriam um indicativo da variabilidade na complexidade molecular das SHA, sendo reconhecido que deslocamentos batocrômicos das bandas de emissão de fluorescência são originados por um aumento na diferença energética entre os níveis orbitais. Em contraposição, mudanças estruturais que resultam em um deslocamento para menores comprimentos de onda envolvem uma diminuição na extensão do sistema eletrônico π , um decréscimo da conjugação de anéis aromáticos e uma redução de ligações conjugadas nas cadeias alifáticas, além da eliminação de certos grupos funcionais como carboxílicos, hidroxílicos e aminas.

Embora as SHA estudadas possuam a mesma origem espacial, têm-se encontrado diferenças estruturais no grau de condensação, complexidade molecular e estabilidade estrutural com resultado da variabilidade sazonal. Esta sazonalidade é corroborada com o diferente comportamento na fotodegradação das SHA de verão e inverno, como resultado das diferentes concentrações de grupos cromóforos presentes que originam a competição dos diversos mecanismos geradores de fototransientes ($\text{OH}^\bullet$, e_{aq}^- , $^1\text{O}_2$, $^3\text{HS}^*$) no processo.

Assim, as SHA de verão (maior aromaticidade) apresentaram uma cinética de fotodegradação lenta, embora mais efetiva com uma perda quase total dos sinais de absorção UV-visível e fluorescência, atribuída a uma transformação global dos grupos cromóforos, favorecendo a formação de estruturas não absorventes de menor complexidade molecular. Em contrapartida, as SHA de inverno (maior alifaticidade) sofreram rapidamente os efeitos da irradiação, atingindo um estado estacionário de absorbância resultado da acelerada

decomposição de grupos alifáticos e/ou a produção de estruturas recalcitrantes, absorventes e não fotoreativas nos comprimentos de onda em estudo.

Contudo, as análises e experimentos desenvolvidos contribuem para um conhecimento mais profundo das tendências a curto e longo prazo dos fluxos das SHA nos rios, assim como a sua interação com diversas variáveis ambientais. Tendências que evidenciam a relevância global da dinâmica das SHA para o melhor entendimento do comportamento dos estoques de C terrestres e aquáticos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBT-BRAUN, G.; FRIMMEL, F. H. Basic characterization of Norwegian NOM samples: similarities and differences. **Environment International**, v. 25, n. 2-3, p. 161-180, 1999.

ABBT-BRAUN, G.; LANKES, U.; FRIMMEL, F. H. Structural characterization of aquatic humic substances: the need for a multiple method approach. **Aquatic Science**, v. 66, p. 151-170, 2004.

AMBIENTE BRASIL. Solos. Jornal Diário. Disponível em:

<<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./natural/index.html&conteudo=./natural/biomas/amazonia.html#solos>>

Acesso em: 20 set. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA); COMPANHIA DE PESQUISA DE RECURSOS MINERAIS (CPRM). Relatório técnico da cheia 2004. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/rehi/manaus/pdf/cheia_2004.pdf>.

Acesso em: 30 set. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA); COMPANHIA DE PESQUISA DE RECURSOS MINERAIS (CPRM). Relatório técnico da cheia 2003. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/rehi/manaus/pdf/cheia_2003.pdf>.

Acesso em: 30 set. 2006.

AGUER, J. P.; RICHARD, C. Reactive species produced on irradiation at 365 nm of aqueous solutions of humic acids. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 93, p. 193-198, 1996.

ALMENDROS, G.; GUADALIX, M. E.; GONZALEZ-VILA, F. J.; MARTIN, F. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. **Organic Geochemistry**, v. 24, p. 651-659, 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, p. 659-667, 2005.

AMON, R. M. W.; BENNER, R. Photochemical and microbial consumption of dissolved organic carbon and dissolved oxygen in the Amazon River system. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 60, p. 1783-1792, 1996.

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

BAES, A. U.; BLOOM, P. R. Diffuse reflectance and transmission fourier transform infrared spectroscopy of humic and fulvic acids. **Soil Science Society of American Journal**, v. 53, p. 695-700, 1989.

BAES, A. V.; BLOOM, P. R. Fulvic acid ultraviolet-visible spectra: influence of solvent and pH. **Soil Science Society of American Journal**, v. 54, p. 1248, 1990.

BAKER, A.; SPENCER, R. G. M. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. **Science of The Total Environment**, v. 333, p. 217-232, 2004.

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

BATHISTA, A. L. B. S. **Princípios básicos de ressonância magnética nuclear do estado sólido**. São Carlos: IFSC, 2005. 50 p.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P.R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. **Plant Soil**, v. 238, p. 133–140, 2002.

BENNER, R.; HEDGES, J. I. A test of the accuracy of freshwater DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation and UV-promoted persulfate oxidation. **Marine Chemistry**, v. 41, n. 1-3, p. 161-165, 1993.

BERTILSSON, S.; CARLSSON, P.; GRANIELI, W. Influence of solar radiation on the availability of dissolved organic matter to bacteria in the Southern Ocean. **Deep-Sea Research II**, v. 51, p. 2557–2568, 2004.

BLOOM, P. R.; LEENHEER, J. A. Vibrational, electronic, and high-energy spectroscopic methods for characterizing humic substances. In: HAYES, M. H. B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R. L.; SWIFT, R. S. (Eds.) **Humic substances II: in search of structure**. New York: John Wiley, 1989. p. 410-446.

