**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**ESTUDOS DA FORMAÇÃO DE TRIHALOMETANOS A
PARTIR DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS
TRATADAS COM CLORO E DIÓXIDO DE CLORO**

EDUARDA REGINA CARVALHO

Tese apresentada à Área de
Interunidades em Ciências e Engenharia de
Materiais, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para a obtenção do
Título de Doutor em Ciência e Engenharia de
Materiais.

Orientador: Dr. Ladislau Martin Neto

USP/IFSC/SBI

8-2-001538

**São Carlos
2003**

Carvalho, Eduarda Regina

“Estudos da formação de trihalometanos a partir de substâncias húmicas aquáticas tratadas com cloro e dióxido de cloro” / Eduarda Regina Carvalho. – São Carlos, 2003.

Tese (Doutorado) – Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo,

2003 – páginas: 192

Área: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Dr. Ladislau Martin Neto

1. Substâncias húmicas aquáticas; 2. Trihalometanos; 3. Cloro e Dióxido de cloro;
4. Cromatografia 5. Espectroscopia.

1. Título

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE
EDUARDA REGINA CARVALHO APRESENTADA À ÁREA
INTERUNIDADES CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS,
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 26-08-2003.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. Ladislau Martin Neto (Orientador e Presidente) – EMBRAPA

Prof. Dr. Luiz Di Bernardo – EESC/USP

Prof. Dr. Irineu Bianchini Júnior – UFSCar

Prof. Dr. Otacíro Rangel Nascimento – IFSC/USP

Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças – IQSC/USP

*Neste momento, alguém que gostaria de estar conosco está ausente
A lembrança, no entanto, da sua presença e do som da sua voz, sopram
suaves na memória, em um instante cheio de saudades
Se hoje não posso lhe dar um forte abraço como antes, e chorar no seu
ombro a alegria da minha conquista, não me desespero, pois sei que a
sua felicidade em me ver vencendo mais uma etapa, se faz presente.
A morte significa apenas um passo, para a evolução humana e os laços
que nos unem, jamais serão rompidos
Até qualquer dia*

*Ao meu pai **Arlindo** (in memoriam)*

*A minha mãe **Tereza**, pelo amor, exemplo de luta,
honestidade e educação em todos os dias de minha vida*

*À **Silvia e Elaine**, minhas irmãs!*

***Mariana e Isadora** minhas sobrinhas!*

*Ao **Fernando** e ao **Agnaldo**, meus cunhados!*

*Ao **Pedro Henrique** (meu sobrinho que está chegando)*

“Há pessoas que passam pela vida e deixam um pouco de si,

Há outras que passam e levam um pouco de nós

Há também aquelas que não passam, pois simplesmente ficam!”

Ao meu namorado Michel, pelo

amor, apoio e companheirismo

sempre presentes, tornando a vida mais fácil de ser vivida!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ladislau Martin Neto pela orientação e amizade, além do apoio, do incentivo e da confiança, sempre constantes, durante todos esses anos de convivência!

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela acolhida e excelente ambiente de trabalho;

Ao Prof. Dr. Júlio Rocha, da Unesp, Instituto de Química de Araraquara, pelas inúmeras contribuições, durante todo o desenvolvimento do trabalho;

Aos Profs. Dr(s) Luiz Di Bernardo, da USP- Depto de Hidráulica e Saneamento e Fernando Lanças, da USP- Instituto de Química de São Carlos, pela colaboração imprescindível a realização deste trabalho.

A Dra Débora Milori, pela amizade e constantes contribuições das mais variadas;

Em especial ao René e ao Ferrazini da Embrapa Instrumentação Agropecuária, e ao Júlio do Departamento de Hidráulica e Saneamento,/USP, pela amizade e disposição, sempre presentes;

Aos amigos Marcelo, Cristina Lacerda, André Rosa, Adriana, Etelvino, Cibebe e ao Garbin pela amizade e pelo apoio no desenvolvimento de vários experimentos;

Aos amigos Rodrigo, Marta, Marcilene, Denise, Roberto, Lucimara, Mariselma, Elizângela, Marcos Piza, Julieta, Cimélio, Thierry (francês), Nelsinho, Leonardo, Wilson, Pacato, Washington, Pillon e Sérgio Saab pela amizade;

À Beth, Ana, Alessandra e Érita da Embrapa Instrumentação Agropecuária, pela amizade e pelo apoio dado, sempre que necessário;

Aos funcionários da Embrapa e da USP que sempre manteve contato

A Fapesp e a Capes pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviações	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
Capítulo 1 - Substâncias húmicas aquáticas (sha)	
1.1 Introdução	1
1.1.2 - Caracterização das substâncias húmicas aquáticas	9
1.1.3 - Objetivos	10
1.2 - Materiais e métodos	11
1.2.1 Amostra de água	11
1.2.2 Fracionamento das SHA	12
1.2.3 Procedimento para a caracterização das SHA	15
1.2.4 Procedimentos para a caracterização espectroscópica	16
1.3- Resultados e discussões	19
1.3.1 Análise do conteúdo de carbono orgânico dissolvido (COD)	19
1.3.2 Coloração das frações húmicas e análise elementar (C,H,N,S e O)	20
1.3.3 Resultados de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	26
1.3.4 Resultados de ressonância magnética nuclear (RMN)	29
1.3.5 - Resultados de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	33
1.3.6 - Resultados de absorção com luz UV-VISÍVEL	38

1.3.7 - Resultados de fluorescência com luz UV-VISÍVEL.....	44
1.4 – Conclusões	68
Capítulo 2 - Formação de trihalometanos na presença de substâncias húmicas aquáticas, detectados por cromatografia gasosa.....	
2.1 Introdução	72
2.2 - Objetivos	83
2.3 - Materiais e métodos	84
2.4 - Resultados e discussões.....	104
2.4.1 - Variação do tempo de reação e concentração dos desinfectantes.....	104
2.4.2 - Variação do conteúdo de ácidos fúlvicos e pH da solução	110
2.5 Conclusões	118
Capítulo 3 - Mecanismos de reações de sha e trihalometanos determinados por espectroscopia e cromatografia de exclusão por tamanho molecular	
3.1 Influência do cloro e do dióxido de cloro sobre cromóforos e fluoróforos presentes em uma amostra de ácido fúlvico aquático tropical, detectado por fluorescência e absorção com luz UV-Visível.	120
3.2 - Objetivos	122
3.3 - Materiais e métodos	123
3.4 - Resultados e discussões.....	124
3.4.1 - Técnica de fluorescência com luz UV-Visível.....	124
3.4.2 - Técnica de absorção com luz UV-Visível.....	146

3.4.3 Influência da presença de cloro e dióxido de cloro sobre radicais livres presentes em amostras de ácidos fúlvicos aquáticos avaliados por RPE.....	158
I - Materiais e métodos	159
II - Resultados e discussões	160
3.4.4 - Influência da presença de cloro e dióxido de cloro sobre o tamanho molecular de ácidos fúlvicos aquáticos	164
I - Materiais e métodos	166
II - Resultados e discussões	167
3.5 - Conclusões	169
Capítulo 4 - Conclusões gerais e propostas de trabalhos futuros.....	172
Capítulo 5 - Referências	175

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1 - Estrutura hipotética dos ácidos húmicos, proposta por Stevenson (1982).....	6
Figura 1.2 - Estrutura hipotética dos ácidos fúlvicos, proposta por Buffle (1977).....	7
Figura 1.3 - Mapa do Estado de São Paulo, em destaque o local de coleta da amostra de água para extração de substâncias húmicas aquáticas..	12
Figura 1.4 - Amostras de ácidos húmicos e fúlvicos extraídas do Rio João Pereira, Bertioga/SP.....	21
Figura 1.5 - Propriedades químicas das substâncias húmicas Stevenson (1982).	22
Figura 1.6 - Comparação dos valores para as razões C/N, H/C e O/C, obtidas para as amostras de SHA, AF e AH.....	25
Figura 1.7 - Espectros de FTIR obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas e suas frações, AF e AH, extraídas do Rio João Pereira, pH 4.....	26
Figura 1.8 - Comparação dos espectros obtidos por FTIR para as amostras de AF e AH, extraídas do Rio João Pereira, pH 4.....	28
Figura 1.9 - Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS de amostras sólidas de SHA e AF. São indicados os grupos químicos referentes às diferentes bandas. A escala do deslocamento químico foi referenciada para o adamantano a 964 Hz ($\delta\text{-CH}_2 = 38,30$).....	29
Figura 1.10 - Curva de saturação de potência, obtida por RPE, para a amostra de SHA.....	34
Figura 1.11 - Curva de saturação de potência, obtida por RPE, para a amostra de AF.....	34
Figura 1.12 - Curva de saturação de potência, obtida por RPE, para a amostra de AH.....	34

- Figura 1.13 - Espectros de RPE obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA), ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). RL corresponde ao sinal do radical livre. Condições experimentais: medidas feitas à temperatura ambiente, $\nu = 9,74$ GHz e amplitude de modulação = 0,5 G..... 36
- Figura 1.14 - Espectros de RPE mostrando o sinal do radical livre (RL) semiquinona, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas, ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH)..... 36
- Figura 1.15 - Principais cromóforos presentes nas substâncias húmicas.....39
- Figura 1.16 - Espectros de absorção com luz UV-Visível, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA), ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). Condições experimentais: 2 mg de amostra dissolvidos em 10 mL de NaHCO_3 0,05 mol L^{-1} , pH 8.....41
- Figura 1.17 - Correlação entre razão C/N e absorbância a 250 nm, para as amostras de SHA, AF e AH.....43
- Figura 1.18 - Espectros de absorção com luz UV-Visível, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos em diferentes valores de pH. Soluções a 8 mg L^{-1} 43
- Figura 1.19 - Correlação entre a intensidade de fluorescência com a variação da concentração das soluções contendo a amostra de substâncias húmicas aquáticas (SHA) e suas frações ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). Os espectros de emissão foram obtidos com excitação a 320 nm e 450 nm. Soluções a pH 7..... 46
- Figura 1.20 - Ajuste linear da intensidade de fluorescência com a variação da concentração das amostras de AF e AH, pH 7. Em (a) excitação a 320 nm e em (b) excitação a 450 nm..... 47
- Figura 1.21 - Espectros de excitação com emissão a 435 nm (amostras de substâncias húmicas aquáticas e ácidos fúlvicos) e a 450 nm (ácidos húmicos). Condições experimentais: soluções a 8 mg L^{-1} e pH 7..... 48
- Figura 1.22 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos. Condições experimentais: soluções a 8 mg L^{-1} e pH 7.....50
- Figura 1.23 - Espectros de emissão, normalizados pela área, obtidos para as amostras de SHA, AF e AH, concentração, 8 mg L^{-1} , excitação a 320 nm.....53

Figura 1.24 - Espectros de fluorescência obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas, ácidos fúlvicos e húmicos, com excitação a 320 nm. O ajuste da função gaussiana mostra a possível participação de pelo menos quatro compostos envolvidos na formação das bandas.....	55
Figura 1.25 - Espectros de fluorescência no modo de varredura síncrona, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA), ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH), na concentração de 8 mg L ⁻¹ com $\Delta\lambda = 50$ nm, (pH 7).....	60
Figura 1.26 - Espectros de fluorescência no modo excitação, com emissão a 320 nm, obtidos para a amostra de AF, em diferentes valores de pH. Soluções a 8 mg L ⁻¹	62
Figura 1.27 - Espectros de fluorescência no modo emissão, com excitação a 320 nm, obtidos para a amostra de AF, em diferentes valores de pH. Soluções a 8 mg L ⁻¹	62
Figura 1.28 - Espectros de fluorescência obtidos para a amostra de ácidos fúlvico, com excitação a 320 nm, em diferentes valores de pH. O ajuste da função Gaussiana mostra a possível participação de pelo menos quatro compostos envolvidos na formação das bandas. Soluções a 8 mg L ⁻¹	63

Capítulo 2

Figura 2.1 - Etapas a serem realizadas para medir a concentração de dióxido de cloro e cloro, utilizando-se o espectrômetro DR/2010.....	85
Figura 2.2 - Gerador de dióxido de cloro modelo Bello Zon® CDVa.....	86
Figura 2.3 - Etapas realizadas para a determinação da concentração de dióxido de cloro.....	87
Figura 2.4 - Etapas realizadas para a determinação da concentração de cloro...	89
Figura 2.5 - Etapas que consistem o processo analítico na MEFS.....	93
Figura 2.6 - Partes que constituem o sistema de microextração por fase sólida..	93
Figura 2.7 - Processo de imersão da fibra.....	95
Figura 2.8 – Gráfico de calibração de uma solução padrão de clorofórmio.....	100

- Figura 2.9 - Cromatogramas obtidos para uma solução de ácidos fúlvicos contendo cloro e dióxido de cloro e para uma solução, padrão, de clorofórmio. Condições amostra de ácidos fúlvicos a 4 mg L^{-1} e desinfetantes na concentração de 5 mg L^{-1} a pH 7,0, após 24 horas de reação. Amostra padrão a $10 \mu \text{g L}^{-1}$ 104
- Figura 2.10 - Variação do conteúdo de clorofórmio formado, com a variação do tempo de reação. Em (a) amostras de AF na presença de cloro e em (b) amostras de AF na presença de dióxido de cloro. Condições experimentais: soluções de AF a 4 mg L^{-1} , pH 7. Concentração dos desinfetantes: tratamento (1) $2,5 \text{ mg L}^{-1}$; (2) 5 mg L^{-1} ; (3) 10 mg L^{-1} e (4) 20 mg L^{-1}105
- Figura 2.11 - Conteúdo de clorofórmio formado variando-se a concentração dos oxidantes. Em (a) tempo de reação 24 horas e em (b) tempo de reação 168 horas. Amostras de AF a 4 mg L^{-1} e soluções a pH 7..... 107
- Figura 2.12 - Conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação da taxa $[\text{Cl}_2/\text{COD}]$. Amostras de AF a (4 mg L^{-1}) e desinfetantes a (5 mg L^{-1}). Tempo de reação em (a) 24 horas e em (b) 168 horas, soluções a pH 7,0..... 108
- Figura 2.13 - Conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação da taxa $[\text{ClO}_2/\text{COD}]$. Amostras de AF a (4 mg L^{-1}) e desinfetantes a 5 mg L^{-1} . Tempo de reação em (a) 24 horas e em (b) 168 horas, soluções a pH 7..... 109
- Figura 2.14 - Conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação do pH da solução. Condições experimentais: amostras de AF a 4 mg L^{-1} e oxidantes a 5 mg L^{-1} . Tempo de reação: 24 h..... 110
- Figura 2.15 - Gráfico mostrando o conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação da concentração dos AF. Condições experimentais: dose dos desinfetantes a 5 mg L^{-1} , tempo de reação de 24 horas e soluções a pH 7,0..... 110
- Figura 2.16 - Estrutura do tipo resorcinol, considerada como capaz de formar o clorofórmio, a partir da reação do cloro com ácidos fúlvicos.....113
- Figura 2.17 - Mecanismo de formação do clorofórmio, a partir da estrutura do tipo resorcinol.....115
- Figura 2.18 - Mecanismos de interação do dióxido de cloro com compostos orgânicos.....117

Capítulo 3

- Figura 3.1 Espectros de emissão com excitação a 320 nm, obtidos para amostras de AF (soluções a 8 mg L⁻¹ e pH 7,0), na presença de diferentes concentrações dos desinfetantes (2,5 mg L⁻¹, 5,0 mg L⁻¹, 10,0 mg L⁻¹ e 20,0 mg L⁻¹, tratamentos 1,2,3 e 4 respectivamente), após 24 horas de reação. Em (a) ácidos fúlvicos com cloro e em (b) ácidos fúlvicos com dióxido de cloro..... 125
- Figura 3.2 - Gráficos mostrando os espectros de emissão, normalizados para uma mesma intensidade máxima, obtidos para as amostras de AF (concentração 8 mg L⁻¹ a pH 7,0) e as reações 1,2,3 e 4, após 24 horas, (excitação a 320 nm)..... 126
- Figura 3.3 - Espectros de fluorescência obtidos para a amostra de ácidos fúlvicos, na presença de cloro e dióxido de cloro (tratamentos 1 e 4) com excitação a 320 nm. O ajuste da função gaussiana mostra a possível participação de pelo menos quatro compostos envolvidos na formação da banda principal e a influência da presença dos oxidantes. Tempo de reação 24 h..... 127
- Figura 3.4 - Efeito da razão molar [Cl₂ / COD], sobre a intensidade de fluorescência para as amostras de AF, pós 24 horas de reação. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro..... 133
- Figura 3.5 - Efeito da razão molar [oxidante] / [COD], sobre a absorbância a 320 nm, para as amostras de AF após 24 horas de reação em pH 7. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro..... 133
- Figura 3.6 - Variação da área de fluorescência em função do tempo de reação, obtida para a amostra de AF (concentração de 8 mg L⁻¹), soluções em pH 7. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro. Excitação a 320 nm..... 134
- Figura 3.7 - Efeito da variação do tempo de reação sobre a absorbância a 320 nm, para as amostras de AF, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro, soluções a pH 7.0..... 136
- Figura 3.8 - Espectros da intensidade de emissão de fluorescência, com excitação a 320 nm, obtidos para o tratamento 4 (AF 8 mg L⁻¹) e (oxidantes 20 mg L⁻¹) em diferentes intervalos de tempo de reação. Em (a) ácidos fúlvicos na presença de cloro, (b) ácidos fúlvicos na presença de dióxido de cloro, soluções a pH 7.0..... 137

- Figura 3.9 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e o espectro da diferença, obtido para soluções de AF na presença de 20 mg L⁻¹ de cloro após 24 horas do início da reação. Soluções na concentração de 8 mg L⁻¹ de AF a pH 7,0..... 140
- Figura 3.10 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e o espectro da diferença, obtido para soluções de AF na presença de 20 mg L⁻¹ de dióxido de cloro após 24 horas do início da reação. Soluções na concentração de 8 mg L⁻¹ de AF a pH 7,0..... 140
- Figura 3.11 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e espectro da diferença, obtido para soluções de AF (8 mgL⁻¹), na presença de cloro (20 mg L⁻¹) pH 7.0. 141
- Figura 3.12 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e espectro da diferença, obtido para soluções de AF (8 mg L⁻¹) na presença de dióxido de cloro (20 mg L⁻¹) pH 7.0..... 141
- Figura 3.13 - Variação na extensão do “quenching” de fluorescência do AF por cloro e dióxido de cloro variando-se a concentração dos desinfetantes. Soluções de AF na concentração de 8 mg L⁻¹, pH 7,0. 143
- Figura 3.14 - Variação na extensão do “quenching” da área sob a curva fluorescente obtida para os diferentes tratamentos, para as soluções de AF na presença dos oxidantes. Soluções de AF na concentração de 8 mg L⁻¹ em pH 7..... 144
- Figura 3.15 – Variação do “quenching” na intensidade de fluorescência de AF por cloro e dióxido de cloro. Condições: AF na concentração de (8 mg L⁻¹), soluções a pH 7.0..... 146
- Figura 3.16 - Espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF na presença de cloro. Condições: soluções na concentração de 8 mg L⁻¹ a pH 7,0, após 24 horas do início da reação. 147
- Figura 3.17 - Gráfico mostrando os espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF na presença de dióxido de cloro. Condições: soluções na concentração de 8 mg L⁻¹ a pH 7,0, após 24 horas do início da reação. 147
- Figura 3.18 - Gráfico mostrando os espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF, na presença de cloro após 24, 72 e 96 horas de reação, soluções a 8 mg L⁻¹ e pH 7..... 148

- Figura 3.19 - Gráfico mostrando os espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF, na presença de dióxido de cloro, após 24, 72 e 96 horas de reação, soluções a 8 mg L^{-1} e pH 7,0..... 148
- Figura 3.20- Espectros de absorção diferencial, obtidos para a amostra de AF, na presença de cloro. Condições: soluções com 8 mg L^{-1} de AF, pH 7, 0 e após 24 horas de reação..... 151
- Figura 3.21 - Espectros de absorção diferencial, obtidos para a amostra de AF, na presença de dióxido de cloro. Condições: soluções com 8 mg L^{-1} de AF, pH 7, 0 e após 24 horas de reação..... 151
- Figura 3.22 - Gráficos mostrando a correlação entre o conteúdo de clorofórmio formado e absorbância a 254 nm. Em amostras (a) contendo cloro (b) contendo dióxido de cloro. Concentração de AF, 4 mg L^{-1} , soluções a pH 7, 0..... 157
- Figura 3.23 - Gráficos mostrando a correlação entre o conteúdo de clorofórmio formado e absorbância a 272 nm. Em amostras (a) contendo cloro (b) contendo dióxido de cloro. Concentração de AF, 4 mg L^{-1} , soluções a pH 7, 0..... 157
- Figura 3.24 - Esquema da estabilização do radical livre semiquinona (Schnitzer, 1990)..... 159
- Figura 3.25 - Espectros obtidos por RPE mostrando o sinal do radical livre semiquinona, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos em diferentes pH. Em a) AF na ausência dos desinfetantes, b) AF + Cloro e c) AF + Dióxido de cloro. Condições experimentais: medidas feitas à temperatura ambiente, $\nu = 9,74 \text{ GHz}$ e amplitude de modulação igual a 0,5 G e potência de 0,2 mW..... 161
- Figura 3.26 - Microfotografia de um grânulo de vidro de porosidade controlada, o diâmetro médio dos poros mostrado é de 300 nm..... 165
- Figura 3.27 - Cromatogramas de uma amostra de ácidos fúlvicos tratada com: (a) cloro; (b) dióxido de cloro. Corridas realizadas de 15 em 15 minutos ($t_0 = 5 \text{ min}$ após o tratamento; $t_1 = 20 \text{ min}$ e assim sucessivamente em intervalos de 15 min)..... 168

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.I - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência	19
Tabela 1.II - Valores dos conteúdos de carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico (CI), obtido para as amostras de SHA, AF e AH, extraídas da água do Rio João Pereira.....	20
Tabela 1.III - Valores percentuais da composição elementar e teores de cinzas em %, obtidos para as amostras de SHA, AF , AH e alguns valores da literatura.....	23
Tabela 1.IV - Valores da absorbância a 1620 cm^{-1} e razão $1725/1620$ obtidos por FTIR, para as amostras de substâncias húmicas aquáticas e suas frações, ácidos húmico e fúlvico.....	28
Tabela 1.V - Intensidades relativas (% da área total) das bandas nos espectros de RMN e ^{13}C CP/MAS de amostras sólidas de SHA e AF.....	31
Tabela 1.VI - Valores da absorbância a 1620 cm^{-1} e $1725/1620\text{ cm}^{-1}$ razão obtidos por FTIR, para as amostras de substâncias húmicas aquáticas e suas frações, ácidos húmico e fúlvico.....	32
Tabela 1.VII - Quantidade de radicais livres (em spins/g de carbono), valores da largura de linha (ΔH) e fator-g obtidos para as amostras de SHA, AF e AH, a partir do sinal de radical livre semiquinona.....	37
Tabela 1.VIII - Valores da razão E_2/E_3 obtidos para as amostras de SHA, AF e AH.....	41
Tabela 1.IX - Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nas SHA, AF e AH.....	56
Tabela 1.X - Comprimentos de onda em nm de emissão de fluorescência máxima de alguns compostos puros, contribuidores em potencial, como componentes moleculares para a fluorescência dos AF.....	58
Tabela 1.XI - Correlação entre índice de humificação ($400/360$ e $470/360$) e parâmetros obtidos por análise elementar para as amostras de AH, SHA e AF.....	61

Tabela 1.XII - Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nos AF, em diferentes valores de pH, obtidos dos espectros no modo de emissão, com l dado em número de onda.....	64
---	----

Capítulo 2

Tabela 2.I - Limite de detecção e quantificação.....	102
Tabela 2.II - Conteúdo de COD obtido para os diferentes tratamentos, na presença dos oxidantes, após 24 horas e 168 horas de reação. Soluções a pH 7 e AF na concentração de 4 mg L ⁻¹	108

Capítulo 3

Tabela 3.I - Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nos AF, e a influência da presença dos oxidantes sobre as gaussianas secundárias após 24 horas de reação, obtidos para o tratamento 1, dos espectros no modo de emissão, com l dado em número de onda.....	128
Tabela 3.II - Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nos AF, na presença de cloro e dióxido de cloro, após 24 horas de reação, obtidos para o tratamento 4, dos espectros no modo de emissão, com l dado em número de onda.....	129
Tabela 3.III - Porcentagens do decréscimo da área das gaussianas 1, 2, 3, e 4, na presença dos oxidantes, para os tratamentos 1 e 4, após 24 horas de reação.....	130
Tabela 3.IV - Valores para A ₁ , A ₂ , t ₁ e t ₂ obtidos para as exponenciais que refletem o decaimento da área sob a curva fluorescente, na presença de diferentes concentrações de cloro.....	135

Tabela 3.V - Valores das absorbâncias a 254 nm e 272 nm, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos na presença de cloro e dióxido de cloro, após 24 horas de reação..... 153

Tabela 3. VI - Valores das absorbâncias diferenciais $-\Delta A_{254}$ e $-\Delta A_{272}$, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos na presença de cloro e dióxido de cloro, após 24 horas de reação..... 153

Tabela 3.VII - Quantidade de radicais livres (em spins/g de carbono) e valores da largura de linha (ΔH) obtidos para as amostras de AF, em diferentes valores de pH, na presença de cloro e dióxido de cloro..... 162

LISTA DE ABREVIATURAS

Capítulo 1

MON	matéria orgânica natural
SH	substâncias húmicas
COD	carbono orgânico dissolvido
SHA	substâncias húmicas aquáticas
THM	trihalometanos
AH	ácidos húmicos
AF	ácidos fúlvicos
RMN	ressonância magnética nuclear
RPE	ressonância paramagnética eletrônica
ETE	estação de tratamento de esgoto

Capítulo 2

ETA	estação de tratamento de água
DCIS	dicloroisocianurato de sódio
DPD	(N,N-dietil-p-fenil-fenileno-diamina)
MEFS	micro extração em fase sólida
PDMS	polidimetilsiloxano
PA	poliacrilato
DCE	detector de captura de elétrons

Capítulo 3

PHA	poli-hidroxi-aromáticos
HAA	ácidos haloacéticos

RESUMO

Este trabalho teve por finalidade, em um primeiro estágio, avaliar as características e propriedades estruturais das substâncias húmicas aquáticas, extraídas de um manancial de área tropical, incluindo avaliações e comparações de suas frações húmica e fúlvica, com a utilização de técnicas espectroscópicas como RPE, RMN, IV, Fluorescência e absorbância de luz UV-Visível, além da aplicação de técnicas cromatográficas. A base para o entendimento sobre essas matrizes foi possível, obtendo informações quanto ao grau de humificação e condensação, composição elementar e estrutural. Os resultados obtidos, reforçam a importância, de utilizar-se diversas técnicas independentes, para o estudo de materiais tão complexos e heterogêneos como as substâncias húmicas e demonstram as potencialidades destas (técnicas) no estudo da estrutura e reatividade dessas substâncias e suas interações. Na etapa seguinte, avaliou-se a influência de oxidantes de água, como o cloro e o dióxido de cloro, na formação de subprodutos com potencial carcinogênico, como os trihalometanos (no caso o clorofórmio), os quais são gerados após a oxidação da matéria orgânica aquática, por oxidantes de água, visando o monitoramento da formação desse subproduto sob condições brasileiras. Observou-se um pico de máxima formação, para este trihalometano, após um período de 24 horas de reação, para ambos oxidantes. Este resultado sugere cuidados operacionais em sistemas de abastecimento de água, quando esta for distribuída a população. Após 24 horas de reação a formação do clorofórmio, em amostras com dióxido de cloro, foi em torno de 60 vezes menor, quando comparado às amostras com cloro, para uma concentração dos oxidantes de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Mostrou-se que o aumento da formação do clorofórmio, também ocorre para amostras a maiores valores de pH e concentração de matéria orgânica. Quando se variou a concentração dos ácidos fúlvicos nas amostras, a formação do clorofórmio foi de aproximadamente $9 \mu\text{g L}^{-1}$, para a amostra com maior concentração da matéria orgânica e na presença de cloro. Para a amostra com dióxido de cloro, essa formação foi de $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos nesta fase mostraram que o dióxido de cloro é mais eficiente quando comparado ao cloro, quanto ao poder de oxidação da matéria orgânica e principalmente na redução da formação do clorofórmio (uma redução de mais de 98%) após reação com a fração fúlvica. Os experimentos, contribuíram para um melhor entendimento sobre as características das substâncias húmicas aquáticas na presença e ausência de alternativas oxidantes, e as informações obtidas, fornecem algumas opções operacionais que poderão contribuir, para o desenvolvimento de novos processos ou ajustes nos procedimentos do tratamento da água para consumo humano. Após esta etapa do trabalho foram utilizadas as técnicas espectroscópicas mencionadas acima, para avaliar as propriedades e características estruturais da fração fúlvica extraída de um manancial de área tropical, na presença dos oxidantes. Os resultados geraram dados inéditos e coerentes entre si, sobre alterações estruturais nos ácidos fúlvicos aquáticos, na presença desses oxidantes, mostrando de forma inequívoca o envolvimento de grupos aromáticos condensados nas reações com os dois oxidantes.

ABSTRACT

The aim of this work, at a first stage, was to evaluate the characteristics and structural properties of aquatic humic substances extracted of an aquatic environment of a tropical area. Also, the evaluation and comparison of humic and fulvic fractions were performed throughout spectroscopic techniques as EPR, NMR, FTIR, fluorescence and absorbance with UV-Visible light and using chromatographic techniques. The base for the understanding of these matrixes was possible through informations such as humification and condensation degree as well as elemental and structural composition. The results, obtained in this work, reinforce the importance to use several independent techniques to study complex and heterogeneous materials as humic substances and the potentiality of these techniques to generate data about the structure, reactivity and interactions of these substances. After this stage of the work, it was evaluated the influence of water oxidants (chlorine and chlorine dioxide) in the formation of subproducts with carcinogenic potential as the trihalomethanes (in this case the chloroform), which are generated after the oxidation of aquatic organic material by water oxidants. The formation of these subproducts was minimized under our tropical climatic conditions, and it was observed a peak of maximal formation after 24 hours of reaction, for both oxidants. This result indicates that operational cares should be taken, in water supply systems, when the water is distributed for the population. After 24 hours of reaction, the chloroform formation, in samples with chlorine dioxide was around 60 times smaller than in the samples containing chlorine, for a oxidants concentration of $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Also, it was observed an increase of the chloroform formation for samples with the highest values of pH and organic matter concentration. When the fulvic acid concentration was changed, the chloroform formation was approximately $9 \mu\text{g L}^{-1}$ for the sample with the highest organic matter concentration and containing chlorine. In the case of the sample with chlorine dioxide, this formation was $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$. The results obtained in the final fase, showed that the chlorine dioxide is more efficient to oxidize the organic matter than the chlorine and mainly in the reduction of chloroform formation (a reduction higher than 98%) after the reaction with the fulvic fraction. These experiments contributed for a better understanding about aquatic humic substances characteristics in the presence and absence of alternatives oxidants. The informations obtained in this work provide operational options, which will contribute for the development of new process or to adjust the water treatment proceduces for human consumption. Also, the previously mentioned spectroscopic techniques were used to evaluate the properties and structural characteristics of the fulvic fraction extracted of a tropical area source. Results generated news and coherent data about structural alterations in fulvic acid samples containing oxidants, showing clearly the influence of the condensed aromatic moieties in reactions with both oxidants.

SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS (SHA)

1.1- Introdução

A matéria orgânica natural (MON) presente nos solos, sedimentos e turfas, é constituída por uma mistura de produtos em vários estágios de decomposição, os quais são resultantes da degradação química e biológica de resíduos vegetais, animais e da atividade microbiana (Stevenson, 1982).

Essa matéria pode ser dividida em substâncias húmicas e não húmicas. As substâncias não húmicas são de natureza definida, como por exemplo aminoácidos, carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos. As substâncias húmicas (SH) são de natureza complexa, pouco conhecida e com estrutura química não definida, formando assim, um grupo de compostos heterogêneos (Stevenson, 1982).

A maior parte do carbono orgânico refratário em ambientes aquáticos (cerca de 80% do total da matéria orgânica presente e ainda não caracterizada totalmente), está na forma de substâncias húmicas aquáticas (Reuter et al., 1997). Estas, por sua vez, são formadas durante a decomposição microbiológica da biomassa em águas e solos (Burba et al., 2000; Rocha et al., 2000).

A fração dissolvida do material húmico em sistemas aquáticos é constituída por moléculas orgânicas refratárias as quais desempenham importante papel no meio aquoso, o qual está relacionado ao transporte de muitos compostos tóxicos, orgânicos

e inorgânicos, e no ciclo dos nutrientes (Lehtonen et al., 2000). O termo "refratário", geralmente indica uma biodegradabilidade relativamente baixa (Frimmel, 2000).

A primeira tentativa para se isolar as substâncias húmicas do solo foi realizada por Achard (1786), quando submeteu turfas a solventes alcalinos e obteve uma solução escura que precipitava por acidificação. Esse material, solúvel em alcali e insolúvel em ácido, foi denominado ácido húmico (AH), cuja denominação operacional se mantém até hoje, tanto para substâncias húmicas extraídas do solo como do ambiente aquático.

O termo húmus tem sido extensivamente utilizado e foi introduzido por De Saussure em 1804, (do latim, equivalente ao solo) para descrever o material orgânico originado do solo, de coloração escura. Esse material passou então a ser denominado de substâncias húmicas.

Devido ao fato do húmus do solo ser capaz de reter água, nutrientes, e influenciar no crescimento das culturas, seu estudo foi mais popular que estudos sobre substâncias húmicas aquáticas (SHA). Até 1906, são praticamente inexistentes dados na literatura sobre essas substâncias no meio aquático. A presença das SH em águas foi aceita quando começaram os estudos sobre a origem da coloração de determinados tipos de águas. Desde então, tornou-se aceito a presença unívoca dessas substâncias em águas, despertando-se um grande interesse sobre sua estrutura química e seu papel em sistemas aquáticos. Este último tornou-se objeto de vários estudos, incluindo estudos com as mais diversas aplicações técnicas (Thurman, 1985; Frimmel, 1988; Frimmel, 2000).

As substâncias húmicas existem em quase todos os sítios terrestres e aquáticos, constituindo um dos principais componentes da matéria orgânica de solos e sedimentos. Elas são muito resistentes à degradação, pois o tempo de existência pode

levar séculos ou até milênios. São várias as teorias sobre a formação das SH. A chamada teoria clássica (Waksman, 1936) propõe que as SH sejam ligninas modificadas, mas, a maioria dos pesquisadores acredita em um mecanismo relacionado com a formação de quinonas.

A formação do húmus em águas está diretamente relacionada com a origem da molécula húmica, ou melhor, com o ambiente aquático. Dessa forma, o tipo de água (rios, lagos ou mar) e as estações do ano são fatores determinantes na formação e processos de humificação. A concentração de carbono orgânico dissolvido varia de acordo com a profundidade do lago, apresentando tendência ao aumento em relação ao estado trófico do ambiente (Thurman, 1985).

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

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

Dessa forma, as principais fontes de matéria orgânica nos ecossistemas aquáticos, podem ser representadas pela biomassa viva e pela matéria orgânica detrital. Segundo Wetzel (1983), detrito pode ser definido como a perda não predatória de carbono orgânico proveniente de qualquer nível trófico (incluindo gestão, excreção, secreção etc) ou como sendo a entrada de carbono orgânico a partir de fontes externas ao ecossistema. Este resíduo pode ser encontrado nas formas particulado e dissolvido.

A definição entre material orgânico dissolvido e particulado é puramente operacional. Considera-se como carbono orgânico dissolvido (COD) a fração que passa através de membrana de 0,45µm (Danielsson, 1982). As transformações bioquímicas da matéria orgânica detrital dissolvida e particulada, que ocorrem através do metabolismo microbiano, são fundamentais para a dinâmica dos ciclos dos nutrientes e do fluxo de energia nos ecossistemas aquáticos (Wetzel, 1983; Munster & Chróst, 1990).

Thurman & Malcolm (1981) baseados em métodos cromatográficos de extração, definiram substâncias húmicas aquáticas (SHA) como a porção não específica, amorfa, constituída de carbono orgânico dissolvido (COD) em pH 2,0 e adsorvida em coluna de resina XAD-8 com altos valores de coeficiente de distribuição.

Vários estudos têm priorizado a caracterização das propriedades estruturais das SHA (Artinger et al., 1999; Zsolnay et al., 1999; Chen et al., 2002). Sabe-se por exemplo que as SH possuem características químicas, e participam de reações relevantes, como das interações com desinfetantes de água tais como cloro e dióxido de cloro. O estudo dessas interações intensificou-se devido que, em águas naturais, o material orgânico é o principal precursor na formação de compostos

organoclorados (quando o cloro livre é utilizado) os quais apresentam propriedades carcinogênicas, tais como os trihalometanos, THMs (Chen et al., 2002; Deok-Hee et al., 2003).

➤ Entretanto, o conhecimento da existência dessas interações, sua natureza e extensão não são completamente entendidas, devido à ausência de resultados satisfatórios sobre as SH, especialmente sobre sua estrutura, complexidade, dificuldades em se relacionar os dados obtidos, ou ainda, pelo uso de condições que resultaram em alterações do material (Stevenson, 1994). Para avaliar a importância dessas interações em águas naturais devem ser obtidas informações quanto à abundância, natureza molecular e interações com os elementos (Reuter et al., 1997).

Sabe-se, por exemplo, que os ácidos húmicos (AH) e os ácidos fúlvicos (AF) são as frações das SHA que podem participar de reações indesejáveis, constituindo os maiores precursores na formação dos THM(s).

As SHA são constituídas por essas frações húmicas e fúlvicas. Os AH representam a fração das SH, solúvel em meio alcalino diluído, a qual precipita pela acidificação do extrato alcalino. Os AF permanecem em solução quando o extrato alcalino é acidificado (Thurman & Malcolm, 1981).

As diferenças entre AH e AF podem ser explicadas por variações no peso molecular, número de grupos funcionais (carboxílicos, fenólicos, etc.) e extensão da polimerização. Os AH, de alto peso molecular, possuem mais carbono em sua composição, porém apresenta menor concentração de oxigênio em relação aos ácidos fúlvicos.