BLOUGH, N. V.; ZAFIRIU, O.; BONILLA, J. Optical absorption spectra of waters from Orinoco River outflow: terrestrial input of colored organic matter to the Caribbean. **Journal of Geophysics Resources**, v. 98, p. 2271-2278, 1993.

BOEHME J. R., COBLE P. G. Characterization of colored dissolved organic matter using high-energy laser fragmentation. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 3283-3290, 2000.

BOEHME, J.; WELLS, M. Fluorescence variability of marine and terrestrial colloids: Examining size fractions of chromophoric dissolved organic matter in the Damariscotta River estuary. **Marine Chemistry**, v. 101, p. 95-103, 2006.

BRACCHINI, L.; CÓZAR, A.; DATTILO, A. M.; FALCUCCI, M.; GONZALES, R.; LOISELLE, S.; HULL, V. Analysis of extinction in ultraviolet and visible spectra of water bodies of the Paraguay and Brazil wetlands. **Chemosphere**, v. 57, p. 1245-1255, 2004.

BRACCHINI, L.; CÓZAR, A.; DATTILO, A. M.; LOISELLE, S. A.; TOGNAZZI, A.; AZZA, N.; ROSSI, C. The role of wetlands in the chromophoric dissolved organic matter

release and its relation to aquatic ecosystems optical properties. A case of study: Katonga and Bunjako Bays (Victoria Lake; Uganda). **Chemosphere**, v. 63, p. 1170-1178, 2006.

BRINKMANN, T.; SARTORIUS, D.; FRIMMEL, F. H. Photobleaching of humic rich dissolved organic matter. **Aquatic Sciences**, v. 65, p. 415-424, 2003.

BRUCCOLERI, A.; PANT, B. C.; SHARMA, D. K.; LANGFORD, C. H. Evaluation of primary photoproduct quantum yields in fulvic acid. **Environmental Science and Technology**, v. 27, p. 889-894, 1993.

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

BUFFLE, J. The key role of environmental colloids/nanoparticles for the sustainability of life. **Environmental Chemistry**, v. 3, p. 155-158, 2006.

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

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

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; RUMJANEK, V. M.; MORAES, A. A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1529-1538, 2001.

CANONICA, S.; JANS, U.; STEMMLER, K.; HOIGNE, J. Transformation kinetics of phenols in water: photosensitization by dissolved natural organic material and aromatic ketones. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 1822-1831, 1995.

CARVALHO, E. R.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P.; ROCHA, J. C. ROSA, A. H. Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 421-426, 2004.

CARVALHO, Eduarda Regina. **Estudos da formação de trihalometanos a partir de substâncias húmicas aquáticas tratadas com cloro e dióxido de cloro**. 2003. 192 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provide on humic substances by E_4/E_6 ratios. **Soil Science Society of American Journal**, v. 41, p. 352, 1977.

CHEN, J.; LEBOEUF, E.; DAI, S.; BAOHUA, G. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. **Chemosphere**, v. 50, p. 639-647, 2003.

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

COBLE, P. G. Characterisation of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation – emission matrix spectroscopy. **Marine Chemistry**, v. 51, p. 325– 346, 1996.

COOK, R.; LANGFORD, C. H. A modified cross-polarization magic angle spinning ¹³C NMR procedure for the study of humic materials. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 3979–3986, 1996.

COOK, R. Coupling NMR to NOM. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 1484–1503, 2004.

CORIN, N.; BACKLUND, P.; KULOVAARA, M. Degradation products formed during UV-irradiation of humic waters. **Chemosphere**, v. 33, p. 245-255, 1996.

CUTHBERT, I. D.; GIORGIO, P. Toward a standard method of measuring color in freshwater. **Limnology and Oceanography**, v. 37, p. 1319-1326, 1992.

DAHLÉN, J.; BERTILSSON, S.; PETTERSSON, C. Effects of UV-A irradiation on dissolved organic matter in humic surface waters **Environmental International**, v. 22, p. 501-506, 1996.

DALVI, A. G.; AL RASHEED, R.; JAVEED, M. A. Studies on organic foulants in the seawater feed of reverse osmosis plants of SWCC. **Desalination**, v. 132, p. 217-232, 2000.

DA SILVA, W. T. L.; DA SILVA, S. C.; DE OLIVEIRA REZENDE, M. O. Influence of gamma-radiation on the behavior of humic acids from peat and tropical soil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 222, p. 29-34, 1997.

DAVIES, G.; FATAFTAH, A.; CHERKASSKIY, A.; GHABBOUR, E. A.; RADWAN, A.; JANSEN, S. A.; KOLLA, S.; PACIOLLA, M. D.; SEIN, L. T.; BUERMANN, W.; BALASUBRAMANIAN, M.; BUDNICK, J.; XING, B. Tight metal binding by humic acids and its role in biomineralization. **Journal of Chemical Society**, v. 21, 4047 – 4060, 1997.

DAVIS, W. M.; ERICKSON, C. L.; JOHNSTON, C. T.; DELFINO, J. J.; PORTER, J. E. Quantitative Fourier Transform infrared spectroscopic investigation of humic substance functional group composition. **Chemosphere**, v. 39, p. 2913-2928, 1999.

DEL VECCHIO, R.; BLOUGH, N. B. Photobleaching of chromophoric dissolved organic matter in natural waters: kinetics and modeling. **Marine Chemistry**, v. 78, p. 231-253, 2002.

DEL VECCHIO, R.; BLOUGH, N. V. On the origin of the optical properties of humic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 38, p. 3885-3891, 2004.

DEMASTER, D. J.; POPE, R. H. Nutrient dynamics in Amazon shelf waters: results from AMASSEDS. **Continental Shelf Research**, v. 16, p. 263-289, 1996.

DEMASTER, D. J.; SMITH JR. W. O.; NELSONS, D. M.; ALLER J. Y. Biogeochemical processes in Amazon shelf waters: chemical distributions and uptake rates of silicon, carbon and nitrogen. **Continental Shelf Research**, v. 16, p. 617-643, 1996.

DIALLO, M. S.; SIMPSON, A.; GASSMAN, P.; FAULON, J. L.; JOHNSON, J. H.; GODDARD, W. A.; HATCHER, P. G. 3-D Structural modeling of humic acids through experimental characterization, computer assisted structure elucidation and atomistic simulations. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 1783-1793, 2003.

DITTMAR, T.; HERTKORN, N.; KATTNER, G.; LARA R. Mangroves, a major source of dissolved organic carbon to the oceans. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 20, p. 1012-1018, 2006.

DUBROEUCQ, D.; VOLKOFF, B. From oxisols to spodosols and histosols: evolution of the soil mantles in the Rio Negro basin of the soil mantles in the Rio Negro basin (Amazonia). **Catena**, v. 32, p. 245-280, 1998.

ERTEL, J. R.; HEDGES, J. I.; DEVOL, A. H.; RICHEY, J. E.; RIBEIRO, N. G. M. Dissolved humic substances of the Amazon River system. **Limnology and Oceanography**, v. 31, p. 739-754, 1986.

FISH, W.; MOREL, F. Propagation of error in fulvic acid titration data: a comparison of three analytical methods. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 63, p. 1185-1193, 1985.

FRIMMEL, F. H.; ABBT-BRAUN, G. Comparisson of aquatic humic substances of different origin. In ALLARD, A.; BOREN, H.; GRIMVALL, A. (Eds.). **Humic substances in the aquatic and terrestrial environment**. Berlin: Springer, 1991, 471p.

FRIMMEL, F. G.; GREMM, T.; HUBER, S. Liquid chromatographic characterization of refractory organic acids. **The Science of The Total Environment**, v. 117-118, p. 197-206, 1992.

FRIMMEL, F. H.; HUBER, L. Influence of humic substances on the aquatic adsorption of heavy metals on defined mineral phases. **Environment International**, v. 22, p. 507-517, 1996.

FRIMMEL, F.H. Characterization of natural organic matter as major constituents in aquatic systems. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 35, p. 201-216, 1998a.

FRIMMEL, F.H. Impact of light on the properties of aquatic natural organic matter. **Environment International**, v. 24, p. 559, 1998b.

FUENTES, M.; GONZÁLEZ GAITANO, G.; GARCÍA MINA, J. M. The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. **Organic Geochemistry**, v. 37, p. 1949-1959, 2006.

FUKUSHIMA, M.; TATSUMI, K. Degradation characterization of humic acid during photo-fenton processes. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3683-3690, 2001.

GAYDON, A.G. **Dissociation energies and spectra of diatomic molecules**. London: Chapman and Hall. 1953, 261p.

GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A.; ORLANDINI, K. A. The use of hollow-fiber ultrafilters for the isolation of natural humic and fulvic acids. In: GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A.; CLARK, S. B. (Eds.). **Humic/fulvic acids and organic colloidal materials in the environment**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 26-41. (ACS Symposium Series, 651).

GARBIN, José Roberto. **Estudos espectroscópicos da fotólise de pesticidas em água na presença de substâncias húmicas**. 2004. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

GARBIN, J. R.; MILORI, D. M. B. P.; SIMÕES, M. L.; DA SILVA, W. T. L.; MARTIN NETO, L. Influence of humic substances on the photolysis of aqueous pesticide residues. **Chemosphere**, v. 66, p. 1692-1698, 2007.

GOLDSTONE, J. V.; PULLIN, M. J.; BERTILSSON, S.; VOELKER, D. M. Reactions of hydroxyl radical with humic substances: bleaching, mineralization, and production of bioavailable carbon substrates. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 364-372, 2002.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L. A.; MILORI, D. M. B. P.; CAMARGO, O. A. de; BERTON, R.; BETTIOL, W. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge-amended oxisols by electron paramagnetic resonance. **Soil and Tillage Research**, v. 91, p. 95-100, 2006.

GREGOR, J. E.; POWELL, H. K. J. Effects of extraction procedures on fulvic acid properties. **Science of Total Environment**, v. 62, p. 3-12, 1987.

GRZYBOWSKI, W. Effect of short-term sunlight irradiation on absorbance spectra of chromophoric organic matter dissolved in coastal and riverine water. **Chemosphere**, v. 40, p. 1313-1318, 2000.