Uma diferença importante entre essas frações é que nos ácidos fúlvicos, o oxigênio pode ser considerado como parte integrante dos grupos funcionais conhecidos (como por exemplo -COOH, -C=O, -OH). Nos ácidos húmicos,

entretanto, uma parte do oxigênio parece ser uma componente estrutural do esqueleto aromático, formando pontes entre os anéis aromáticos ou estando inseridos neles (Stevenson, 1982). Estes ácidos de coloração escura, tanto alifáticos quanto aromáticos, são quimicamente complexos e hidrofílicos, (Mccarthy et al., 1990; Martin Neto et al., 1998).

As figuras 1.1 e 1.2 apresentam a estrutura hipotética para os AH e AF, respectivamente. Na estrutura apresentada para os AH, observam-se moléculas aromáticas complexas, com açúcares, peptídeos, aminoácidos e compostos alifáticos ligados entre os grupos aromáticos. Na estrutura dos AF, notam-se estruturas aromáticas e alifáticas, substituídas com grupos funcionais contendo oxigênio (Buffle, 1977).

Figura 1.1 - Estrutura hipotética dos ácidos húmicos, proposta por Stevenson (1982).

Figura 1.2 - Estrutura hipotética dos ácidos fúlvicos, proposta por Buffle (1977).

A estrutura das SHA é de alta complexidade e depende fortemente das condições pelas quais a matéria orgânica desenvolve o processo de humificação. A reatividade entre as substâncias húmicas e poluentes ou demais compostos orgânicos é dependente da estrutura molecular deste material, sendo portanto, fundamentais estudos que possibilitem um melhor entendimento sobre a sua composição.

Sabe-se que a estrutura das substâncias húmicas é modulada por fatores como pH, força iônica, concentração em solução entre outros. Sua estrutura policondensada é derivada de seus compostos de origem, como por exemplo, ligninas, taninos, proteínas, ácidos graxos, carboidratos e outras substâncias orgânicas e inorgânicas (Cruzes, 1996).

Até recentemente, o modelo dominante referente à estrutura das SH era de polímeros macromoleculares (Schulten et al., 1993; Stevenson, 1994). Neste modelo, mudanças conformacionais tomam lugar, como é o caso de macromoléculas biológicas tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e ligninas (Cantor et al., 1980; Swift, 1989). Schinitzer e Khan (1972) e mais recentemente Schulten e

Schnitzer (1995) propuseram a existência de vazios na estrutura das SH, os quais podem constituir-se em excelentes sítios de sorção para pesticidas não polares.

Entretanto, Wershaw (1986) foi o primeiro a postular uma descrição alternativa para a estrutura macromolecular das SH. Ele (Wershaw 1993) propôs que as SH, em solução, formariam agregados mistos de moléculas anfifílicas provenientes de produtos da degradação de plantas e complexos de ligninas-carboidratos. Segundo seu trabalho, os agregados húmicos interagem por mecanismos que envolvem ligações fracas como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Também, considerando o conceito de micelas Tanford (1980), sugeriu que agregados húmicos seriam similares a agregados micelares, sendo seus interiores compostos por porções hidrofóbicas enquanto que componentes altamente carregados estariam posicionados nas superfícies externas desses agregados. A questão, referente a se estes domínios “pseudomicelar” são formados intramolecularmente ou inter-molecularmente, permanecem não resolvidos, mas mantendo o modelo do detergente, as pseudomicelas teriam um interior hidrofóbico para os quais compostos não polares podem particionar. Piccolo et al., (1996a, 1996b) e Kenworthy & Hayes (1997) foram os primeiros a mostrar evidências diretas que a estrutura macromolecular das SH poderia não ser totalmente polimérica.

O grande tamanho molecular, freqüentemente observado nas SH, poderia ser considerado como resultado da associação de moléculas menores por forças de interação fracas, como forças de van-der-Waals e ligações hidrofóbicas (Piccolo & Conte, 2000). A ocorrência da ligação hidrofóbica está associada com as variações conformacionais das SH e essas variações dependem de alguns parâmetros como pH, força iônica, temperatura, concentração das SH entre outros (Piccolo et al., 1998; Piccolo & Conte, 2000; Martin Neto et al., 2000).

A relevância e a consequência de ter um modelo definitivo para as SH são extremamente óbvias. Apesar de todos os modelos propostos até o presente, há um consenso sobre a existência de sítios hidrofóbicos que seriam excelentes sítios de sorção como por exemplo para compostos não polares tais como pesticidas e outros xenobióticos orgânicos.

Devido à heterogeneidade das SHA, há portanto, a necessidade de estudos mais detalhados sobre sua estrutura e propriedades funcionais, o que possibilitaria um melhor entendimento quanto aos mecanismos responsáveis pela complexação, redução, mobilização ou imobilização de metais pesados, pesticidas e outros compostos tóxicos (Chen et al., 2002).

O interesse pelas SHA deve-se portanto, à importância delas nos ecossistemas aquáticos naturais, em razão da multiplicidade de sítios ligantes contendo oxigênio como por exemplo: carboxilas, carbonilas, hidroxilas fenólicas e alcoólicas (Thurman, 1985). A presença de vários grupos funcionais, permite o uso de várias técnicas para obter informações a respeito da funcionalidade e mecanismos de reação das SH no ambiente.

1.1.2 - Caracterização das substâncias húmicas aquáticas

Técnicas espectroscópicas tais como ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), absorção de luz no ultravioleta-visível (UV/Vis) e fluorescência de luz (UV/Vis), têm sido aplicadas para análises qualitativa e quantitativa da matéria orgânica natural (Senesi et al., 1989 e 1991; Martin Neto et al., 2001; Ferreira et al., 2001; Bayer et al., 2002; Milori et al., 2002; Chen et al., 2003). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C), por exemplo, possui um enorme potencial para o entendimento da estrutura e

reatividade das SH (Schnitzer & Kahn, 1978; Malcolm, 1989). As técnicas de absorção e fluorescência, de luz no UV-Visível, possibilitam a obtenção de informações acerca da natureza, estrutura, funcionalidades das SHA e sobre processos de humificação (Bernardes et al., 1996).

Segundo Schnitzer & Khan (1972) para obter progressos significativos, no conhecimento da química das substâncias húmicas, é necessária a aplicação combinada de uma variedade de técnicas químicas e espectroscópicas. Quando são comparados os resultados obtidos para amostras extraídas de diferentes localidades, ocorrem variações nos espectros das SH com as diversas técnicas. Isso torna a identificação e interpretação dos resultados, particularmente difíceis (Chen et al., 2002).

Métodos analíticos para a caracterização das substâncias húmicas, tais como técnicas espectroscópicas não destrutivas, têm sido extensivamente utilizadas, uma vez que amostras sólidas e líquidas são diretamente utilizadas nas análises (Chen et al., 2002). Estes métodos apresentam vantagens muito atrativas, das quais destacam-se: a) são não destrutivos; b) somente pequenas quantidades de amostras são requeridas; c) são experimentalmente simples e não requerem manipulações especiais na preparação das amostras (talvez esta seja a mais importante) e d) fornecem informações sobre estrutura molecular e química, ou sobre propriedades funcionais da matéria orgânica natural (Stevenson, 1994).

1.1.3 - Objetivos

Considerando a complexidade e heterogeneidade das SHA, o objetivo neste primeiro estágio do trabalho foi fracionar as SHA (extraídas de um manancial de área

tropical) para então caracteriza-las, determinando assim, as propriedades de seus constituintes húmicos após o fracionamento.

Também, caracterizar sistematicamente as propriedades estrutural e funcional, pela combinação de técnicas espectroscópicas incluindo ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), absorção e fluorescência de luz no UV-Visível.

1.2 - Materiais e métodos

1.2.1 Amostra de água

As substâncias húmicas aquáticas foram extraídas de uma amostra de água, coletada no Rio João Pereira. Este rio é um afluente do Rio Itapanhaú, localizado no sentido jusante-montante deste. O Rio Itapanhaú está localizado em uma área de proteção ambiental próximo a cidade de Bertioga/SP (figura 1.3), na região sul do litoral do Estado de São Paulo.

O Rio João Pereira apresenta uma água de coloração escura com alto teor de matéria orgânica aquática, facilitando dessa forma, sua obtenção e extração para posteriores reações em laboratório, com cloro e dióxido de cloro. Este rio é utilizado para lançamento de esgoto tratado, da estação de tratamento de esgoto (ETE) do loteamento Riviera de São Lourenço, a cerca de 4,5 Km da serra do Mar.

A situação geomorfológica da região, onde está localizado o Rio João Pereira, permitiu o desenvolvimento de diferentes formações e associações vegetais, sobretudo, aquelas pertencentes ao complexo da restinga e manguezais, até a típica floresta pluvial de proximidades e encosta Atlântica. A caracterização da vegetação da região é a de uma planície costeira litorânea, coberta por florestas de restinga e

mata atlântica, desenvolvendo assim, uma ampla variedade de subtipos numa mesma área, devido à heterogeneidade hidrográfica, topográfica e microclimática da região (Nunes et al., 2002).

Figura 1.3 – Localização do Estado de São Paulo e em destaque o local de coleta da amostra de água para extração de substâncias húmicas aquáticas.

1.2.2 Fracionamento das SHA

As SHA foram extraídas da amostra de água com a utilização de resinas, seguido de fracionamento químico, para a obtenção das frações húmicas e fúlvicas. O fracionamento das SHA oferece vantagens pela seletividade ao separar um grupo de compostos orgânicos (ou um subcomponente) de outros, com base em suas propriedades físico-químicas.

A extração e o fracionamento, das frações húmicas e fúlvicas, foram feitos de acordo com o procedimento esquematizado no diagrama-1, seguindo uma

metodologia já bem estabelecida na literatura “*International Humic Substances Society*” – IHSS, Malcolm & Thurman (1995).

Para o isolamento das SHA, cerca de 50 litros de água superficial do Rio João Pereira foram coletados. Antes da extração, a água coletada foi filtrada em sistema de filtração a vácuo, utilizando-se papel qualitativo para a remoção de sólidos e partículas suspensas, evitando desta maneira, obstruções no sistema extrator. Posteriormente, a amostra foi acidificada com solução de ácido clorídrico concentrado até pH 2. A amostra de água acidificada foi passada por gravidade, a uma vazão de 4 mLmin^{-1} , através de colunas de vidro dispostas em série e empacotadas com resinas adsorventes XAD-8 (Serva Feinbiochemica). Estas resinas, utilizadas para a isolação das SHA, foram purificadas antes do uso, por sucessivas lavagens com $\text{HCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{NaOH } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$ e metanol, durante um período de 24 horas. Na falta de resinas XAD-8, as resinas do tipo XAD-7 também podem ser utilizadas para a isolação das SHA.

Após a saturação da resina pelas SHA (o que pode ser verificado pelo escurecimento da mesma), esta foi tratada com solução de $\text{HCl } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para a remoção de compostos não húmicos, fazendo-se em seguida, a eluição com solução de hidróxido de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, extraindo-se dessa forma as SHA. O extrato alcalino de SHA resultante, foi utilizado para a obtenção das frações de ácidos húmico e fúlvico, com base nas características de solubilidade destes compostos, uma vez que os AH são insolúveis em meio ácido e os AF solúveis em todo intervalo de pH (Thurman et al., 1981; Rocha, 1997).

Diagrama-1.1 Esquema geral representando a extração e o fracionamento químico dos AH e AF, segundo metodologia da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS)*.

* <http://www.ihss.gatech.edu/22/04/01>

Depois da eluição, com solução de NaOH, o concentrado obtido foi acidificado a pH 2 com solução de HCl 6 mol L⁻¹, nesta etapa ocorre a precipitação da fração de AH permanecendo em solução a fração de AF. O ácido fúlvico aquático (fração solúvel) foi separado do ácido húmico aquático por centrifugação a 12000 rpm durante 40 min. Posteriormente, as amostras foram dializadas utilizando-se membranas (SAMLESS CELL 16 X 100 CLEAR), contra água deionizada até teste negativo para cloretos (método AgNO₃), sendo em seguida liofilizadas. As membranas utilizadas para purificação das frações, foram primeiramente tratadas, utilizando solução de bicarbonato de sódio 2 % (m/v) e solução de EDTA dissódico dihidratado com 0,01 mol L⁻¹ por 10 minutos. A purificação foi feita por diálise para remoção do excesso de sais dissolvidos segundo procedimento descrito por Rosa et al. (2000).

Foram realizadas análises do teor de carbono orgânico dissolvido (COD) e das composições elementares (C, H, N, S e O), das SHA e suas frações. Estas análises são recursos auxiliares que possibilitam conhecer e quantificar elementos químicos formadores da molécula húmica e fúlvica.

1.2.3 Procedimento para a caracterização das SHA

✓ *Medidas do teor de carbono orgânico dissolvido*

As determinações do carbono orgânico dissolvido, contido no concentrado de SHA e em suas frações, foram feitas utilizando-se o método de combustão catalítica sob atmosfera de oxigênio em equipamento Analyser SHIMADZU TOC-5000 A, de acordo com as recomendações do fabricante.

✓ *Análise elementar (C, H, N, S e O)*

Determinou-se a composição elementar das amostras em relação ao conteúdo de carbono, hidrogênio nitrogênio e enxofre, em analisador elementar (Elemental Analysers, EA 1108 da Fisons Instruments). O teor de oxigênio foi obtido por diferença a 100%, descontados os teores de cinzas das amostras liofilizadas. Para a determinação do teor de cinzas foram calcinados 20 mg de cada uma das amostras de SHA, AF e AH, por 1 hora, à temperatura de 800 °C em mufla. O resultado final foi obtido a partir da média aritmética de experimentos em duplicata.

1.2.4 Procedimentos para a caracterização espectroscópica

✓ *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)*

Os resultados de RMN do estado sólido, foram obtidos de um espectrômetro Varian (Unity 400), operando em 400 MHz para ^1H , pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. Os espectros foram obtidos utilizando a sequência de RMN CP/MAS de ^{13}C segundo Preston, (1996). A frequência de ressonância foi 100,58 MHz ^{13}C e a banda espectral utilizada para a polarização cruzada foi de 50-70 KHz. O tempo de contato e o tempo de repetição foram de 1 ms. As amostras liofilizadas, geralmente em torno de 50 mg, foram colocadas em rotores de zircônia de 5 mm, com rotação em torno do ângulo mágico, de 8 KHz. A escala do deslocamento químico foi referenciada para o adamantano a 964 Hz ($\delta\text{-CH}_2 = 38,30$).

✓ *Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)*

Os espectros de RPE foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Bruker, EMX, operando em banda X (9 GHz), 100 KHz de frequência de modulação e uma cavidade retangular. Utilizaram-se amostras sólidas liofilizadas, de acordo com procedimento descrito por Martin Neto et al., (1991).

No presente trabalho foram obtidos os espectros de RPE para amostras de SHA, AF e AH, para detectar e quantificar os radicais livres do tipo semiquinona. Os radicais livres semiquinonas foram quantificados utilizando uma aproximação, no qual a densidade de spin foi considerada proporcional à intensidade e ao quadrado da largura de linha ($I \times \Delta H^2$) (Poole e Farach, 1972). Esta aproximação é baseada no padrão secundário (um cristal de rubi calibrado com 'strong pitch'), de acordo com a metodologia de Singer (Singer, 1959; Martin Neto et al., 1991). O padrão secundário proporciona uma quantificação do spin mais precisa do que a calibração convencional, devido à sua capacidade de detecção de pequenas variações no fator de qualidade na cavidade de microondas.

As condições experimentais foram definidas criteriosamente. Para isso, utilizou-se uma baixa potência de microondas (em torno de 0,2 mW), para evitar-se a saturação do sinal da semiquinona e uma amplitude de modulação (0,5 G), com o objetivo de se impedir a deformação do sinal pelo aumento da largura de linha (Poole e Farach, 1972). As amostras foram colocadas em tubos de quartzo de 3,5 mm de diâmetro interno, com massa variando de 10 a 30 mg.

✓ *Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada para identificar grupos funcionais presentes nas SH. Informações sobre grupos funcionais como ácidos carboxílicos, aminas, hidróxidos, grupos alifáticos dentre outros, podem ser obtidas (Davis et al., 1999). Os espectros foram obtidos a partir de pastilhas de KBr de 13 mm de diâmetro, sendo que 1 mg de amostra foi misturado a 100 mg de KBr e a amostra resultante desta mistura, foi então, prensada e analisada. As medidas foram realizadas com um espectrofotômetro da Perkin-Elmer, Paragon 1000 PC, efetuando-se 64 varreduras no intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} e intervalo de 1 cm^{-1} .

✓ *Espectroscopia de fluorescência com luz UV-Visível*

A fluorescência de luz no UV-Visível é uma das poucas técnicas que investigam as SH em concentrações e condições naturais. Alta sensibilidade e seletividade são as principais vantagens desta técnica, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem, podem ser observados (Lombardi & Jardim, 1997, 1999). Os experimentos foram realizados, avaliando-se primeiramente a influência de parâmetros como concentração e pH, das soluções contendo amostras de SHA, frações húmicas e fúlvicas. Para as análises, utilizou-se um espectrômetro da Perkin Elmer modelo LS50B.

As amostras de SHA, AF e AH foram diluídas separadamente, em solução de NaHCO_3 a $0,05\text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} \cong 8,0$) com concentrações entre: 1000 até $0,50\text{ mg L}^{-1}$ e pH nos valores de 5; 7; 9 e 11. Foram utilizados os modos bidimensionais (excitação e emissão) e tridimensionais de emissão-excitação (modo síncrona) para todas as

amostras, a uma velocidade de varredura de 300 nm min^{-1} . Os parâmetros de aquisição são mostrados na tabela 1.I.

Tabela 1.I - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência

Modo	Varredura (nm)	Y (resolução)
Emissão (2-D)	350-650	com λ_{ex} 320 e 450
Excitação(2-D)	300-650	com λ_{emi} 432 e 520
Síncrona (3-D)	230-450	$\Delta\lambda$ 20-200

✓ Espectroscopia de absorção de luz no UV-Visível

As medidas de absorção de luz no UV-Visível, foram feitas utilizando-se 2 mg de amostra diluídas em 10 mL de NaHCO_3 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em $\text{pH} \cong 8$, segundo metodologia descrita por Stevenson (1994). A varredura do espectro foi feita na região do ultravioleta e visível (200 a 800 nm). Utilizou-se um espectrômetro Shimadzu modelo UV-1601 PC.

1.3. Resultados e discussões

1.3.1 Análise do conteúdo de carbono orgânico dissolvido (COD)

A quantidade de matéria orgânica isolada de sistemas aquáticos foi obtida medindo-se o conteúdo de COD. A tabela 1.II, ilustra os valores de COD obtidos para as amostras de SHA, AF e AH. Os resultados mostraram, que as SHA, contém um alto teor de carbono orgânico, sendo predominantemente composta por ácidos

fúlvicos. Estes dados são concordantes com dados publicados na literatura (Wangersky, 1993).

Tabela 1.II - Valores do conteúdo de carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico (CI), obtidos para as amostras de SHA, AF e AH, extraídas da água do Rio João Pereira, em Bertioga/SP.

Amostra	COD (g L ⁻¹)	CI (mg L ⁻¹)
SHA	9,00±0,02	2,04±0,03
AF	6,60±0,01	2,70±0,01
AH	1,84±0,04	1,90±0,02

Acredita-se que, em ecossistemas de água doce, de 60 a 80% da matéria orgânica dissolvida, seja constituída por substâncias húmicas e que a sua concentração, nestes ambientes, possa ser da ordem de 10 mg L⁻¹. Valores típicos do conteúdo de COD variam de 0,50 µg mL⁻¹ na água do mar, 7 µg mL⁻¹ em rios, 25 µg mL⁻¹ em pântanos. Nos estuários, o valor do conteúdo de COD encontra-se entre os valores de rios e da água do mar. Em águas salgadas cerca de 20% do COD é proveniente de material húmico, 60% em rios e 70% em áreas alagadas (Choudry, 1982; Reuter et al., 1997).

1.3.2 Coloração das frações húmicas e análise elementar (C,H,N , S e O)

Coloração das substâncias húmicas aquáticas

A figura 1.4 ilustra as amostras de AH e AF extraídas das SHA utilizadas no presente trabalho.

Figura 1.4 - Amostras de ácidos húmicos e fúlvicos extraídas do Rio João Pereira, em Bertioga/SP.

Os ácidos húmicos (AH) apresentam uma coloração que varia do marrom ao preto, dependendo do grau de polimerização, e estes ácidos apresentam pouca solubilidade em água. Na molécula de AH estão presentes grupos funcionais como: carboxilas, fenóis, quinonas, cetonas, metoxilas e alquenos. Anéis aromáticos, açúcares e aminoácidos também estão presentes. Na presença de grupos carboxilas e fenólicos, os AH atuam como trocadores de cátions e assim, formam complexos quelados com metais (Aster et al., 1997; Rocha et al., 1998; Santos, 1999; Smith et al., 2000).

Segundo Stevenson (1982) o caráter aromático, as concentrações de carbono e oxigênio, a acidez e o grau de polimerização das frações húmicas mudam com o aumento da massa molecular (figura 1.5). Os ácidos fúlvicos apresentam uma coloração que se estende do amarelo ao alaranjado escuro e são materiais com massa molecular mais baixa que os AH.

É fato conhecido que a cor na água pode ser causada por um número de contaminantes, tais como: ferro, taninos e húmus (Stevenson, 1982; Bennett et al.,

1993). Depende também, de fatores que afetam a solubilidade e a estabilidade de frações particuladas e dissolvidas, tais como, temperatura, exposição à luz e variações no pH (Bennett et al., 1993).

Figura 1.5 - Propriedades químicas das substâncias húmicas Stevenson (1982).

A tabela 1.III mostra os resultados experimentais obtidos por análise elementar, para amostras sólidas de SHA, AF e AH. No caso de materiais heterogêneos, como as SH, o teor de cinzas é geralmente utilizado como um indicativo do conteúdo de compostos inorgânicos e grau de pureza. Entretanto, existe um grande número de fatores que influenciam nos valores obtidos, como por exemplo, a presença de complexos de cálcio e magnésio (calcinação) e sílica, que podem elevar os valores dos resultados. Provavelmente, parte da sílica que não foi extraída com NaOH, encontra-se ligada às SH devido ao seu tamanho coloidal (Wershaw, 1986; Benedetti, 1996). Este fato, pode explicar o teor de cinzas mais elevado nas amostras de SHA e AF (tabela 1.III). Também, compostos de fósforo, nem sempre volatilizados durante a primeira queima, podem estar incluídos nas cinzas (Huffman & Stuber, 1985).

Tabela 1.III- Valores percentuais da composição elementar e teores de cinzas em %, obtidos para as amostras de SHA, AF , AH.

Amostra	Cinzas (%)	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)	O (%)
SHA	12,75	1,24	26,30	2,45	0,57	69,44
AF	10,95	1,23	26,40	2,25	0,63	69,54
AH	8,09	2,36	45,30	3,94	0,21	48,19

Os resultados (tabela 1.III) mostram que as SHA e suas frações apresentaram conteúdos de nitrogênio entre 1,0 e ~2,4 %, sendo maiores para os AH, e conteúdos de hidrogênio entre 2,0 e ~ 4,0 %, sendo menores para os AF. O conteúdo de carbono foi de 26,0 a 26,4% (SHA e AF respectivamente) e 45,0 % para as amostras de AH. O conteúdo de oxigênio, obtido por diferença a 100 %, variou de ~70 % (SHA e AF) a ~50% nas amostras de AH. Os conteúdos de C,H,N e O, obtidos para as amostras, aproximam-se de dados publicados na literatura, os quais relatam uma distribuição elementar clássica na matéria orgânica dissolvida, variando de: 20-70% para o C, de 0,1-5,0% para o N e de 2,0-8,0 % para o H (Calace et al., 1998).

A amostra de AF apresentou menor conteúdo de carbono e hidrogênio, e maior conteúdo de oxigênio, quando comparada com a amostra de AH. Estes resultados, concordantes com dados da literatura (Visser, 1983; Artinger et al., 2000), refletem as diferenças geralmente encontradas entre estes ácidos. Estas observações também são verificadas em substâncias húmicas extraídas do solo (Stevenson, 1994).

A figura 1.6 ilustra os valores da razão C/N e das razões atômicas H/C e O/C, obtidos para as amostras de SHA e suas frações húmicas e fúlvicas. Segundo Visser, (1983), as frações húmicas com alta massa molecular normalmente apresentam

menor razão H/C, ou seja, tem um sistema aromático mais condensado, ao contrário de materiais com menor massa molecular.

Um aumento do teor de hidrogênio indica maior número de carbonos alifáticos (CH_2) que carbonos aromáticos ($\text{C}=\text{C}$). Por exemplo: uma razão H/C acima de um indica carbonos de caráter alifático e uma diminuição da aromaticidade das amostras, (Artinger et al., 2000; Lu et al., 2000). Por outro lado, uma razão H/C menor que um, reflete-se em uma alifaticidade menor e a presença de estruturas como $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$ ou na formação de estruturas cíclicas, indicando um alto grau de condensação (Visser, 1983). No entanto, como pode ser visto pelos dados obtidos por análise elementar, isto não é tão evidente nas amostras de origem aquática, aqui analisadas, visto a similaridade dos resultados obtidos para a razão H/C.

A razão C/N fornece informações sobre a incorporação de nitrogênio na estrutura húmica e sobre o estado de humificação da matéria orgânica. Uma alta razão C/N significa baixa incorporação de N e baixo grau de humificação (Lu et al., 2000; Artinger et al., 2000). As amostras de AH apresentaram menor razão C/N, e portanto maior retenção de nitrogênio e maior grau de humificação. Nos outros casos a razão C/N foi similar, significando que os conteúdos de N são similares.

O conteúdo de nitrogênio dos ácidos húmicos, em geral, é duas vezes maior que nos ácidos fúlvicos, observando-se o contrário, somente em substâncias húmicas de pântanos (Thurman, 1985). Razões típicas para C/N em amostras de SHA variam entre 45 e 55 (para os AH) e de 18 a 30 (para os AF). Entretanto valores mais baixos podem ser encontrados, como aqueles mostrados na figura 1.6. Esses valores são maiores em SH aquáticas que em SH de solos e variam entre 10 e 12 devido a inúmeros mecanismos, incluindo adsorção de matéria orgânica contendo nitrogênio, por argilas e precipitação de compostos orgânicos de nitrogênio (Stevenson, 1994).

Figura 1.6 - Comparação dos valores para as razões C/N, H/C* e O/C*, obtidos para as amostras de SHA, AF e AH.

**razão atômica.*

Segundo Lu e colaboradores (2000), plantas não vasculares apresentam razão C/N, tipicamente entre 2 e 10. Plantas vasculares que contenham celulose, apresentam razão C/N a partir de 20. As SHA e os AF, obtidos neste trabalho, apresentaram razão C/N em torno de 20. Este valor é considerado relativamente alto para ambientes aquáticos.

A razão atômica O/C permite estimar a abundância de grupos funcionais que contém oxigênio e portanto, é um indicador do grau de oxidação. Uma alta razão O/C implica na presença de grande conteúdo de grupos oxigenados tais como: COOH, OH e OCH₃, O-alkil (Visser, 1983; De Paolis et al., 1997). Por outro lado, o decréscimo desta, implica um alto grau de condensação aromática (Lu et al., 2000).

O conteúdo de oxigênio na matéria orgânica aquática, é normalmente elevado, ao contrário do que tem sido reportado para a matéria orgânica de solos. Isso pode indicar que as SHA são menos estáveis (ou menos estabilizadas por seu ambiente).

Os valores de O/C, das amostras em questão, ficaram entre 0,60-0,80, sendo maior para os AF, quando comparados aos húmicos. Isto indica que os AF são mais ricos no conteúdo de grupos funcionais O-alkil, ácidos carboxílicos, e sugere menor grau de aromaticidade, sendo consideravelmente mais alifáticos quando comparados com os AF extraídos de solos (Lu et al., 2000).

1.3.3 Resultados de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada para caracterizar as SH fornecendo informações estruturais e funcionais das moléculas que as compõe. A figura 1.7 ilustra os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de SHA, AF e AH. Estes espectros apresentam bandas de absorção características dessas substâncias, sendo similares entre si. No entanto, foram observadas diferenças na intensidade relativa de algumas bandas. Em todas as amostras foi observada a presença de uma banda intensa e larga entre 3500 a 3200 cm^{-1} , atribuída ao estiramento OH de fenólicos e C-H aromáticos.

Figura 1.7 - Espectros no infravermelho, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas e suas frações (AF e AH), extraídas do Rio João Pereira, Bertioga/SP (pH $\approx$ 4,0).

Também foram observadas bandas a 1715 cm^{-1} e 1720 cm^{-1} atribuídas aos grupos C=O, COOH, bandas a 1620 cm^{-1} e 1626 cm^{-1} (atribuídas a grupos C=C conjugados a C=O, C=N, COO⁻); em 1266 cm^{-1} e 1220 cm^{-1} , atribuídas a C-O, álcoois e fenóis, além de grupos C=C aromático em aproximadamente 1399 cm^{-1} e 1402 cm^{-1} para os AH e AF respectivamente. Comparando-se os espectros obtidos para os AH e AF (figura 1.8), observa-se que a amostra de AH apresenta um aumento da banda a 1621 cm^{-1} , referente ao estiramento COO⁻ e à vibração de -C=C aromático. Estes dados sugerem a presença de metais na amostra, pois a complexação por metais induz à conversão de grupos COOH para COO⁻, o que é demonstrado pela diminuição da absorbância a 1715 cm^{-1} e ganho em torno de 1621 cm^{-1} (Piccolo et al., 1982).

Segundo Kalbitz e colaboradores (1999 e 2000), um decréscimo da razão entre as absorbâncias, em aproximadamente 1725 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} , pode também estar associado a um aumento do conteúdo de estruturas aromáticas, quando comparado ao conteúdo de grupos carboxil protonados, podendo constituir-se como indicativo do aumento do grau de humificação das frações húmicas.

De acordo com os resultados de Kalbitz e colaboradores (1999 e 2000), um decréscimo na absorbância a 1620 cm^{-1} (referente a estruturas aromáticas, Senesi et al., 1996), implica um aumento da razão 1725/1620. De posse dessas informações, verificou-se que a amostra de AF avaliada no presente trabalho, apresenta menor valor de absorbância a 1620 cm^{-1} e maior razão 1725/1620, quando comparada à amostra de AH (tabela 1.IV), o que sugere menor grau de condensação aromática. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Kalbitz et al., (1999 e 2000).

Figura 1.8 - Comparação dos espectros obtidos por infravermelho para as amostras de AF e AH, extraídas do Rio João Pereira, Bertioga / SP (pH $\approx$ 4,0).

Na amostra de SHA, não foi possível obter tais valores característicos da absorvância a 1620 cm^{-1} e razão $1725/1620$, devido à sobreposição das bandas. A interpretação dos espectros está baseada nos dados publicados por (Schnitzer & Khan 1972, 1978; Piccolo et al., 1982; Silverstein et al., 1991; Stevenson, 1994; Davis et al., 1999 e Kalbitz et al., 1999 e 2000).

Tabela 1.IV - Valores da absorvância a 1620 cm^{-1} e razão $1725/1620$, obtidos por infravermelho, para as amostras de substâncias húmicas aquáticas e suas frações ácidos húmico e fúlvico.

Amostra	Razão 1725/1620
SHA	-
AF	1,07
AH	0,88

1.3.4 - Resultados de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta que permite investigar as propriedades químicas e estruturais da matéria orgânica (Schnitzer & Preston, 1986; Lu et al., 2000; Chen et al., 2002). A figura 1.9 ilustra os resultados obtidos para as SHA e os AF. Os espectros de RMN de ^{13}C , obtidos para essas amostras são similares. As bandas, observadas nos espectros, foram identificadas e integradas para a obtenção das características estruturais.

Figura 1.9 - Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS de amostras sólidas de SHA e AF. São indicados os grupos químicos referentes às diferentes bandas. A escala do deslocamento químico foi referenciada para o adamantano a 964 Hz ($\delta\text{-CH}_2 = 38,30$).

Os espectros de SH, geralmente podem ser divididos em quatro regiões químicas (Lu et al., 2000). Observam-se principalmente os máximos das seguintes bandas: a região de 0-50 ppm representa a ressonância de carbonos alifáticos (metil, metileno), a região específica 50-65 ppm consiste na ressonância de grupos metoxílicos ($-\text{OCH}_3$), e de 160-220 ppm corresponde a carbonos carboxílicos/carbonil (Schnitzer & Preston, 1983; Stevenson, 1994; Preston, 1996; Celi et al., 1997; Peuravuori et al., 1997; Frimmel, 1998 e 2000; Lu et al., 2000).

Acredita-se que a região de 60-90 ppm refira-se a grupos C-O, devido ao fato que o conteúdo de nitrogênio, em solutos fúlvicos aquáticos, é invariavelmente baixo. Contudo, compostos tais como carboidratos ressonam dentro desta região, outras ressonâncias, como as de éteres, também estão presentes. A região de 90-110 ppm consiste na ressonância de carbonos di-oxigenados como: carbonos anoméricos e polissacarídeos.

A região de 110-140 ppm é atribuída à ressonância de carbonos aromáticos de alquil-substituídos e não substituídos, pois carbonos aromáticos protonados ressonam no intervalo de 110-120 ppm e os carbonos aromáticos de alquil substituídos e insubstituídos na faixa de 120-140 ppm (Frimmel, 1998 e 2000). A região de 140-160 ppm é referente à ressonância de carbonos aromáticos substituídos por oxigênio e nitrogênio como por exemplo: fenóis, éteres aromáticos ou aminas. A região de 190-220 ppm é característica de grupos carbonílicos (aldeídos e cetonas).

De acordo com os resultados, que são coerentes com os dados da literatura, (Stevenson, 1994; Preston, 1996; Celi et al., 1997; Peuravuori et al., 1997; Frimmel, 1998 e 2000; Lu et al., 2000; Chen et al., 2002), observa-se que os picos a 39 ppm (amostra de SHA) e a 37 ppm (amostra de AF), correspondem a carbonos alifáticos, resultantes de carbono alquil, tais como metil, metileno (Wilson 1987).

O pico a 75 ppm (SHA) e 76 ppm (AF), têm sido atribuídos às cadeias de polissacarídeos tais como celulose (Malcolm, 1989). Os picos a 128 ppm (SHA) e 127 ppm (AF) são resultantes de carbonos aromáticos e insaturados ou carbonos aromáticos protonados, e em 176 ppm (SHA) e 173 ppm (AF), atribuídos à carboxílicos incluindo ácido carboxílico, amida e carbono de esteres. O pico em 212 ppm (SHA), é atribuído a carbonos de carbonil, aldeídos e cetonas (Lu et al., 2000).

Nas tabelas 1.V e 1.VI estão representados os percentuais de alifaticidade, aromaticidade e os grupos funcionais, associados às bandas correspondentes aos grupos presentes nas amostras de SHA e AF. Os resultados foram obtidos a partir dos espectros de RMN. As porcentagens de alifaticidade e aromaticidade foram próximas, sendo de 76% e 73 % de alifáticos e de 26% e 28 % de aromáticos, para as amostras de SHA e AF, respectivamente.

Tabela 1.V - Grau de aromaticidade e alifaticidade obtidos a partir das áreas das bandas nos espectros de RMN e ^{13}C CP/MAS de amostras sólidas de SHA e AF.

Amostra	Grau (%)	
	Alifaticidade *	Aromaticidade*
SHA	76	26
AF	73	28

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

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

Tabela-1.VI Intensidades relativas (% da área total) das bandas nos espectros de RMN e ^{13}C CP/MAS de amostras sólidas de SHA e AF.Distribuição de ^{13}C por regiões de ppm (%)

Amostra	0-50	50-65	65-92	92-119	119-137	137-160	160-188	188-214
SHA	31,7	8,4	15,9	9,5	11,5	6,6	9,5	4,9
AF	32,1	7,7	15,9	8,2	12,2	7,3	10,9	3,9

Região (ppm)	Grupos atribuídos
0-50	carbonos alifáticos (metil, metileno)
50-65	metoxílicos ($-\text{OCH}_3$)
65-92	C-O
92-119	carbonos dioxigenados (carbonos anoméricos e polissacarídeos)
119-137	carbonos aromáticos de alquil-substituídos e insubstituídos
137-160	carbonos aromáticos substituídos por oxigênio
160-188	carboxílicos
188-214	carbonílicos

1.3.5 - Resultados de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A espectroscopia de RPE é uma técnica utilizada para detectar a presença de espécies paramagnéticas, como o radical livre orgânico estável do tipo semiquinona, presente na molécula, e ainda, íons metálicos naturalmente complexados com a parte orgânica. Através desta metodologia foi possível quantificar estes radicais, os quais são indicativos do grau de humificação das SH.

Os radicais livres, presentes nas substâncias húmicas, podem influenciar significativamente nas propriedades redox da matéria orgânica natural e na reatividade com muitos substratos orgânicos e inorgânicos (Wilson & Weber, 1977; Senesi et al., 1989; Senesi, 1990; Scott et al., 1998).

O sinal do radical livre, presente nas substâncias húmicas, é produzido por grupos do tipo semiquinona, que são formados pela dehidrogenação oxidativa de compostos fenólicos (Riffaldi & Schnitzer, 1972) e estão em equilíbrio com as formas quinona e hidroquinona, (Martin Neto et al., 1991). Os radicais livres semiquinona são muito estáveis e estão relacionados com reações de polimerização/despolimerização, catalisadores de reações de polimerização de SH, grau de humificação da matéria orgânica e interação com pesticidas e poluentes orgânicos (Marques, 1998).

Para a obtenção dos sinais de radicais livres do tipo semiquinona, levou-se em conta o fato de que a sensibilidade do espectrômetro aumenta consideravelmente com o aumento da potência de microondas. A potência ideal deve ser aquela em que se observa a maior intensidade das linhas, porém, não deve provocar a saturação das mesmas e nem sobreposição dos sinais. Dessa forma, de acordo com os testes realizados, para a verificação da potência de saturação, a potência escolhida foi de 0,20 mW, enquanto que a amplitude de modulação foi de 0,50 Gauss pico a pico.

As figuras 1.10 , 1.11 e 1.12 ilustram as curvas de saturação de potência obtidas por RPE, para as amostras de SHA, AF e AH.

Figura 1.10 - Curva de saturação de potência, obtida por RPE, para a amostra de SHA.