HEDGES, J. I.; EGLINTON, G.; HATCHER, P. G.; KIRCHMAN, D. L.; ARNOSTI, C.; DERENNE, S.; EVERSLED, R. P.; KÖGEL-KNABNER, I.; DE LEEUW, J. W. The molecularly uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 945-958, 2000.

HERTKORN, N.; CLAUS, H.; SCHMITT-KOPPLIN, P. H.; PERDUE, E. M.; FILIP, D. Z. Utilization and transformation of aquatic humic substances by autochthonous microorganisms. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 4334-4345, 2002.

HERTKORN, N.; BENNER, R.; FROMMMBERGER, M.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; WITT, M.; KAISER, K.; KETTRUP, A.; HEDGES, J. I. Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 70, n. 12, p. 2990-3010, 2006.

[HUNT](#), A. P.; PARRY, J. D.; HAMILTON-TAYLOR, J. Further evidence of elemental composition as an indicator of the bioavailability of humic substances to bacteria. **Limnology and Oceanography**, v. 45, p. 237-241, 2000.

- JANSSEN, C. R.; HEIJERICK, D. G.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C; ALLEN, H. E. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. **Environment International**, v. 28, p. 793-800, 2003.
- JELINSKI, L. W.; MELCHIOR, M. T. High-Resolution NMR of solids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 35, n. 1-2, p. 25-93, 2000.
- JEZISKI, A.; DROZD, J.; JERZYKIEWICZ, M.; CHEN, Y.; KAYE, K. J. EPR in the environmental control: copper complexes and free radicals in soil and municipal solid waste compost. **Applied Magnetic Resonance**, v. 14, p. 275-282, 1998.
- KALBITZ, K.; GEYER, W.; GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances: a reflection of land use history in a fen area. **Biogeochemistry**, v. 47, p. 219-238, 1999.
- KALBITZ, K.; GEYER, S.; GEYER, W. A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances. **Chemosphere**, v. 40, p. 1305-1312, 2000a.
- KALBITZ, K.; SOLINGER, S.; PARK, J. H.; MICHALZIK, B.; MATZNER, E. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. **Soil Science**, v. 165, p. 277-304, 2000b.
- KALBITZ, K.; KAISER, K.; BARGHOLZ, J.; DARDENNE, P. Lignin degradation controls the production of dissolved organic matter in decomposing foliar litter. **European Journal of Soil Science**, v. 57, p. 504, 2003.
- KENWORTHY, I. P.; HAYES, M. H. B. Investigations of some structural properties of humic substances by fluorescence quenching. IN: HAYES, M. H. B.; WILSON, W. S. (Eds.). **Humic substances, peats and sludges: health and environmental aspects**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. p.39.
- KIEBER, R. J.; ZHOU, X.; MOPPER, K. Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: fate of riverine carbon in the sea. **Limnology and Oceanography**, v. 35, p. 1503-1515, 1990.
- KIEBER, D. J. Photochemical production of biological substrates. In: MORA, S.; DEMERS, S.; VERNET M. (Eds.). **The effect of UV radiation in the marine environment**, Cambridge:Cambridge University Press, 2000. p. 130–148.
- KIM, H. C.; YU, M. J.; HAN, I. Multi-method study of the characteristic chemical nature of aquatic humic substances isolated from the Han River, Korea. **Applied Geochemistry**, v. 21, p. 1226–1239, 2006.
- KNICKER, H. Biogenic nitrogen in soils as revealed by solid-state carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, p. 715-723, 2000.
- KONONOVA, M. M. **Soil Organic Matter**. Oxford: Pergamon, 1966. 544p.

KORSHIN, G. V.; LI, C. W.; BENJAMIN, M. M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. **Water Research**, v. 31, p. 1787-1795, 1997.

KORSHIN, G. V.; VIOLLEAU, D. Correlation between molecular weight and fluorescence emission in studies of natural organic matter chlorination. In: INTERNATIONAL MEETING OF THE INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY, 10., 2000, Toulouse-França. **Proceedings...** Toulouse: SpringerVerlag, 2000. p. 73-76.

KUJAWINSKI, E. B.; DEL VECCHIO, R.; BLOUGH, N. V.; KLEIN, G. C.; MARSHALL, A. G. Probing molecular-level transformations of dissolved organic matter: insights on photochemical degradation and protozoan modification of DOM from electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Marine Chemistry**, v. 92, p. 23-37, 2004.

KULOVAARA, M.; CORIN, N.; BACKLUND, P.; TERVO, J. Impact of UV₂₅₄ radiation on aquatic humic substances. **Chemosphere**, v. 33, p. 783-790, 1996.

LAGLERA, L. M.; VAN DEN BERG, C. M. G. Copper complexation by thiol compounds in estuarine waters. **Marine Chemistry**, v. 82, p. 71-89, 2003.

LAGLERA, L. M.; VAN DEN BERG, C. M. G. Photochemical oxidation of thiols and copper complexing ligands in estuarine waters. **Marine Chemistry**, v. 82, p. 71-89, 2006.

LAMBERT, J.; LANKES, U. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to structural investigations of refractory organic substances: principles and definitions. In: FRIMMEL, F. H.; ABBT-BRAUN, G.; HEUMANN, K. G.; HOCK, B.; LÜDEMANN H. D.; SPITELLER, M. (Eds.). **Refractory organic substances (ROS) in the environment**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

LEENHEER, J. A. Origin and nature of humic substances in the waters of the Amazon Basin. **Acta Amazônica**, v 10, p. 513, 1980.