Figura 1.11 - Curva de saturação de potência, obtida por RPE, para a amostra de AF.

Figura 1.12 - Curva de saturação de potência, obtida por RPE, para a amostra de AH.

Pode-se observar que, para as amostras de SHA e AF, o comportamento das curvas de saturação obtidas por RPE apresenta características atribuídas à curvas de saturação não homogênea. Para a amostra de AH, a forma da curva é típica de saturação homogênea. Esta diferença observada para a amostra de AH, pode estar relacionada com a presença de centros paramagnéticos que ressonam no mesmo campo magnético, fazendo com que a curva de saturação caia para zero, quando se aumenta a potência da microonda. No caso dos AF e das SHA, a saturação não homogênea, ocorre quando há um “envelope de linhas” ressonando em campos muito próximos; isso provoca um alargamento não homogêneo das linhas de ressonância e a sua curva de saturação chega a um patamar constante, quando a potência aumenta acima do valor de linearidade.

Uma das principais informações a respeito das SH é a medida do grau de humificação, que esta associada à estabilidade e complexidade das moléculas que as compõe. A identificação de um parâmetro que caracterize esse estágio de humificação é importante e tem sido objeto de vários estudos. Um dos poucos parâmetros que indica essa propriedade das SH é o nível de radicais livres (Riffaldi & Schnitzer, 1972; Senesi & Schnitzer, 1977; Martin Neto et al ., 1991 e 1998).

As figuras 1.13 e 1.14 ilustram os espectros obtidos por RPE, para as amostras de SHA, AF e AH, com a primeira derivada do sinal de absorção e o sinal do radical livre, respectivamente.

Figura 1.13 - Espectros de RPE obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA), ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). RL corresponde ao sinal do radical livre. Condições experimentais: medidas feitas à temperatura ambiente, $\nu = 9,74$ GHz, amplitude de modulação de 0,5 G e potência de 0,2 mW.

Figura 1.14 - Espectros de RPE, mostrando o sinal do radical livre (RL) semiquinona, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA), ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH).

Na tabela 1.VII são apresentados os parâmetros físicos obtidos, como fator-g, largura de linha e número de spins / g de carbono.

Tabela 1.VII - Quantidade de radicais livres em spins (g C^{-1}), valores da largura de linha (ΔH) e fator-g obtidos para as amostras de SHA, AF e AH, a partir do sinal de radical livre semiquinona.

Amostra	ΔH^* (G)	Fator-g	Spins (g C^{-1})
SHA	$5,63 \pm 0,03$	$2,005 \pm 0,001$	$2,07 \times 10^{16} \pm 0,03$
AF	$4,54 \pm 0,01$	$2,005 \pm 0,003$	$4,90 \times 10^{16} \pm 0,04$
AH	$4,46 \pm 0,02$	$2,005 \pm 0,001$	$2,70 \times 10^{18} \pm 0,02$

**média de duas determinações*

Nos espectros obtidos para as amostras, de SHA e AF, foram identificados íons Fe^{3+} em $g = 4,3$ e Mn^{2+} (em $g \approx 2,03$, com seis linhas hiperfinas), separadas por 90 Gauss), na amostra de AF. No espectro referente à amostra de AH, aparentemente não se detectam, a temperatura ambiente, sinais de íons paramagnéticos. Na figura 1.14, observa-se a primeira derivada do espectro de absorção, obtida para as amostras de SHA, AF e AH, a qual consiste de uma única linha de absorção fina, típica de radicais livres do tipo semiquinona.

O sinal do radical livre quantificado foi da ordem de 10^{16} spins (g C^{-1}), para os AF e as SHA e da ordem de 10^{18} spins (g C^{-1}), para os AH. Isto pode estar relacionado ao fato de que os ácidos húmicos correspondem à fração com maior grau de condensação aromática e portanto, com maior quantidade de radicais livres (Senesi et al., 1990). Estes resultados são concordantes com os reportados na literatura, que apresentam valores para o conteúdo de radicais livres do tipo

semiquinona, presentes em amostras aquáticas, também da ordem de 10^{16} e 10^{18} spins (g C^{-1}) (Senesi et al., 1990). O fator-g (tabela 1.VII) fornece informação sobre a natureza química da espécie que contém o elétron desemparelhado, no caso o radical livre semiquinona (Wertz & Bolton, 1972). Os valores de g, obtidos para as amostras, foram praticamente os mesmos, indicando que o sinal observado nos espectros refere - se à mesma espécie química.

1.3.6 - Resultados de absorção de luz no UV-Visível

A espectroscopia de absorção de luz no UV-Visível é uma metodologia muito útil para a caracterização das mais variadas substâncias e moléculas. A espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Visível) permite registrar a presença de ligações do tipo π em anéis aromáticos substituídos por carboxilas ou hidroxilas. Este tipo de estrutura química ocorre em moléculas orgânicas, como por exemplo, substâncias húmicas aquáticas. Recentes estudos, também têm aplicado a absorção de luz UV-Visível, para a determinação da massa molecular de amostras de matéria orgânica refratária (Dahlén et al., 1999; Parkinson et al., 2000).

Os espectros de absorção de luz no UV-Visível, das SH, refletem os elétrons de valência e caráter insaturado de estruturas ligantes (Korshin 1999). A absorbância no UV a 254 nm, por exemplo, é utilizada para estimar a reatividade do material húmico, na presença de cloro (Frimmel, 2000), podendo constituir-se em uma ferramenta para prever a formação de subprodutos após a oxidação da água.

Em função da grande quantidade e variabilidade de grupos cromóforos, existentes nas moléculas húmicas, os espectros obtidos por absorção de luz no UV-Visível são geralmente formados pela sobreposição de várias bandas, sem máximos definidos, apresentando absorção decrescente com o aumento do comprimento de

onda. Sabe-se que a absorbância das SH no UV-Visível é influenciada pelo pH, tipo de solvente e concentração salina do meio (Chen et al., 1977). Muitos pesquisadores opinam que a cor escura das SH é devida principalmente aos cromóforos na forma ceto e enol, apresentadas na figura 1.15 (Stevenson, 1994).

A razão E_4 / E_6 (absorbâncias a 445 e 665nm), no UV-Visível, tem sido utilizada em SH de solo, como um indicador do grau de humificação, bem como do grau de condensação da molécula húmica, que geralmente está associada a sua aromaticidade (Schwarzenbach 1993; Stevenson, 1994; Rosa 1998). Mais recentemente, a razão E_2 / E_3 (absorbâncias a 250 e 365 nm) foi utilizada como indicador do grau de humificação de SH de origem aquática. Altos valores, para a razão E_2 / E_3 de ácidos fúlvicos, indicam menor grau de condensação aromática e conseqüentemente a presença de mais estruturas alifáticas e de cadeias menores (Peuravuori et al., 1997).

Figura 1.15 - Principais cromóforos presentes nas substâncias húmicas

As SH geralmente apresentam forte absorção no UV-Visível no intervalo de 190 nm a 800 nm, particularmente na região UV, devido à presença de cromóforos aromáticos e/ou outros compostos orgânicos (Schnitzer & Khan, 1972; Gu et al., 1995 e 1996). Devido ao fato das substâncias húmicas conterem grupos aromáticos, a absorbância na região do espectro no ultravioleta, especialmente abaixo de 300 nm, pode ser um indicativo da presença da matéria orgânica em águas de rios.

A figura 1.16 ilustra os espectros obtidos das amostras de SHA, AF e AH pela técnica de absorção de luz no UV-Visível. Nos espectros, a densidade óptica decresce com o aumento do comprimento de onda, não sendo observadas bandas de absorção específicas, que pudessem ser atribuídas a determinado tipo de cromóforo ou grupo funcional. Estes resultados estão de acordo com vários dados reportados na literatura (Chin et al., 1994; Mcknight et al., 1997; Kalbitz et al., 1999).

A intensidade de absorção apresentou variações para as três amostras. A ordem relativa das intensidades foi AH>SHA>AF. Este comportamento pode ser atribuído às diferenças estruturais entre as frações, pois os AF apresentam maior número de cadeias alifáticas, enquanto que os AH apresentam menor caráter alifático com alto grau de condensação aromática.

Figura 1.16 - Espectros de absorção de luz no UV-Visível, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA), ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). Condições experimentais: 2 mg de amostra dissolvidos em 10 mL de NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8.

A tabela 1.VIII, mostra os valores da razão E_2/E_3 obtidos para as amostras de SHA, AF e AH. Altos valores, para a razão E_2/E_3 de ácidos fúlvicos, indicam menor grau de condensação aromática e conseqüentemente a presença de estruturas mais alifáticas e de cadeias menores (Peuravuori et al., 1997).

Tabela-1.VIII Valores da razão E_2/E_3 obtidos para as amostras de SHA, AF e AH.

AMOSTRA	E_2/E_3^*
SHA	$3,45 \pm 0,30$
AF	$3,48 \pm 0,40$
AH	$2,75 \pm 0,03$

* média de duas determinações

A absorbância UV a 254 nm (Abs 254 nm) é comumente utilizada para determinar a abundância relativa de grupos aromáticos C=C contidos na MON, devido às transições $\pi-\pi^*$ em benzenos substituintes ou à ocorrência de polifenóis nesta região (Traina et al., 1990; Chin et al., 1994; Mcknight et al., 1997; Kalbitz et al., 1999). A forte absorção a 254 nm, particularmente observada para os AH, pode ser resultante da presença de grupos aromáticos C=C ou cetonas C=O. Alta absorção na região do visível é característica de amostras com alto grau de condensação e maior massa molecular (Schnitzer & Khan, 1972).

De acordo com Zech e colaboradores (1997), a humificação está correlacionada com o aumento de estruturas aromáticas, estruturas consideradas recalcitrantes. Guggenberger e colaboradores, (1994) atribuíram o decréscimo no conteúdo de fenóis derivados da lignina e o decréscimo na razão C/N com um decréscimo parcial do tamanho molecular, com conseqüente aumento da humificação. Comparando-se a absorção a 254 nm com a razão C/N obtida por análise elementar, obteve-se o gráfico da figura 1.17. As amostras de SHA e AF apresentaram maior taxa C/N e menor valor para a absorbância a 254 nm, o que comprova o caráter menos aromático, dessas amostras, quando comparadas às amostras de AH.

Figura 1.17 – Correlação entre a razão C/N e a absorbância, a 254 nm, para as amostras de SHA, AF e AH.

I - Efeito da variação do pH sobre espectros de absorção com luz UV-Vis de ácidos fúlvicos.

A figura 1.18 ilustra os espectros obtidos por absorção com luz UV-Visível, para amostras de ácidos fúlvicos em diferentes valores de pH. Nos espectros, a densidade óptica decresce com o aumento do comprimento de onda, não sendo observadas bandas de absorção específicas, que pudessem ser atribuídas a determinado tipo de cromóforo ou grupo funcional.

Figura 1.18 - Espectros de absorção com luz UV-Visível, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos em diferentes valores de pH. Soluções a 8 mg L^{-1} .

Na figura 1.18, pode ser observado que o decréscimo do pH de 11 para 5 promove uma diminuição da absorbância nos espectros obtidos para os AF, sendo este comportamento, também observado para as amostras de SHA e AH. No entanto, não foram observadas variações significativas na forma das curvas. Para todos os valores de pH, os espectros são similares e as absorbâncias, a maiores comprimentos de onda (> 480 nm), foram muito baixas em todos os casos.

As principais propriedades físicas e químicas dos compostos orgânicos (ácidos, aminas, fenóis) sofrem drásticas alterações sob o efeito de ionizações. As substâncias húmicas, são compostas por grupos poli-aromáticos contendo radicais dos grupos funcionais fenólicos e carboxílicos. Esses grupos funcionais podem ser protonados ou desprotonados, dependendo do valor do pH da solução. Contudo, diferenças espectroscópicas ocorridas em função do pH das SH, são evidentes em alguns traços espectrais, e estes traços, sugerem que a absorção no ultravioleta de SH, possa estar relacionada, ao conteúdo dos cromóforos fenólico e carboxil aromático (Bloon, 1989).

É fato conhecido que a acidificação pode causar o aumento da transparência de amostras de água, o decréscimo na coloração da água e o decréscimo no conteúdo do carbono orgânico total (COT) ou carbono orgânico dissolvido (COD) presente em lagos. Esses fatores podem contribuir para o decréscimo da absorbância, com o decréscimo do pH da solução (Davis et al., 1985).

1.3.7 Resultados de fluorescência de luz no UV-VISÍVEL

A fluorescência, de luz no UV-Visível, é uma das poucas técnicas que investiga as SH em concentrações e condições naturais, fornecendo assim, informações estruturais responsáveis pela fluorescência das moléculas que as

compõe. Embora, estruturas fluorescentes pareçam compor a menor parte dos constituintes húmicos (Lombardi & Jardim, 1997).

As principais vantagens desta técnica são a alta sensibilidade e seletividade, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados. Nas substâncias húmicas, os principais fluoróforos presentes, grupos capazes de absorver e emitir energia, na forma de luz, são sistemas com alto grau de conjugação, como por exemplo anéis aromáticos e grupos do tipo quinona.

No presente trabalho, esta técnica foi aplicada realizando-se experimentos para a avaliação da influência da concentração da amostra sobre a intensidade máxima de fluorescência, da variação dos comprimentos de onda (λ) de emissão/ excitação, e também da influência do pH da solução.

I- Influência da concentração sobre a intensidade máxima de fluorescência

A figura 1.19 ilustra a variação da intensidade de fluorescência (modo emissão), em função da variação da concentração das amostras de substâncias húmicas aquáticas e suas frações fúlvica e húmica. Os resultados ilustrados na figura 1.19, mostram um comportamento bem diferenciado entre as amostras de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, em relação à concentração, o que pode estar relacionado a fatores como conformação estrutural e massas moleculares. Aumentando-se a concentração da amostra, até um determinado intervalo, observa-se à intensidade de fluorescência em cada região espectral, quando ela alcança um máximo e então decresce (figura 1.19). A concentração na qual a intensidade alcança um máximo, depende da região espectral .

Figura 1.19 – Correlação entre a intensidade de fluorescência com a variação da concentração das soluções contendo a amostra de substâncias húmicas aquáticas (SHA) e suas frações ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). Os espectros de emissão foram obtidos com excitação a 320 nm e 450 nm. Soluções a pH 7.

O processo referente à intensidade de fluorescência, de uma substância, quando ela atinge um máximo em uma concentração específica e então decresce, pode estar associado a um efeito de filtro interno, ou ao fato da luz fluorescente ser significativamente absorvida pelas espécies em solução (Spark & Swift, 1994). Dessa forma, os solutos presentes na solução, atenuam a radiação incidente no decorrer do caminho ótico, até a região de detecção, ou absorvem a radiação emitida de tal forma, que a fluorescência medida é menor quando comparada aquela efetivamente gerada (Spark, & Swift, 1994). Portanto, deve-se trabalhar em um intervalo de concentração, onde ocorra um máximo do sinal de fluorescência, de forma a minimizar interações intermoleculares.

Segundo Spark & Swift (1994), o máximo de intensidade de fluorescência em cada região espectral, associada com a concentração de substâncias húmicas, aumenta com o decréscimo da massa molecular, o que implica em um aumento do

conteúdo de grupos C=O, C aromático e grupos COOH. Senesi (1990), atribuiu o efeito da concentração, sobre a fluorescência de AF, às modificações ocorridas no grau de associação, configuração e rearranjo que afetam os fluoróforos presentes na solução.

Na figura 1.20, para baixas concentrações (até aproximadamente 16 mg L^{-1}), foi observada uma colinearidade entre a concentração e a intensidade máxima de fluorescência.

Figura 1.20 - Ajuste linear da intensidade de fluorescência com a variação da concentração das amostras de ácidos fúlvicos e húmicos, soluções a pH 7. Em (a) excitação a 320 nm e em (b) excitação a 450 nm.

II- Obtenção de espectros no modo de excitação

A figura 1.21 ilustra os espectros no modo de excitação, obtidos para as amostras de SHA, AF e AH. Em função de suas diferenças estruturais, os espectros apresentam um comportamento diferenciado.

Os espectros de excitação obtidos para as SHA e os AF mostram máximos a 224 nm, 320 nm e 376 nm, enquanto que os obtidos para os AH exibem máximos a 238 nm e 390 nm. Estes picos fluorescentes são típicos de materiais húmicos e

fúlvicos e de aminoácidos. Os espectros de fluorescência no modo de excitação, apresentados neste trabalho, exibem um formato de linha usual, como os publicados na literatura para material orgânico refratário (Baker et al., 1999).

Os espectros de excitação de fluorescência, para esses materiais, geralmente são caracterizados por um ou mais picos maiores e muitas vezes acompanhados por um número de picos secundários, mostrando uma variedade na intensidade relativa. Maior intensidade de fluorescência, de materiais orgânicos, pode ocorrer a vários comprimentos de onda, dependendo da origem da amostra.

Figura 1.21 – Espectros de excitação com emissão a 435 nm (amostras de substâncias húmicas aquáticas e ácidos fúlvicos) e a 450 nm (ácidos húmicos). Condições experimentais: soluções a 8 mg L^{-1} e pH 7.

Em espectros no modo de excitação de fluorescência de ácidos fúlvicos terrestres (extraídos de solos e turfas), há um máximo, geralmente a 390 nm, apresentando um número de picos secundários. Também pode ocorrer outro pico principal em menores comprimentos de onda (entre 345 - 360 nm) ou ainda em comprimentos de onda mais elevados (455 - 470 nm). Amostras de ácidos fúlvicos aquáticos podem exibir espectros de excitação, com máximo a 390 nm, similar aos

ácidos fúlvicos de solos, sendo que para muitas amostras aquáticas, são encontrados ainda picos com maior intensidade a menores comprimentos de onda, os quais variam entre 360 nm e 375 nm, ou entre 325 nm e 350 nm (Senesi, 1990). Ácidos fúlvicos de origem marinha são também caracterizados por um pico principal de excitação a comprimentos de onda que variam de 320 - 385 nm (Senesi, 1989). A amostra estudada, no presente trabalho, além de apresentar picos dentro do intervalo reportado na literatura, apresentou picos secundários de excitação no intervalo entre 220 - 260 nm.

Variações na forma do segundo pico, de excitação, têm sido observado por alguns autores, e foram relacionadas com a distribuição de massa molecular e com proporções relativas de grupos ácidos funcionais, em estruturas de compostos húmicos. Geralmente, os comprimentos de onda observados em aproximadamente 290 nm, 390 nm e 460 nm, são atribuídos ao material húmico, mais precisamente, são característicos de material fúlvico (Erich & Trusty, 1997). Outros picos entre 250 nm – 280 nm e 300 nm – 370 nm, são atribuídos à fluorescência de aminoácidos dentro de proteínas, os quais são derivados da decomposição de plantas, de bactérias de solos ou ainda da decomposição de animais (Baker et al., 1999). Estes picos de fluorescência também têm sido reportados em solos, águas marinhas e fluviais. Os centros de fluorescência entre 230-280 nm e 310-420 nm são também atribuídos a proteínas (Erich & Trusty, 1997).

III- Obtenção de espectros no modo de emissão

A figura 1.22 ilustra os espectros de emissão obtidos para as amostras de SHA, AF e AH. O espectro de fluorescência observado, é provavelmente, a soma dos

espectros de muitos diferentes fluoróforos presentes, nas moléculas que compõe o material orgânico aquático.

Espectros no modo de emissão, para as substâncias húmicas, consistem de uma banda larga com um máximo de fluorescência que varia de acordo com a origem da amostra (Senesi, 1990). Esteves e colaboradores (2000), mostraram espectros de emissão de fluorescência com uma única banda, com um máximo centrado a maiores comprimentos de onda (440 nm) para AF de rio, costeiros e AF extraídos do mar.

Figura 1.22 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos. Condições experimentais: soluções a 8 mg L^{-1} e pH 8.

Espectros de emissão, com intensidade máxima entre 410 nm a 490 nm, característico de ácidos fúlvicos aquáticos, tem sido reportado na literatura (Senesi et al., 1989). Ácidos fúlvicos de amostras marinhas, geralmente apresentam intensidade máxima de emissão a menores comprimentos de onda, entre 410 – 450 nm (Eward et al., 1988).

No presente trabalho, as SHA e suas frações, apresentam bandas de emissão, larga, com um máximo centrado a 435 nm e 433 nm (amostras de SHA e AF) e a

~ 450 nm (AH). Os espectros de emissão obtidos, para as amostras de SHA e AF, são basicamente localizados na região do azul (≈ 430 nm), enquanto que para os AH o espectro é mais deslocado para o vermelho, concordando assim, com a proposta de que a estrutura dos AH apresenta maior grau de conjugação das moléculas, quando comparado aos AF, (Senesi et al., 1991). Os valores observados para a intensidade máxima de fluorescência, estão dentro de intervalos reportados na literatura, para substâncias húmicas aquáticas (Esteves et al., 2000).

Materiais húmicos, ricos em carboidratos, apresentam um pico de emissão próximo a 440 nm (Chen et al., 2003). Ao contrário, espectros que apresentam bandas de emissão com máximo em menores comprimentos de onda e com maior intensidade (como foi observado para as amostras de SHA e AF), são associados com amostras que apresentamm, menor conteúdo aromático, componente com menor massa molecular e com a presença de grupos doadores de elétrons tais como: hidroxil e metoxil (Senesi et al., 1991 e 1990).

É fato conhecido que o deslocamento da banda do espectro de emissão, para o vermelho, está associado com o aumento da extensão do sistema eletrônico π (Ewald et al., 1988; Senesi, 1990; Belin et al., 1993; Zsolnay et al., 1999; Piana & Zahir, 2000). Este comportamento observado no espectro de emissão, para a amostra de AH, é característico de moléculas com núcleos aromáticos altamente substituídos e policondensados, e com sistemas insaturados conjugados, capazes de alto grau de ressonância, típicos de materiais mais humificados (Kalbitz et al., 1999).

Ácidos fúlvicos de origem aquática fluorescem mais fortemente do que os ácidos fúlvicos extraídos de solos, enquanto ácidos fúlvicos de turfa apresentam uma intensidade elevada na fluorescência. Amostras de ácidos fúlvicos extraídos de ambientes terrestres como solos e turfas, mostram espectros de emissão com um

máximo de fluorescência que varia entre 435 e 465 nm. Contudo, os ácidos fúlvicos de alguns solos podem apresentar máximos, na intensidade de emissão fluorescente, a maiores comprimentos de onda que variam entre 500 e 520 nm (Saar & Weber, 1980; Senesi et al., 1989).

Neste trabalho, a fluorescência total (FT), a qual é proporcional à área sob a curva de emissão fluorescente, variou de 24843, 14934 e 8249 (unidades arbitrárias, u.a.), e os picos referentes aos comprimentos de onda, com um máximo de intensidade de fluorescência, variaram de 435 nm, 433 nm e 450 nm para as amostras de SHA, AF e AH respectivamente (figura 1.22).

Quando excitado a 320 nm, o espectro de emissão para os AF, foi mais intenso quando comparado ao espectro obtido para os AH. O aumento da intensidade máxima de fluorescência, além de poder estar associado com o decréscimo da massa molecular, também pode estar associado com o aumento do conteúdo de grupos C=O, C aromático e grupos COOH (Spark et al., 1994).

Geralmente, menor intensidade de emissão de fluorescência, para ácidos fúlvicos em maiores comprimentos de onda, quando comparado com amostras de ácidos húmicos, sugere a presença de componentes estruturais simples, ou seja, menor grau de substituição aromática e policondensação, além de níveis menores de cromóforos conjugados. Provavelmente, fluoróforos contendo base Schiff, formados por reações de policondensação entre grupos amino e carbonil, estão presentes em grupos alifáticos de ácidos fúlvicos ricos em nitrogênio e hidrogênio (De Souza Sierra, 1996).

Sierra e colaboradores (1997), estudaram propriedades fluorescentes de compostos húmicos sedimentares e das águas intersticiais adjacentes. Segundo esses autores, os espectros de emissão de fluorescência dos CH sedimentares apresentam

uma única e larga banda, sendo que os ácidos fúlvicos (AF) exibem λ_{max} mais curtos que os ácidos húmicos (AH). Verificaram ainda, que as águas intersticiais apresentam as mesmas características fluorescentes encontradas em águas naturais de diferentes ambientes, com λ_{max} em torno de 420 nm. Derivados originados da degradação de plantas, possivelmente incorporados nas moléculas dos ácidos fúlvicos durante sua formação, também contribuem para as propriedades fluorescentes dos ácidos fúlvicos.

Normalizando-se os espectros da figura 1.22, pela área, obteve-se os dados da figura 1.23. Observa-se que o espectro referente à amostra de ácido húmico, desloca-se mais para o vermelho, o que também pode estar associado a maior grau de conjugação.

Figura 1.23 – Espectros de emissão, normalizados pela área, obtidos para as amostras de SHA, AF e AH, concentração, 8 mg L⁻¹, excitação a 320 nm.

Espectros que apresentam bandas de emissão, com máximo em maiores comprimentos de onda e com baixa intensidade de fluorescência (como foi observado para a amostra de AH), indicam a presença de grupos aromáticos condensados ou outros sistemas insaturados com alto grau de conjugação, (capazes

de alto grau de ressonância), ou ainda, a presença de grupos receptores de elétrons, tais como grupos carbonílicos e carboxílicos (Senesi et al., 1989; Miano & Senesi, 1992; Chen et al., 2002).

Uma vez que as curvas fluorescentes são gaussianas na energia, nos espectros da figura 1.22, transformou-se o comprimento de onda de nanômetros para cm^{-1} , com o intuito de se fazer um ajuste da gaussiana, avaliando-se as possíveis contribuições dos diferentes fluoróforos (que compõe as substâncias húmicas) responsáveis pela fluorescência dessas substâncias. A figura 1.24 mostra os resultados obtidos e a tabela 1.IX mostra parâmetros como altura, largura, área e posição, das gaussianas determinadas.

Os dados da figura 1.24 mostram que a gaussiana principal pode ser uma composição de pelo menos 4 bandas distintas, cada uma com contribuições específicas de diferentes fluoróforos. Os AF e as SHA apresentaram características similares quanto à largura e posição das gaussianas. No entanto a amostra de SHA apresentou maiores valores para a área e altura das gaussianas secundárias. No caso dos AH, parâmetros como altura, largura, área e posição das gaussianas, apresentaram menores valores, quando comparado aos AF e as SHA (tabela 1.IX). Observa-se que para todas as amostras, as gaussianas de número 1 e 4 (referentes a determinado tipo de fluoróforo), são as que mais contribuem para a formação da gaussiana principal.

Baker e colaboradores (1999), sugeriram a presença de um ou mais fluoróforos, na região de 250 nm. Miano & Senesi (1992), mostraram que os fluoróforos mais eficientes em polímeros húmicos, são variavelmente substituídos como cadeias aromáticas condensadas e/ou cadeias alifáticas altamente insaturadas.

Figura 1.24 - Espectros de fluorescência obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas, ácidos fúlvicos e húmicos, com excitação a 320 nm. O ajuste da função gaussiana mostra a possível participação de pelo menos quatro compostos envolvidos na formação das bandas.

Tabela 1.IX – Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nas SHA, AF e AH.

Gaussianas	Amostra de SHA			
	Altura	Largura	Área	Posição
1	109,65	$3,33 \pm 0,02$	$459,29 \pm 7,60$	$20,98 \pm 0,03$
2	27,18	$1,14 \pm 0,03$	$40,26 \pm 4,53$	$21,40 \pm 0,01$
3	133,50	$1,89 \pm 0,04$	$321,13 \pm 19,85$	$22,81 \pm 0,01$
4	145,60	$2,30 \pm 0,02$	$423,60 \pm 14,60$	$24,48 \pm 0,03$
Amostra de AF				
1	66,90	$3,40 \pm 0,02$	$285,89 \pm 6,00$	$21,17 \pm 0,03$
2	18,25	$1,18 \pm 0,03$	$28,15 \pm 3,00$	$21,46 \pm 0,01$
3	69,16	$1,75 \pm 0,03$	$154,74 \pm 7,75$	$22,82 \pm 0,01$
4	96,80	$2,35 \pm 0,01$	$287,82 \pm 6,21$	$24,50 \pm 0,02$
Amostra de AH				
1	45,54	$3,08 \pm 0,01$	$176,86 \pm 1,59$	$20,21 \pm 0,01$
2	13,26	$1,19 \pm 0,04$	$20,21 \pm 3,00$	$21,40 \pm 0,03$
3	25,80	$1,63 \pm 0,07$	$53,76 \pm 6,39$	$22,63 \pm 0,03$
4	40,50	$2,64 \pm 0,04$	$135,14 \pm 4,70$	$24,15 \pm 0,04$

Entretanto, diferentes fluoróforos também são evidentes no espectro luminescente de amostras de várias origens, sendo identificados geralmente por uma forte variação no λ de excitação e de emissão, provavelmente causada pela presença de vários substituintes, os quais afetam as propriedades fluorescentes do material. Unidades fenólicas substituintes, originadas da lignina, podem ser importantes contribuidoras da fluorescência de amostras de AH, e de ácidos fúlvicos de origem aquática e terrestre (Senesi et al., 1989). Em geral, os fluoróforos encontrados em

amostras de AH, caracterizados por λ de excitação/emissão a 435-450/510-525 nm, são atribuídos a grupos fenólicos altamente conjugados e quinonas (Wolfbeis, 1985). Devido à complexidade molecular e heterogeneidade de materiais húmicos, o espectro de fluorescência observado é provavelmente a soma dos espectros de muitos diferentes fluoróforos presentes, nas moléculas que compõe o material orgânico aquático, como pôde ser verificado na figura 1.24.

São vários os estudos e hipóteses sobre os possíveis grupos que fluorescem, na matéria orgânica (De Souza Sierra, 1996). A tabela 1.X, mostra algumas das estruturas, com suas correspondentes intensidades máximas de fluorescência, nos modos de emissão e excitação.

De acordo com Senesi (1990), acredita-se que a intensidade de fluorescência, nos modos de emissão e excitação, decresce com o aumento da massa molecular da amostra. Vários fatores podem contribuir para uma menor intensidade de fluorescência de moléculas grandes, entre eles, está a presença de metais, como o ferro associado a sistemas eletrônicos π , os quais diminuem a intensidade de fluorescência, aumentando assim, a energia do estado singleto para o tripleto. Outro fator, é a presença de outros grupos doadores de elétrons, tais como, grupos hidroxil e metoxil, e também, a presença de pequenas moléculas, que pode aumentar, pelo aumento da transição, provavelmente entre o singleto e estados vizinhos.

O tamanho molecular das frações diminui, variando a ocorrência de orientação e do número de grupos funcionais, devido às ligações de hidrogênio. Segundo Senesi (1990), com o aumento da massa molecular, o espectro desloca-se para maiores comprimentos de onda, ocorrendo um decréscimo aparente na eficiência do espectro de fluorescência. Diferenças no espectro de fluorescência, para algumas frações de

ácidos fúlvicos com diferentes massas moleculares, têm sido reportado na literatura (Ewald et al., 1988; Belin et al., 2000).

Tabela 1. X - Comprimentos de onda, em nm, da emissão de fluorescência máxima de alguns compostos puros, contribuidores em potencial, como componentes moleculares para a fluorescência de ácidos fúlvicos*.

Composto Fluorescente	Fórmula Estrutural	$\lambda_{em}(max.)$ (nm)	$\lambda_{exc}(max.)$ (nm)
Derivados cromona		409-490	320-346
Ácido salicílico		410	314
Salicilato de metil		448	302,366
Hidroxi e metoxi insaturados dentre outros		400-475 430-462	320-343

*Adaptado de Senesi, 1990.

Segundo Ewald e colaboradores (1988) e Belin e colaboradores (2000), o aumento da massa molecular é acompanhado por um deslocamento do pico de emissão, para maiores comprimentos de onda, e um decréscimo aparente na intensidade de fluorescência é observado. Estes efeitos são atribuídos a uma grande proximidade de cromóforos aromáticos e conseqüentemente, a um aumento da

desativação de estados excitados por um “*quenching*” interno, em moléculas com elevada massa molecular.

IV - Obtenção de espectros no modo de varredura síncrona

As distinções, entre amostras com diferentes graus de humificação, também podem ser obtidas utilizando-se os espectros de fluorescência no modo bidimensional de excitação síncrona (Kalbitz et al., 1999). Com o aumento do grau de humificação, espera-se uma redução na separação entre os níveis fundamental e primeiro excitado ($\Delta\lambda$ pequeno) e um deslocamento para o vermelho (λ de excitação pequeno) (Senesi, 1990; Senesi et al., 1991).

No modo de varredura síncrona há uma maior resolução espectral, devido ao estreitamento das bandas decorrentes da multiplicação de duas funções, as quais correspondem aos padrões de distribuição das intensidades, ou seja, os espectros, dos dois modos de varredura (emissão e excitação) que ocorrem simultaneamente (Senesi, 1990). Espectros de fluorescência no modo síncrona, para AF, apresentam picos próximos a 360, 400 nm e a 470 nm (Zsolnay et al., 1999). Os AF e as SHA, avaliados no presente trabalho, exibiram somente um máximo a 398 nm, enquanto que a amostra de AH apresentou um máximo a 465 nm (figura 1.25).

O deslocamento do espectro, no modo de varredura síncrona para maiores comprimentos de onda, e observado para a amostra de AH, em relação aos AF, além da alta ressonância a maiores comprimentos de onda, confirma o fato de que os AH apresentam maior número de núcleos aromáticos substituintes (Miano et al., 1992).

Segundo Kalbitz e colaboradores (1999 e 2000), o quociente das intensidades de fluorescência 400 / 360 ou 470 / 360, é uma medida do grau de humificação da matéria orgânica dissolvida. O aumento deste quociente, indica maior grau de

policondensação e de humificação. Tem sido proposto, a utilização desses quocientes, como parâmetro para estudos do índice de humificação (Kalbitz et al., 2000). Os picos, ou ombros, a maiores (alto grau de policondensação) e menores comprimentos de onda (componentes estruturais simples, ou seja, baixo grau de policondensação aromática) podem ser utilizados (Senesi et al., 1989).

Figura 1.25 – Espectros de fluorescência no modo de varredura síncrona, obtidos para as amostras de substâncias húmicas aquáticas (SHA), ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH), na concentração de 8 mg L^{-1} com $\Delta\lambda = 50 \text{ nm}$, (pH 7,0).

A tabela 1.XI ilustra os valores obtidos para os índices de humificação ($400 / 360$ e $470 / 360$) e parâmetros de análise elementar. Observam-se, para os AH, maiores valores para os quocientes $400 / 360$ e $470 / 360$, de 0,75 e 0,88 respectivamente, e menor razão C/N. Estas observações sugerem que os AH apresentam maior grau de conjugação das moléculas, ao contrário dos AF e das SHA.

Zsolnay e colaboradores (1999), mostraram que o grau de humificação da matéria orgânica dissolvida, pode estar associado com o deslocamento do pico de

emissão para maiores comprimentos de onda, sendo que este deslocamento foi atribuído a materiais mais humificados. Bayer e colaboradores (2002) mostraram resultados com características similares. Estas observações foram confirmadas na literatura (Zsolnay et al., 1999; Bayer et al., 2002; Milori et al., 2002) e pelos resultados apresentados na figura 1.25. Segundo Baker e colaboradores (1999), o aumento da intensidade de fluorescência, para maiores comprimentos de onda, é atribuído a alguns outros possíveis efeitos, tais como, a hidrofobicidade relativamente natural dos AH com maior massa molecular que os AF e “*quenching*”, da fluorescência dos AH pela presença de metais.

Tabela 1.XI – Correlação entre o índice de humificação (400/360 e 470/360) e parâmetros obtidos por análise elementar para as amostras de AH, SHA e AF.

Amostra	Quociente		Razão C/N ^c
	400/360 ^a	470/360 ^b	
SHA	0,15	0,57	21,20
AF	0,11	0,48	21,42
AH	0,75	0,88	19,19

^a Quociente da intensidade relativa de fluorescência (modo síncrona) (400/360)

^b Quociente da intensidade relativa de fluorescência (modo síncrona) (470/360)

V - Efeito da variação do pH sobre o espectro de fluorescência dos ácidos fúlvicos.

As figuras 1.26 e 1.27 ilustram os espectros de fluorescência no modo de excitação e emissão, respectivamente, obtidas para as amostras de ácidos fúlvicos,

em diferentes valores de pH. Verificou-se que, em valores de pH menores (intervalo de 5 – 11) a amostra apresentou maior intensidade de fluorescência. Na figura 1.26 observam-se mudanças nas posições dos máximos de fluorescência variando de 212 nm (amostra a pH 5) para 230 nm (amostra a pH 11).

Figura 1.26-Espectros de fluorescência no modo excitação, com emissão a 320 nm, obtidos para a amostra de AF em diferentes valores de pH. Solução a 8 mg L^{-1} .

Figura 1.27- Espectros de fluorescência no modo emissão, com excitação a 320 nm, obtidos para a amostra de AF, em diferentes valores de pH. Solução a 8 mg L^{-1} .

A figura 1.28 mostra a contribuição de pelo menos quatro diferentes fluoróforos, responsáveis pela fluorescência dos AF em diferentes valores de pH.

Figura 1.28 - Espectros de fluorescência obtidos para a amostra de ácidos fúlvicos, com excitação a 320 nm, em diferentes valores de pH. O ajuste da função Gaussiana mostra a possível participação de pelo menos quatro compostos envolvidos na formação das bandas.

Determinando-se parâmetros como altura, largura, área e posição das gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nos AF, obteve-se os dados da tabela .1 XII. Os valores da altura, largura e posição das gaussianas que compõe o espectro principal, foram muito próximos. Entretanto, observa-se um aumento da área das gaussianas com o decréscimo do pH. Sabe-se que a fluorescência total (FT) é proporcional à área sob a curva de emissão fluorescente.

Tabela 1.XII – Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nos AF, em diferentes valores de pH, obtidos dos espectros no modo de emissão, com λ dado em número de onda.