LEENHEER, J. A.; CROUE, J. P. Aquatic organic matter: understanding the unknown structures is key to better treatment of drinking water. **Environmental Science and Technology**, v. 23, p. 19A-26A, 2003.

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

LEPANE, V.; PERSSON, T.; WEDBORG, M. Effects of UV-B irradiation on molecular weight distribution and fluorescence from humic substances in riverine and low salinity water. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 56, p. 161-173, 2003.

LINDELL, M. J.; GRANELLI, W., TRANVIK, L. J. Enhanced bacteria growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**, v. 40, p. 195-199, 1995.

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

LU, X. Q.; HANNA, J. V.; JOHNSON, W. D. Evindence of chemical pathways of humification: a study of aquatic humic substances heated at various temperatures. **Chemical Geology**, v. 177, p. 249–264, 2001.

LUMB, M.D. **Luminescence Spectroscopy**. New York: Academic Press, 1978. 375p.

MACARTHY, P.; MALCOLM, R. L.; CLAPP, C. E.; BLOOM, P. R. An Introduction to Soil Humic Substances. In: MACCARTHY, P.; CLAPP, C. E.; MALCOLM, R. L.; BLOOM, P. R. (Eds.). **Humic Substances in Soil and Crop Sciences**: Selected Readings. Madison: American Society of Agronomy, 1990.

MACARTHY, P. The principles of humic substances. **Soil Science**, v. 166, p. 738-751, 2001.

MALCOLM, R. L.; SWIFT, R. S. **Humic substances II**: in search of structure. New York: John Wiley. 1989. p. 460-465.

MARQUES, J. C. **Caracterização química e espectroscópica de substâncias húmicas de solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O. R., TALAMONI, J.; POPPI, N. R. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil. **Soil Science**, v. 51, p. 369-376, 1991.

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

MAYER, L. M.; SCHICK, L. L.; LODER III, T. C. Dissolved protein fluorescence in two maine estuaries. **Marine Chemistry**, v. 64, p. 171-179, 1999.

MCDONALD, S.; BISHOP, A. G.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Analytical chemistry of freshwater humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 527, p. 105-124, 2004.

MCKNIGHT, D. M.; BOYER E. W.; WESTERHOFF, P. K.; DORAN, P. T.; KULBE, T.; ANDERSEN, D. T. Spectrofluorometric characterization of aquatic fulvic acid for determination of precursor organic material and general structural properties. **Limnology and Oceanography**, v. 46, p. 38– 48, 2001.

MCKNIGHT, D. M.; HOOD, E.; KLAPPER, L. Trace organic moieties of dissolved organic material in natural waters. In: FINDLAY, S.E.; GINSABURGH, R.L. (Eds.). **Aquatic ecosystems**: interactivity of dissolved organic matter. Ohio: Academic Press, 2003. p. 71– 93.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Eds.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 1-8.

MILLER, W. L.; ZEPP, R. G. Photochemical production of dissolved inorganic carbon from terrestrial organic matter: significance to the oceanic organic carbon cycle. **Geophysics Resources Letters**, v. 22, p. 1221-1229, 1995.

MILLER, W. L. Effects of UV radiation on aquatic humus: photochemical principles and experimental considerations. In: HESSEN; TRANVIK. (Eds.). **Aquatic Humic Substances**. Berlin: Springer-Verlag, 1998. p. 127-141.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, n. 11, p. 739-749, 2002.

MINOR, E. C.; SIMJOUW, J. P.; MULHOLLAND, M. R. Seasonal variations in dissolved organic carbon concentrations and characteristics in a shallow coastal bay. **Marine Chemistry**, v. 101, p. 166-179, 2006.

MOPPER, K.; ZHOU, X.; KIEBER, R. J.; KIEBER, D. J.; SOKORSKI, R.; JONES, R. D. Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. **Letters to Nature**, v. 353, p. 60-62, 1991.

MOPPER, K.; KIEBER, D.J. Marine photochemistry and its impact on carbon cycling, in: S. de Mora, S. Demers, M. Vernet (Eds.), **The Effect of UV Radiation in the Marine Environment**, Cambridge University Press, Cambridge, p. 101-129, 2000.

MORAN, M. A.; ZEPP, R. G. Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1307-1316, 1997.

MORRIS, D. P.; HARGREAVES, B. P. The role of photochemical degradation of dissolved organic carbon in regulation the UV transparency of three lake on the Pocono Plateau. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 239-240, 1997.

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

MOUNIER, S.; BRAUCHER, R.; BENAÏM, J. Y. Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by cross-flow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence. **Water Research**, v. 33, p. 2363-2373, 1999.

MUNSTER, U. Amino acid profiling in natural organic matter isolated by reverse osmosis from eight different boreal freshwaters. **Environment International**, v. 25, p. 209-224, 1999.

MUNSTER, U.; CHRÓST, R. J. Origin, composition and microbial utilization of dissolved organic matter p. 8-46. In: OVERBECK J., CHRÓST, R. J. (eds.). **Aquatic microbial ecology: biochemical and molecular approaches**. New York: Springer Verlag, 1990. p. 150-165.

NEUBECKER, T. A.; ALLEN, H. E. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. **Water Research**, v. 17, p. 1-14, 1983.

NIEMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J. M. Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 135-140, 1992.

NIFANTEVA, T. I.; SHKINEV, V. M.; SPIVAKOV, Y.A.; BURBA, P. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part 2. Evaluation of conditional stability constants by using ultrafiltration. **Talanta**, v. 48, p. 257-267, 1999.

NOVOTNY, E. H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo**. 2002. 231 f. Tese (Doutorado em Físico Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

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

O'SULLIVAN, D. W.; NEALE, P. J.; COFFIN, R. B.; BOYD, T. J.; OSBURN, C. L. Photochemical production of hydrogen peroxide and methylhydroperoxide in coastal waters. **Marine Chemistry**, v. 97, p. 14-33, 2005.

OBERNOSTERER, I.; KRAAY, G.; DE RANITZ, E.; HERNDL, G.J. Concentrations of low molecular weight carboxylic acids and carbonyl compounds in the Aegean Sea (eastern Mediterranean) and the turnover of pyruvate. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 20, p. 147-156, 1999.

OLK, D. C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Organic matter in double – cropped lowland rice soils: chemical and spectroscopical properties. **Soil Science**, v. 164, n. 19, p. 633-649, 1999.

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

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

PATEL-SORRENTINO, N.; MOUNIER, S.; LUCAS, Y.; BENAÏM J.Y. Effects of UV–visible irradiation on natural organic matter from the Amazon basin. **Science of the Total Environment**, v. 321, p. 231, 2004.

PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 337, n. 2, p. 133-149, 1997.

PEURAVUORI, J.; PAASO, N.; PIHLAJA, K. Kinetic study of the thermal degradation of lake aquatic humic matter by thermogravimetric analysis. **Thermochimica Acta**, v. 325, n. 2, p. 181-193, 1999.

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

PICCOLO, A.; STEVENSON, F. J. Infrared spectra of Cu^{+2} , Pb^{+2} and Ca^{+2} complexes of soil humic substances. **Geoderma**, v. 27, p. 195-208, 1982.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. **Chemosphere**, v. 33, p. 595-602, 1996.

PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. **Advances in Environmental Research**, v.3, p.508-521, 2000.

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

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. In: **ADVANCES in Agronomy**. London: Academic Press, 2002. p. 57-134.

POLAK, J.; SULKOWSKI, W. W.; BARTOSZEK, M.; PAPIEZ, W. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic acid extracted from sewage sludge. **Journal of Molecular Structure**, v. 744-747, p. 983-989, 2005.

POOLE, C. P.; FARACH, H. A. **The theory of magnetic resonance**. New York: John Wiley, 1972. 452 p.

PRESTON, C. M.; HEMPLING, R.; SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M.; TROFYMOV, J. A.; AXELSON, D. E. Characterization of organic matter in a forest soil of coastal British Columbia by NMR and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. **Plant and Soil**, v. 158, p. 69-82, 1994a.

PRESTON, C. M. NEWMAN, R. H.; ROTHER, P. Using ^{13}C CPMAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. **Soil Science**, v. 157, p. 26-35, 1994b.

PRESTON, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. **Soil Science**, v. 161, n. 3, p. 144-166, 1996.

QUAY, P. D.; WILBUR, D.; RICHEY, J. E.; DEVOL, A. H.; BENNER, R.; FORSBERG, B. The 18O:16O of dissolved oxygen in rivers and lakes in the Amazon Basin: Determining the ratio of respiration to photosynthesis rates in freshwater. **Limnology and Oceanography**, v. 40, p. 718-729, 1995.

RICHEY, J. E., HEDGES, J. I.; DEVOL, A. H. Biogeochemistry of carbon in the Amazon River. **Limnology and Oceanography**, v. 35, p. 352-371, 1990.

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

RIVERO, C.; SENESI, N.; PAOLINI, J.; D'ORAZIO, V. Characteristics of humic acids of some Venezuelan soils. **Geoderma**, v. 81, p. 227-239, 1998.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI JUNIOR, E.; TOSCANO, I. A. S.; ROSA, A. H.; BURBA, P. Multi-method study on aquatic humic substances from the "Rio Negro"-Amazonas State/Brazil: emphasis on molecular-size classification of their metal contents. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 10, 169-175, 1999.

ROCHA, J. C.; DE SENE, J. J.; SANTOS, A. dos; TOSCANO, I. A. S. ; ZARA, L. F. Aquatic humus from an unpolluted Brazilian dark-brown stream: general characterization and size fractionation of bound heavy metals. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 2, p. 39-44, 2000a.

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

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas**. São Paulo: Editora UNESP, 2003. 120 p.

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

ROTHATGI-MUKHERJEE, K. K. **Fundamentals of Photochemistry**. New Delhi: Willey Eastern, 1992, 347 p.

SANTOS, A. **Distribuição de metais no reservatório de captação de água superficial Anhumas – Américo Brasiliense-SP**. 1999. 152f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

SARGENTINI JUNIOR, E.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; ZARA, L. F.; SANTOS, A. Aquatic humic substances: molecular size fractionation and characterization of inner rearrangements after metal ions complexation. **Química Nova**, v. 24, p. 339-344, 2001.

SCHAUMANN, G. E. Soil organic matter beyond molecular structure Part I: macromolecular and supramolecular characteristics. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 169, p. 145-156, 2006.