Gaussianas	Amostra de AF				
	pH 5				
	Altura	Largura	Área	Posição	
1	88,540	2,97 $\pm 0,04$	329,68 $\pm 13,58$	20,40 $\pm 0,06$	
2	53,435	1,27 $\pm 0,06$	185,15 $\pm 17,32$	21,14 $\pm 0,06$	
3	82,081	1,40 $\pm 0,07$	144,36 $\pm 22,07$	22,285 $\pm 0,05$	
4	128,48	2,20 $\pm 0,03$	366,82 $\pm 14,00$	23,59 $\pm 0,04$	
	pH 7				
1	84,07	2,94 $\pm 0,04$	309,98 $\pm 14,04$	20,36 $\pm 0,06$	
2	63,90	1,36 $\pm 0,07$	128,97 $\pm 18,09$	21,26 $\pm 0,06$	
3	64,53	1,26 $\pm 0,05$	102,22 $\pm 17,45$	22,37 $\pm 0,05$	
4	130,00	2,24 $\pm 0,02$	366,04 $\pm 11,10$	23,55 $\pm 0,03$	
	pH 9				
1	70,211	2,89 $\pm 0,05$	255,17 $\pm 12,73$	20,20 $\pm 0,07$	
2	68,202	1,47 $\pm 0,08$	126,48 $\pm 18,73$	21,33 $\pm 0,06$	
3	55,642	1,24 $\pm 0,05$	86,65 $\pm 16,73$	22,443 $\pm 0,04$	
4	128,56	2,26 $\pm 0,02$	355,24 $\pm 10,27$	23,53 $\pm 0,03$	
	pH 11				
1	58,471	2,89 $\pm 0,06$	212,49 $\pm 13,05$	20,18 $\pm 0,09$	
2	65,848	1,53 $\pm 0,08$	126,19 $\pm 20,26$	21,37 $\pm 0,06$	
3	49,533	1,24 $\pm 0,05$	77,45 $\pm 17,07$	22,47 $\pm 0,04$	
4	119,64	2,25 $\pm 0,02$	338,47 $\pm 9,61$	23,57 $\pm 0,03$	

Dessa forma o aumento da área com o decréscimo do pH sugere que a protonação possa estar contribuindo com efeitos e mudanças na conformação molecular dos AF. Múltiplas protonações de fluoróforos substituintes com estruturas aromáticas, presentes nos ácidos fúlvicos, podem aumentar a fluorescência total, induzidas pela protonação de grupos funcionais ácidos, a pH menores (Saar et al., 1980).

Senesi e colaboradores (1991) observaram uma diminuição na intensidade de fluorescência em SH com o aumento do pH, nos valores maiores que 6. Ghosh & Schnitzer (1980), atribuíram esses efeitos a mudanças na conformação macromolecular, embora, em outros estudos sejam sugeridos que o decréscimo da intensidade de fluorescência seja devido a uma mudança em λ_{max} , e a um decréscimo na absorvidade, devido ao cromóforo fenólico carboxil-substituído, causado por alterações do pH. A região entre 300-350 nm no espectro de excitação, é dominada por cromóforos com alto conteúdo de grupos carboxílicos, enquanto estruturas contendo grupos fenólicos abrangem a região entre 350- 400 nm (Silva 1996).

Segundo Visser et al., 1983 e Miano et al., 1988, com o aumento do pH de 3,0 para 8,4 ou de 4,0 para 9,4, para soluções a uma concentração de 100 ou 50 mg L⁻¹, respectivamente, a intensidade da banda de emissão diminui e isto significa que o pico de excitação aumenta significativamente para amostras de ácidos fúlvicos aquáticos. Em contraste com esses experimentos, o aumento na intensidade de emissão, tem sido reportado na literatura, com o aumento do pH na fluorescência de águas turvas. Em ácidos fúlvicos de turfas por exemplo, a uma concentração de 50 mg L⁻¹, a intensidade do pico principal aumenta com o aumento do pH de 4,0 para 9,4, enquanto que a intensidade de emissão mostrou um máximo a pH 7,0 com

razoável diminuição, com o decréscimo do pH para valores abaixo de 7,0 e um declive brando acima de pH(s) entre 7,0 e 9,4 (Miano et al., 1988).

Tendências similares sobre o efeito do pH, na intensidade de emissão de fluorescência, foram encontradas em ácidos fúlvicos aquáticos e de solos, mas com máximo a pH 5,0. Para os ácidos fúlvicos aquáticos, a fluorescência não varia muito em intervalos de pH entre 5,0 e 11,0 mas, decresce em ambos os lados deste intervalo, abaixo de pH 1,5 e acima de 13,0.

Outros experimentos, sobre a fluorescência de ácidos fúlvicos de solos, mostraram que a intensidade do pico de excitação e, particularmente as bandas de emissão, diminuíram em um intervalo de pH 4,5 e 7,0 e aumentou para valores de pH acima de 10,0. Estes ácidos fúlvicos também foram caracterizados por um deslocamento típico (acima de 10 nm), para o vermelho, com um aumento do pH para 10,0 (Miano et al., 1990).

Espectros de excitação de ácidos fúlvicos de solos no modo síncrona, geralmente mostram pequeno decréscimo na intensidade total de fluorescência. Ácidos fúlvicos de rios e turfas mostram um aumento, na intensidade de fluorescência, com o aumento do pH de 4,5 para 10,0 (Miano et al., 1988 e 1990). Ambas, intensidade e comprimento de onda, para cada pico nestes espectros, são afetados diretamente por variações do pH, de acordo com a natureza da amostra.

Em geral, tem sido considerado que o aumento da intensidade de fluorescência com a variação do pH da solução, pode apresentar grande dependência com o alto conteúdo de grupos hidroxil fenólico, com o aumento da ionização desses grupos, com a diminuição de partículas associadas e com estruturas moleculares, ocorrendo por exemplo, o rompimento de ligações de hidrogênio inter e intramolecular (Muller-Wegener, 1977; Gosh et al., 1980; Visser et al., 1983).

O aumento do conteúdo de grupos fenólicos OH, em amostras de ácidos fúlvicos, resulta em um aumento na intensidade do pico principal de excitação. Um efeito oposto, ou seja, uma atenuação na intensidade de emissão, pode acontecer, particularmente por grupos carboxil, quando são para-orientados em grupos OH, (Visser et al., 1983).

Aumentos das concentrações de radicais livres com o aumento do pH, em soluções de ácidos fúlvicos (Senesi et al., 1977), foram também sugeridos como sendo responsáveis pelo aumento na intensidade de fluorescência. Estas hipóteses podem sustentar a contribuição do pH na fluorescência de ácidos fúlvicos, por processos de transferência de elétrons do estado excitado (Gosh, 1980).

Sabe-se que a fluorescência de substâncias húmicas é muito sensível ao pH do meio (Ghosh & Schnitzer, 1980; Miano et al., 1988; Spark & Swift, 1994; Zsolnay et al., 1999). Como a fluorescência depende do grau de conjugação da molécula e a ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares pode aumentar ou diminuir a conjugação de grupos vizinhos, então a intensidade da fluorescência pode variar com a ocorrência deste tipo de ligação em função de variações da concentração de eletrólitos e do pH do meio (Spark & Swift 1994).

A diferença e o contraste de resultados na literatura (Spark & Swift 1994), no entanto não são surpresos, ao considerar-se a variedade de grupos funcionais em constante ionização nos ácidos fúlvicos e o rearranjo da configuração molecular ocorrida em função da variação do pH. Entretanto, tem sido enfatizada a dificuldade para o conhecimento de compostos aromáticos em várias etapas da ionização, e para prever a relação da fluorescência com o pH da amostra, em relação a compostos de estruturas desconhecidas.

Sabe-se que a dependência do pH, com as propriedades de fluorescência variam com a origem e natureza química de amostras de ácidos fúlvicos. Segundo Visser (1983) as unidades fluorescentes constituem-se somente em uma minoria nas substâncias húmicas e a investigação dessa minoria pode levar indiretamente, a informações valiosas acerca de características moleculares e aspectos quantitativos da química geral dessas substâncias. Contudo, as propriedades fluorescentes de amostras de ácidos fúlvicos e húmicos, aparentemente são dependentes de um número de parâmetros, incluindo sua origem, massa molecular, concentração, pH, potencial redox do meio e ainda sua interação com íons metálicos.

Dessa forma, a espectroscopia de fluorescência tem sido uma ferramenta bastante útil na quantificação, e principalmente, na caracterização de compostos húmicos de origens distintas, devido à presença de um grande número de grupos fluoróforos nesses compostos (De Souza Sierra, 1996). Por essa diversidade, a identificação da composição funcional e estrutural responsável pela fluorescência das SHA, os quais incluem aromáticos condensados devido a vários grupos funcionais e cadeias alifáticas insaturadas (Schnitzer & Khan 1972; Buffle 1988), não é trivial.

1.4 – Conclusões

Neste trabalho, técnicas espectroscópicas como infravermelho, fluorescência e absorção de luz no UV-Visível, RMN e RPE, foram aplicadas para análise de SHA. Estas técnicas forneceram informações qualitativas e quantitativas de moléculas, compostos orgânicos e inorgânicos, presentes na matéria orgânica natural.

A partir dos dados de RPE, mostrou-se que o nível de radicais livres do tipo semiquinona, para as amostras, foi da ordem de 10^{16} spins (g C^{-1}), amostras de SHA e AF e, da ordem de 10^{18} spins (g C^{-1}), amostra de AH, mostrando coerência com dados

disponíveis na literatura. Foram identificados ainda, íons Fe^{3+} em $g = 4,3$ e Mn^{2+} (em $g \approx 2,03$, com seis linhas hiperfinas) na amostra de ácidos fúlvicos.

O grau de humificação das amostras pôde ser obtido pela quantidade de radicais livres do tipo semiquinona, usando a técnica de RPE. Observou-se, que os AH, é a fração mais humificada enquanto que as SHA e os AF tiveram valores menores e semelhantes, o que é consistente e coerente pela determinação que mais de 90% das SHA é constituída por AF.

A partir da comparação dos dados obtidos por RPE e fluorescência confirmou-se que a amostra de ácidos húmicos foi mais humificada, quando comparada as demais amostras. O deslocamento do espectro de emissão dos AH (obtido por fluorescência), para maiores comprimentos de onda, também sugere a presença de anéis aromáticos condensados. Os AF e as SHA apresentaram deslocamento do espectro para menores comprimentos de onda, característicos de materiais que apresentam menor grau de conjugação das moléculas, sendo este resultado, novamente consistente com as observações obtidas por RPE.

Os valores da relação E_2/E_3 obtidos das amostras de AF e de SHA, mostraram valores elevados, quando comparados ao obtido para a amostra de AH, coerentes com menor humificação destas amostras. A partir dos dados de RMN de ^{13}C mostrou-se que nos AF e nas SHA, os graus de aromaticidade foram próximos, variando de 28 % a 26 % respectivamente, consistentes portanto com os dados obtidos por RPE e fluorescência de luz UV-Visível.

Os resultados obtidos por análise elementar, mostraram que o conteúdo dos principais constituintes C, H, N, S e O, encontrados nas amostras de AF e AH, e expressos como porcentagens de substância puras (livre de cinzas) encontram-se dentro dos intervalos referidos na literatura para amostras obtidas em ambientes

aquáticos. Amostras de AF aquáticos são mais ricos em grupos oxigenados, e portanto, apresentam caráter mais hidrofílico, quando comparados aos AF de solos. As amostras de AH apresentaram menor razão C/N, referindo-se a uma maior retenção de nitrogênio e maior grau de humificação. Nos outros casos as razões C/N foram similares (igual a 21,20 para as SHA e 21,42 para os AF), significando que os conteúdos de N foram próximos.

Os resultados obtidos, reforçam a importância de utilizarem-se, diversas técnicas independentes, para as características de materiais tão complexos e heterogêneos como as substâncias húmicas e demonstraram as potencialidades destas (técnicas) no estudo da estrutura e reatividade das substâncias húmicas, ressaltando o fato de que as interpretações de dados espectroscópicos não são diretas e nem triviais.

A amostra de SHA utilizada neste trabalho, foi extraída de uma região de área tropical, do Rio João Pereira em Bertioga/SP, localizado em uma área com vegetação diferenciada, coberta por florestas de restinga e mata atlântica. Estes fatores diferem, em grande parte, das amostras padrões (da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas, IHSS), as quais foram extraídas de pântanos que contêm extensivos depósitos de turfas. As SHA estudadas no presente trabalho, também diferem de muitas outras amostras caracterizadas internacionalmente, as quais foram extraídas de regiões temperadas. Esses fatores expressam portanto, a originalidade dos resultados aqui apresentados.

Dessa forma, considerando: i) a complexidade do sistema analisado; ii) de controvérsias na literatura sobre representatividade dos dados obtidos, com as substâncias húmicas aquáticas e de determinados parâmetros espectroscópicos, e ainda iii) a falta de estudos detalhados da matéria orgânica aquática, entende-se que

foi possível dar várias contribuições originais sobre o tema, quanto às características estruturais e espectroscópicas das SHA extraídas de um manancial de área tropical.

CAPÍTULO 2**FORMAÇÃO DE TRIHALOMETANOS NA PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS, DETECTADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA****2.1 Introdução**

As substâncias húmicas aquáticas (SHA) são importantes precursores na formação de subprodutos organoclorados, ao interagirem com desinfectantes utilizados em processos de tratamento de água, como por exemplo, o cloro (Mallevialle, 1996).

A presença das SHA em águas de abastecimento tem recebido, desde a década de 70, a atenção de inúmeros pesquisadores (Stevens et al., 1989; Mallevialle, 1996). Entre os aspectos negativos da presença elevada dessas substâncias, em mananciais destinados ao abastecimento público, citam-se:

- Confere cor à água;
- Certos compostos orgânicos causam odor e sabor indesejável em águas para abastecimento;
- A presença de compostos orgânicos biodegradáveis, na água tratada, pode ocasionar problemas de crescimento microbiológico em redes de distribuição e assim, prejudicar a sua qualidade;
- Podem interferir no processo de oxidação química do ferro e do manganês;

- Podem complexar, com determinados metais pesados aumentando assim, sua concentração em meio aquoso, podendo causar sérios danos à saúde pública;
- Ao serem expostos a agentes oxidantes e desinfetantes, geram subprodutos que podem ser tóxicos, cancerígenos, mutagênicos ou teratogênicos. Por isso, em elevadas concentrações e longos períodos de exposição podem causar danos à população;
- Causam maior demanda de cloro, caso a água bruta seja pré-clorada.

O tratamento convencional de águas para abastecimento, embora seja projetado para promover a eliminação de parâmetros convencionais (cor, turbidez, microrganismos patogênicos, etc...), possui a capacidade de remover, durante o processo de coagulação, eventuais compostos orgânicos, como as SHA presentes na água bruta. Até meados da década de 70, a grande preocupação ambiental quanto à presença de compostos orgânicos em águas naturais, era o controle da cor em águas de abastecimento, devido a razões de ordem estética (Singer, 1994). No entanto, a partir da descoberta de que os compostos orgânicos naturais presentes na água podem reagir com o cloro, permitindo a formação de compostos orgânicos halogenados, o enfoque passou a ser outro. O controle da cor real em águas para abastecimento é importante, mas também, a redução da concentração de compostos orgânicos, os quais são precursores de compostos organoclorados com potencial carcinogênico, ou de outros subprodutos como haloacetoneitrilas, haloacetonas, haloácidos, aldeídos de baixa massa molecular, etc (Singer, 1994).

Entre as alternativas mais recomendadas para reduzir a formação de compostos orgânicos halogenados em águas de abastecimento, citam-se (Singer, 1994):

- As remoções dos compostos orgânicos em águas de abastecimento, os quais são precursores de subprodutos da desinfecção ;
- As alterações dos pontos de aplicação dos agentes oxidantes, mudanças do agente oxidante ou combinações de ambos;
- Remoções dos compostos orgânicos halogenados totais, formados durante o processo de oxidação;

Para remover os compostos orgânicos halogenados, formados nos tratamentos das águas para abastecimento, require-se tecnologias sofisticadas e onerosas, tais como a aplicação de carvão ativado granular, processos de arraste com ar e processos com a utilização de membranas (Clark et al., 1994). No caso das substâncias húmicas, estas podem ser removidas através de processos de coagulação-floculação, oxidação química, adsorção em carvão ativado (granular ou em pó) e através de processos com a utilização de membrana (osmose reversa e nanofiltração). A escolha da melhor tecnologia para a remoção dessas substâncias, é determinada fundamentalmente por suas características físico-químicas e custos (Clark et al., 1994).

Embora numerosos estudos tenham sido dirigidos aos efeitos de diferentes agentes oxidantes em águas de abastecimento, suas aplicações em curto prazo, no cenário nacional, ainda não são razoáveis. A mudança do agente desinfetante aplicado, embora muitas vezes seja tecnologicamente viável, pode ser antieconômica e de difícil aplicação prática, não apenas pelas dificuldades técnicas que possam existir mas, principalmente pelo nível cultural inferior das equipes técnicas envolvidas nas etapas de produção, operação e tratamento de água.

Os riscos relacionados com os processos de oxidação na água estão muito mais associados com os subprodutos do que com os agentes utilizados (Daniel et al., 1990). Os estudos dessas reações de oxidação têm-se intensificado devido a esses subprodutos apresentarem potencial carcinogênico, estando sua formação intrinsecamente relacionada com a quebra de moléculas orgânicas. Alguns dos subprodutos formados na desinfecção de águas compreendem os trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos, haloacetonitrilas, halocetonas e aldeídos dentre outros (Stevens, 1989; Mallevialle, 1996; Korshin & Violleau, 2000).

Os trihalometanos encontrados na água para consumo humano, são membros da família dos compostos organohalogenados, como genericamente são designados os derivados halogenados. Nesses compostos, três, dos quatro átomos de hidrogênio são substituídos por três átomos de cloro, bromo ou iodo. Os principais subprodutos da cloração, que compõe a classe dos THM, são: bromofórmio, diclorometano, bromodiclorometano e clorofórmio, compostos químicos gerados a partir da reação da matéria húmica ou fúlvica com cloro (Batalha, 1994). Em águas contendo bromo, o cloro oxida o brometo para bromo (ácido hipobromoso) o qual reage com a matéria orgânica natural, produzindo os compostos bromados. A presença de ambos halogênios, cloro e bromo, levam a uma competição pela substituição dos átomos de carbono, presentes na matéria orgânica, com eventual produção de subprodutos contendo cloro, bromo ou uma mistura de ambos (Symons et al., 1993).

A descoberta de que o clorofórmio e outros THM são produzidos durante a cloração da água, ocorreu no início da década de 1970 (Bull, 1993; Singer, 1993). Esta informação revestiu-se de grande importância, em virtude da conclusão de um bioensaio sobre a carcinogenicidade do clorofórmio, realizado pelo “*National Cancer Institute*” (Singer, 1993). O resultado positivo desse bioensaio, levou

rapidamente ao estudo de um valor limite para a concentração máxima aceitável desses compostos. Em 1979, a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency-EPA) aconselhou que o limite máximo para a soma das concentrações dos THM(s) deveria ser da ordem de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, na água para consumo humano (Singer, 1993; Dodds et al., 1999).

A partir de 1974, estudos realizados nos EUA, mostraram pela primeira vez a correlação positiva entre águas de abastecimento público e o câncer (Rook, 1974). Várias pesquisas foram desenvolvidas desde então, das quais se destaca a realizada pela *U.S. Environmental Protection Agency (EPA)*, em 113 estações de tratamento de água (ETA). Trihalometanos foram encontrados em todas ETA's que utilizavam derivados clorados no processo de desinfecção (Melnick, 1989).