SCHMITT KOPPLIN, P.; HERTKORN, N.; SCHULTEN, H. R.; KETTRUP, A. Structural changes in a dissolved soil humic acid during photochemical degradation processes under O₂ and N₂ atmosphere. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 2531–2541, 1998.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Humic substances in the environment**. New York: Marcel Dekker. 1972. p. 192-197.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Humic substances chemistry and reactions**: soil organic matter. London: Elsevier Scientific, 1978, 319p.

SCHNITZER, M.; LÉVESQUE, M. Electron Spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. **Soil Science**, v. 127, p. 140-145, 1979.

SCHNITZER, M.; PRESTON, C. M. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, p. 326-331, 1986.

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

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

SCOTT, M. J.; WOOF, C.; JONES, M. N.; TIPPING, E. Concentrations and fluxes of dissolved organic carbon in drainage water from upland peat system. **Environmental International**, v. 24, p. 537-546, 1998.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N.; WOOF, C.; SIMON, B.; TIPPING, E. The molecular properties of humic substances isolated from a UK upland peat system: a temporal investigation. **Environmental International**, v. 27, p. 449-462, 2001.

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

SENESE, N.; STEELINK, C. Application of ESR spectroscopy to the study of humic substances. In: HAYES, M. H. B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R. L.; SWIFT, R. S. (Eds.). **Humic substances II**: in search of structure. New York: John Wiley, p. 373-407, 1989.

SENESE, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals: Part I. The electron spin resonance approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 51-75, 1990a.

SENESE, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 77-106, 1990b.

SENESE, N.; MIANO, T. M.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by spectroscopy. **Soil Science**, v. 152, n. 4, p. 259-271, 1991.

SENESI, N. Aggregation patterns and macromolecular morphology of humic substances: a fractal approach. **Soil Science**, v. 164, p. 841–856, 1999.

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

SHINDLER, D.W.; JEFERSON-CURTIS, P.; PARKER, B. R.; STANTON, M. P. Consequences of climate warming and lake acidification for UV-B penetration in North American boreal lakes. **Nature**, v. 379, p. 705–708, 1996.

SI, Y.; ZHOU, J.; CHEN, H.; ZHOU, D.; YUE, Y. Effects of humic substances on photodegradation of bensulfuron-methyl on dry soil surfaces. **Chemosphere**, v. 56, p. 967–972, 2004.

SIERRA, M. M. D.; GIOVANELA, M.; PARLANTI, E.; SORIANO SIERRA, E. J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. **Chemosphere**, v. 58, p. 715–733, 2005.

SIMÕES, M. L. **Estudos de interações hidrofóbicas em substâncias húmicas e componentes do solo utilizando análises espectroscópicas**. 2005. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

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

SINGER, L. S. Synthetic ruby as a secondary standard for the measurement of intensities in electron paramagnetic resonance. **Journal Applied Physiology**, v. 30, p. 1463–1464, 1959.

SIMPSON, A. J.; KINGERY, W. L.; SWAW, D. R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 84–88, 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SPARK, K. M., SWIFT, R. S. Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. In: SENESI, N.; MIANO, T. (Ed.). **Humic substances in the global environment and implications on human health**. Amsterdam: Elsevier. 1994. p. 180–198.

SPECHT, C. H.; KUMKE, M. U.; FRIMMEL, F. H. Characterization of natural organic matter adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography. **Water Resources**, v. 34, p. 4063–4069. 2000.

SPOSITO, G.; MARTIN-NETO, L.; YANG, A. Atrazine complexation by soil humic acids. **Journal of Environmental Quality**, v. 25, p. 1203–1209, 1996.

STEELINK, C.; TOLLIN, G.; Biological polymers related to catechol: electron paramagnetic resonance and infrared studies of melanin, tannin, lignin, humic acid and hydroxyquinones. **Biochimica and Biophysics Acta**, v. 112, p. 337–343, 1966.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry**: genesis, composition, reactions. New York: John Wiley, 1994. p. 153-158.

STEWART, A. J.; WETZEL, R.G. Asymmetrical relationship between absorbance, fluorescence, and dissolved organic carbon. **Limnology and Oceanography**, v. 26, p. 590–597, 1981.

STUART, B. **Modern infrared spectroscopy**: analytical chemistry by open learning. New York: John Wiley, 1996. 179 p.

SWIFT, R. S. Molecular weight, size, shape and charge characteristics of humic substances: some basic considerations. In: HAYES, M. H. B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R. L.; SWIFT, R. S. (Eds.). **Humic substances II**: in search of structure. New York: John Wiley, 1989. p. 460-465.

STUBBINS, A.; UHER, G.; LAW, C. S.; MOPPER, K.; ROBINSON, C.; UPSTILL GODDARD R. C. Open-ocean carbon monoxide photoproduction. **Deep-Sea Research II**, v. 53, p. 1695–1705, 2006.

TANAKA, F.; FUKUSHIMA, M.; KIKUCHI, A.; YABUTA, H.; ICHIKAWA H.; TATSUMI, K. Influence of chemical characteristics of humic substances on the partition coefficient of a chlorinated dioxin. **Chemosphere**, v. 58, p. 1319-1326, 2005.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect**: formation of micelles and biological membranes. New York: Wiley, 1980. 126p.

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

THURMAN, E. M. **Organic geochemistry of natural waters**. Ann Arbor: Arbor Science, 1985. 489p.

THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. The humic substances in freshwater. In: CHRISTMAN, R. F.; GJESSING, E. T. (Eds.). **Aquatic and Terrestrial humic materials**. Ann Arbor: Arbor Science, 1995. p. 1.

TIPPING, E.; WOOF, C. Humic substances in acid organic soils-modeling their release to the soil solution in terms of humic charge. **Journal of Soil Science**, v. 41, p. 573-586, 1990.

TIPPING, E.; WOOF, C.; INESON, P.; TAYLOR, K.; BOL, R.; HARKNESS, D. D.; BENHAM, D.; POSKITT, J.; RIGG, E. Climatic influences on the leaching of dissolved organic matter from upland UK moorland soils, investigated by a field manipulation experiment. **Environmental International**, v. 25, p. 83 –95, 1998.

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS) Laboratório de Energia Solar do Grupo de Estudos Térmicos e Energéticos (GESTE) da UFRGS. Disponível em <<http://www.mecanica.ufrgs.br/ftp.htm>> .
Acesso em: 30 abr. 2006.

UYGUNER, C. S.; BEKBOLET, M. A comparative study on the photocatalytic degradation of humic substances of various origins. **Desalination**, v. 76, p. 167-176, 2005.

VÄHÄTALO, A. V.; SALONEN, K.; SALKINOJA SALONEN, M.; HATAKKA, A. Photochemical mineralization of synthetic lignin in lake water indicates enhanced turnover of aromatic organic matter under solar radiation. **Biodegradation**, v. 10, p. 415-420, 1999.

VINCENT, W.F.; RAE, R.; LAURION, I.; HOWARD WILLIAMS, C.; PRISCU, J. C. Transparency of Antarctic ice-covered lakes to solar UV radiation. **Limnology and Oceanography**, v. 43, p. 618-624, 1998.

VINKLER, P.; LAKATOS, B.; MEISEL, J. Infrared spectroscopic investigations of humic substances and their metal complexes. **Geoderma**, v. 15, p. 231-242, 1976.
VISSER, 1983

VISSER, S. A. Seasonal changes in the concentration and colour of humic substances in some aquatic environments. **Freshwater Biology**, v. 14, p. 79-87, 1984.

VODACEK, A. An explanation of the spectral variation in freshwater CDOM fluorescence. **Limnology and Oceanography**, v. 37, p. 1808-1813, 1992.

WATANABE, A.; MCPHAIL, D. B.; MAIE, N.; KAWASAKI S.; ANDERSON, H. A.; CHESHIRE, M. V. Electron spin resonance characteristics of humic acids from a wide range of soil types. **Organic Geochemistry**, v. 36, p. 981-990, 2005.

WETZEL, R. G. **Limnology**. Philadelphia: Saunders, 1983. 767p.

WERSHAW, R. L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 1, p. 29-45, 1986.

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

WILLIAMSON, C. E.; MORRIS, D. P.; PACE, M. L.; OLSON, O. G. Dissolved organic carbon and nutrients as regulators of lake ecosystems: resurrection of a more integrated paradigm, **Limnology and Oceanography**, v. 44, p. 795-803, 1999.

WILSON, D. E. The influence of humic compounds on titrimetric determinations of total organic carbon in freshwater. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 87, p. 379- 84, 1979.

XIE, H.; ZAFIROU, O. C.; CAI, W. J.; ZEPP, R. G.; WANG, Y. Photooxidação and its effects on carboxyl content of dissolved organic matter in two coastal rivers in the southeastern United States. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 4113-4119, 2004.

ZAGARESE, H. E.; DIAZ, M.; PEDROZO, F.; FERRARO, M.; CRAVERO, W.; TARTAROTTI, B. Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 61, p. 35-45, 2001.

ZANARDI LAMARDO, E.; MOORE, C. A.; ZIKA R. G. Seasonal variation in molecular mass and optical properties of chromophoric dissolved organic material in coastal waters of southwest Florida. **Marine Chemistry**, v. 89, p. 37– 54, 2004.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p. 117-161, 1997.

ZEPP, R. G.; CALLAGHAN, T. V.; ERICKSON, D. J. Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 46, p. 69-82, 1998.

ZEPP, R. G.; CALLAGHAN, T. V.; ERICKSON III, D. J. Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. **Photochemical Photobiology Science**, v. 2, p. 51–61, 2003.

ZHANG, Y. J. Complexing of metal ions by humic substances. In: GAFFANEY, J. S.; MARLEY, N. A. (Eds.). **Humic and fulvic acids: isolation, structure and environmental role**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 127-139.

ZSOLNAY, A.; BAIGAR, E.; JIMÉNEZ, M.; STEINWEG, B.; SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**, v.38, p.45-50, 1999.

ZSOLNAY, A. Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions, **Geoderma**, v. 113, p. 187-209, 2003.

ZWOLSMAN, J. J. G.; VAN ECK, B. T. M.; VAN DER WEIJDEN, C. H. Geochemistry of dissolved trace metals (cadmium, copper, zinc) in the Scheldt estuary, southwestern Netherlands: impact of seasonal variability. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 61, p. 1635–1652, 1997.