Com a divulgação, a partir de 1982, da presença de THM em refrigerantes (McNEAL et al., 1995) e da confirmação da correlação entre câncer e THM, alguns países adotaram um valor máximo para o total de trihalometanos (TTHM) em águas de abastecimento público, sendo que no Canadá foi de $350 \mu\text{g L}^{-1}$, na Alemanha foi ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), Holanda se estabeleceu ($75 \mu\text{g L}^{-1}$) e na França adotou-se ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).

O valor de referência da Organização Mundial da Saúde, para o conteúdo máximo de trihalometanos, se baseia na extrapolação do aparecimento de tumores em ratos submetidos à ingestão de água potável com clorofórmio, no período de dois anos. No ano 2000, a EPA estabeleceu como valor final, uma concentração máxima de $80 \mu\text{g L}^{-1}$.

No Brasil, somente a partir de 1990, pela Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990, do Ministério da Saúde, ficou estabelecido uma concentração máxima de

100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os THM (Brasil, 1990). A legislação vigente ressalta ainda que esse valor poderá ser revisto, em função de estudos toxicológicos em andamento.

Com a descoberta de que durante a desinfecção de águas, que apresentam substâncias húmicas (Rook, 1974), ocorre formação de subprodutos como os THM, as reações dessas substâncias com cloro e bromo se tornaram uma das principais preocupações de saúde pública (Jolley et al., 1985).

Segundo Dodds e colaboradores (1999), vários dos subprodutos identificados em amostras de água clorada, apresentam propriedades mutagênicas e, possivelmente teratogênicas. Os principais efeitos da exposição e ingestão desses subprodutos à saúde humana são: riscos de contrair câncer, particularmente de bexiga e cólon, problemas cardíacos, redução do peso fetal, aumento da mortalidade fetal, aborto espontâneo; anomalias congênitas, etc. Vários trabalhos nacionais têm divulgado a importância e as consequências da presença desses compostos em águas tratadas (Fernicola et al., 1984; Azevedo et al., 1987; Batalha 1994; Meyer, 1994; Tominaga, 1998 e 1999). Contudo, ainda é relativamente pouco conhecido o efeito real, para a saúde humana, da água para consumo que contenha esses compostos presentes em baixas concentrações, em ppb e ppt (Tominaga, 1999).

Desde a descoberta dos THM muitos dados têm sido coletados. Estudos epidemiológicos, particularmente em países desenvolvidos, têm sido feitos para avaliar a presença dessas substâncias orgânicas em água e sua correlação com o câncer (Deangelo, et al., 2002; Nissinen, et al., 2002; Joseph et al., 2003). Embora outros desinfetantes também produzam subprodutos com efeitos adversos à saúde, sem dúvida, a questão da cloração foi a mais estudada, existindo tecnologias disponíveis para a remoção dos precursores, como por exemplo, através de leitos de carvão ativado, com suficiente tempo de contato. Contudo, no Brasil, se conhece

muito pouco das investigações efetuadas, acerca dos níveis e da remoção dos trihalometanos, nos sistemas públicos de abastecimento de água e do vínculo da matéria orgânica aquática com estudos epidemiológicos que relacionaram o aumento da concentração dos THM com a elevação da incidência de câncer na comunidade.

A importância dos THM's em nível mundial prende-se ao fato de que, além de serem considerados carcinogênicos, são também indicadores da possível presença de outros compostos organoclorados (ácido acético clorado, haloacetoneitrilos, cloropicrin, clorofenóis, cloropropanonas), também resultantes do processo de cloração das águas e mais perigosos que os próprios THM's. Macedo (1997) comparou a formação de THM, quando no processo de desinfecção se utilizou o hipoclorito de sódio e o DCIS (dicloroisocianurato de sódio), demonstrando que o (DCIS), não leva a formação dessas substâncias.

É conhecido que a formação dos organoclorados aumenta com o aumento da quantidade de SHA. Também, as reações das SHA com cloro estão diretamente associadas com a absorbância no ultravioleta destas águas, e com o desaparecimento, durante cloração, da cor da água que contém a matéria orgânica. Isso, deve-se à reação do cloro com as moléculas responsáveis pela coloração, como estruturas aromáticas conjugadas ou outras estruturas aromáticas (Yamada et al., 1998; Pomes, 1999).

Estudos recentes têm mostrado que a formação de compostos halogenados pode ocorrer durante a degradação da matéria orgânica (Niedan et al., 2000). Sabe-se também, que os compostos aromáticos presentes nas substâncias húmicas, são substratos fortemente reativos em reações de substituição e oxidação. Ambas reações são típicas na cloração aquática, resultando na formação dos compostos organoclorados (Dianova et al., 2000). O cloro, uma vez introduzido na água pode

sofrer duas classes de reações principais, uma delas com compostos inorgânicos e a outra, com compostos orgânicos. Ambas reações são preocupantes sob o ponto de vista ambiental e de abastecimento público. Além disso, os resíduos inorgânicos do cloro, tanto no tratamento quanto após a descarga dos efluentes no ambiente, podem resultar também na formação de subprodutos organoclorados. Ao contrário das reações com espécies inorgânicas, os organoclorados são quantitativamente abundantes, formando um grupo de compostos com alto grau de toxicidade para os organismos, e de difícil degradação (Stevens, 1989).

O cloro é o agente mais utilizado, pois em qualquer dos seus diversos compostos, a temperatura ambiente e em tempo relativamente curto, neutralizam os organismos causadores de certas enfermidades (Dychdala, 1983; Azevedo et al., 1987; Meyer, 1994; Tominaga, 1999). O cloro é uma substância tóxica, por isso, um erro na dosagem pode acarretar sérios problemas, especialmente se utilizado em uma linha de produtos alimentícios, bebidas ou até mesmo medicamentos. Quando o cloro é utilizado em grande escala, na forma de gás, aumentam ainda mais os riscos operacionais, a segurança dos operadores e o controle das instalações. Isso implica altos investimentos no sistema de armazenamento, dosagem e câmaras de reação (Dianova et al., 2000). Por outro lado, quando utilizado em água de processo, sua ação residual interfere no sabor final dos alimentos processados, além de possibilitar, como mencionado anteriormente, a formação das substâncias organocloradas cancerígenas. A prática de descloração, algumas vezes utilizadas, encarece ainda mais o processo e não elimina os riscos já enumerados. Esse somatório de problemas resumido em toxicidade, risco e custo operacional, tem levado de modo crescente à substituição do cloro, por outras tecnologias mais seguras e ainda mais baratas.

Nas últimas décadas, muitos compostos orgânicos halogenados têm alcançado ambientes aquáticos de forma direta e indireta, como por exemplo, via efluentes industriais e lixívia de áreas comprometidas. Uma vez na água, os resíduos de organoclorados são distribuídos, sendo que uma parte é dissolvida e a outra adsorvida nos sedimentos, plantas aquáticas, plâncton, peixes, entre outros. A incorporação dos organoclorados às cadeias alimentares, sua biomagnificação e redução da diversidade de espécies, são os fatores imediatos que levam a prejuízos nos ecossistemas aquáticos naturais e à saúde pública. A preocupação com essa temática, pelas autoridades de saúde pública e ambiental dos principais países desenvolvidos, tem sido uma constante (Kraybill, 1981).

A Organização Mundial da Saúde nos seus documentos mais recentes sobre qualidade da água, alertou sobre 14 substâncias químicas de interesse à saúde pública pelas características cancerígenas, como: arsênico, 1,2-dicloroetano, cloreto de vinila, benzeno, pireno, acrilamida, alaclor, 1,2-dibromo-3-clopropano, 1,3-dicloropropeno, hexaclorobenzeno e subprodutos da desinfecção como bromatos, 2,4,6-triclorofenol, brodiclorometano e clorofórmio (Batalha, 2000).

A preocupação e conscientização com a utilização de novos métodos de desinfecção de águas naturais, que minimizem a formação de subprodutos, a conservação de mananciais, a manutenção de rios, como também a redução do impacto ambiental, têm sido consideradas como prioridades de pesquisa para este século e sua importância é inquestionável. Por um lado, a proteção dos recursos hídricos implica em proteção da saúde pública e na preservação da espécie, por isso; a necessidade de uma descontaminação é imediata e pode ser cara, além do fato de que descontaminar, pode não ser possível em alguns casos.

A busca de alternativas que minimizem a formação de THMs tem se intensificado (Karini et al., 1991; Li et al., 1996; Plummer et al., 1998; Caelson et al., 1998). Entre estas, encontra-se a utilização de dióxido de cloro (ClO_2), no lugar do cloro, por diminuir efetivamente a formação desses organoclorados, resultantes das reações do ClO_2 com as SHA (uma redução acima de 50% de THMs formados). Isso mostra que o ClO_2 reage com os constituintes húmicos das SHA, tornando-se pouco reativo na formação de THMs (Aieta et al., 1986; Li, et al., 1996; Levine et al., 1997). Entretanto, tanto o cloro quanto o dióxido de cloro, apresentam algumas limitações quanto ao uso no tratamento de água, como ilustrado no quadro 2.1.

É fato conhecido que o dióxido de cloro é um poderoso oxidante e desinfetante de água. Por isso, vem sendo considerado uma excelente alternativa no tratamento de águas para abastecimento público e também de águas residuais, que depois de submetidas a este processo podem ser reaproveitadas para diversos fins.

Em 1977, 103 instalações nos Estados Unidos e 10 no Canadá, estavam utilizando o dióxido de cloro para desinfecção de águas (Symons et al., citado por Aieta et al., 1986). Atualmente, este número aumentou para 300 a 400 instalações com o mesmo fim. Na Europa; estimam-se em mais de mil, por exemplo na Itália, o ClO_2 é o segundo agente químico mais utilizado para desinfecção de sistemas de abastecimento de água. No Brasil, ainda é largamente difundida a desinfecção de águas para o abastecimento público com cloro gasoso e hipocloritos, mas começam a surgir novas alternativas e entre elas o dióxido de cloro. Os primeiros geradores para produzir este poderoso oxidante e desinfetante, já começaram a ser instalados no país, tendo a cidade de Brusque (Santa Catarina) como a pioneira na aplicação deste agente químico (Ribeiro et al., 2002).

QUADRO 2.1 Vantagens e limitações na utilização de cloro e dióxido de cloro como desinfetantes de água

CLORO NA FORMA DE HIPOCLORITO DE SÓDIO	
<u>VANTAGENS</u>	<u>LIMITAÇÕES</u>
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Efetivo contra microorganismos patogênicos. ◆ Relativamente seguro durante armazenamento e uso. ◆ Quando obtido “on-site”, não requer transporte e nem armazenamento de produtos químicos 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Perda de atividade durante longos tempos de armazenamento ◆ Potencial perigo de emissão de cloro gasoso durante o armazenamento. ◆ Forma Trihalometanos
DIÓXIDO DE CLORO	
<u>VANTAGENS</u>	<u>LIMITAÇÕES</u>
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Pequenas concentrações, reduz formação de subprodutos, fontes desagradáveis (gosto e odores de fenóis) são destruídas. ◆ Oxidante e desinfetante efetivo de todos os tipos de microorganismos, incluindo cistos (Giárdia) e viroses. ◆ Facilita remoção de ferro e manganês da água por meio de sua rápida oxidação. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Somente geração “on-site”. ◆ Requer transporte e armazenamento de produtos químicos . ◆ Na reação com substâncias orgânicas, forma subprodutos não orgânicos (cloratos e cloritos). ◆ Custo maior comparado ao cloro.

* Adaptado de: <http://www.aquastel.com.br/interna/comparacao.htm>, 25/02/03

Uma das vantagens da aplicação do ClO_2 como desinfetante em efluentes domésticos tratados, é que as concentrações de trihalometanos formados são muito baixas. Este desinfetante não gera grandes quantidades de produtos halogenados, que são comuns com a cloração e reduz significativamente a cor e o odor dos

efluentes (Richardson et al., 1994). Águas residuárias que apresentam fenóis produzem clorofenóis na presença de cloro, os quais não são formados com dióxido de cloro (Lima, 1993). No entanto, Condie (1986) e Richardson (1994) afirmaram que o dióxido de cloro pode interferir com as funções da tireóide e produzir altos teores de colesterol em animais alimentados com baixa quantidade de cálcio e ricos em lipídios. Os dois subprodutos inorgânicos (ClO_2^- clorito e ClO_3^- clorato) formados a partir da interação do dióxido de cloro com compostos orgânicos, podem combinar com a hemoglobina causando a metemoglobinemia interferindo assim, na saúde humana. Dessa forma, as formações desses subprodutos devem ser monitoradas.

No geral, a seleção de alternativas desinfectantes é baseada em considerações como: qualidade de água, análises bacteriológicas, potencial de formação e desinfecção de subprodutos, efeitos à saúde, praticabilidade e custos. Outros controles de medidas são praticáveis, incluindo a remoção de THMs por carbono ativado, mas em muitos casos a remoção abrange custos efetivos maiores do que a prevenção. A ausência de THMs é, no entanto, somente uma das importantes componentes a serem consideradas na avaliação de riscos à saúde, associadas com alternativas oxidantes e desinfectantes (Levine et al., 1997).

2.2 Objetivos

Monitorar a formação do clorofórmio, em soluções contendo amostra de ácidos fúlvicos extraídos do Rio João Pereira, Bertioga/SP, na presença de cloro e dióxido de cloro.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Determinação da concentração dos oxidantes

➤ *Materiais utilizados*

- Espectrômetro (*Portable Datalogging Spectrophotometer Hach DR/2010, Standard Methods for the Examination of water and Waste Water*)
- Células de 25 mm com tampa (capacidade de 10 ml até a marca)
- Adaptadores

➤ *Reagentes utilizados*

- “*Pillows*” e ampolas com reagentes DPD (N,N-dietil-p-fenil-fenileno-diamina) para teste de cloro e dióxido de cloro (ativo e residual).

➤ *Descrição do método*

Os procedimentos experimentais para a determinação da concentração dos oxidantes foram os seguintes:

- 1) Coloca-se suporte para células dentro do compartimento (figura 2.1a)
- 2) Instala-se o adaptador *AccuVac* (figura 2.1b)
- 3) Coloca-se a cela (10 mL) dentro do compartimento (figura 2.1c)
- 4) Fecha-se o compartimento (figura 2.1d)

Figura 2.1 - Etapas a serem realizadas para medir a concentração de dióxido de cloro e cloro, utilizando-se o espectrômetro DR/2010.

2.3.2 Obtenção do dióxido de cloro

O dióxido de cloro foi obtido pela ativação de clorito de sódio (NaClO_2) com solução de ácido clorídrico (HCl). O clorito de sódio com ácido clorídrico, produzem solução aquosa de ClO_2 , de acordo com a seguinte equação estequiométrica:

Para a obtenção do dióxido de cloro, utilizou-se um gerador da Bello Zon® (figura 2.2). Trata-se de um equipamento pertencente ao Departamento de Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos da USP.

Figura 2.2 - Gerador de dióxido de cloro modelo Bello Zon® CDVa.

O gerador de dióxido de cloro Bello Zon® tem apresentado excelente conversão em torno de 90-95% (em relação à proporção estequiométrica), que pode ser alcançada sob condições de operação pré-determinadas. O gerador utilizado foi um Modelo CDVa, que apresenta as seguintes características:

- Taxa de produção 35 - 2000 g/h
- Bello Zon® CDVa trabalha com produtos químicos diluídos, utilizando ácido clorídrico na concentração de 9 % e clorito de sódio a 7,5 %.
- Um litro de cada um desses reagentes químicos forma 40 gramas de dióxido de cloro.

➤ *Dióxido de cloro ativo e residual*

Para a determinação da concentração do ClO_2 ativo e residual, foram adicionados reagentes analíticos específicos, glicina e DPD, empregando-se a espectrofotometria para obtenção dos resultados. Um volume de 10 mL de amostra, foi colocado em uma cubeta para calibrar o equipamento, fazendo-se o branco (figura 2.3). Foram adicionadas 4 gotas do reagente glicina solução (10%), agitou-se a solução e um “pillow” do reagente DPD cloro livre foi adicionado. Após 30 segundos, foi realizada a leitura com o aparelho previamente calibrado. A concentração de dióxido de cloro livre e residual foi determinada, na amostra, realizando-se a leitura em 530 nm. Quando o reagente DPD foi adicionado nas amostras, as mesmas desenvolveram uma coloração rósea, variando sua tonalidade de fraca a intensa, de acordo com a quantidade de oxidante existente. A cela foi então introduzida no aparelho e, através de uma tecla de leitura, pode ser obtido o teor do oxidante livre (ou total) em mg L^{-1} no visor digital do aparelho.

Figura 2.3 - Etapas realizadas para a determinação da concentração de dióxido de cloro.

2.3.3 Obtenção do cloro

Uma das maneiras mais usuais de utilização do cloro é na forma de hipoclorito de sódio (NaClO), o qual contém aproximadamente de 12 a 15% de cloro ativo (ou cloro livre), pois nem todo cloro pode ser liquefeito, e por isso, deve-se dispor de um meio para absorvê-lo.

O cloro ativo corresponde à concentração de cloro que realmente se pode contar como agente oxidante (agente de branqueamento e/ou bactericida). Entende-se por uma solução de NaClO de 12 a 15%, que a cada 100g de hipoclorito de sódio, teremos uma ação oxidante equivalente a mesma ação oxidante que 12 a 15 g de cloro (gás) teria (Martiniano, 1970).

Sabe-se que ao adicionar NaClO a uma amostra de água, parte do cloro ativo combina com eventuais substâncias orgânicas da água e/ou substâncias redutoras, propiciando ações de oxidação. Restará uma pequena quantidade de cloro que servirá de reserva caso esta água sofra alguma poluição. Esse cloro ativo, que ainda existe e de menor concentração, denomina-se cloro residual ou cloro disponível. Ao propiciar reações de oxidação, a quantidade de cloro ativo gasta nessas reações é denominada de demanda de cloro. Águas com menores teores de matéria orgânica têm menor demanda de cloro.

No presente trabalho, o cloro foi adicionado às soluções que contêm a matéria orgânica dissolvida, na forma de hipoclorito de sódio (NaClO 5%).

➤ *Cloro ativo e residual*

As leituras foram realizadas seguindo as indicações do manual do aparelho digital microprocessado (marca *Hach*, figura 2.1). Para a determinação da concentração de cloro realizou-se o procedimento ilustrado na figura 2.4.

Primeiramente, foi selecionado o programa específico para a leitura do teor de cloro na amostra. Em seguida, foram colocados 10 mL, da amostra, no compartimento. Posteriormente, foi colocada uma ampola “*AccUvac*” no recipiente contendo a amostra. Após quebrar a ponta da ampola, dentro do recipiente que contém a amostra até que esta estivesse completamente cheia, a mesma foi colocada dentro do espectrômetro para efetuar a leitura. A concentração do cloro, na solução, foi determinada realizando-se a leitura a 530 nm, sendo o resultado fornecido em mg L^{-1} de Cl_2 .

Figura 2.4 - Etapas realizadas para a determinação da concentração de cloro.

2.3.4 Cromatografia Gasosa

A manutenção da qualidade da água é, atualmente, uma das metas mais importantes buscadas pelos governos no mundo inteiro, pois a qualidade da água consumida por uma população se reflete na sua qualidade de vida, uma vez que na água podemos encontrar diversos tipos de poluentes sendo eles orgânicos ou inorgânicos. Contudo, a extração efetiva de traços de poluentes de amostra de água não é um procedimento fácil, uma vez que para se obter medidas quantitativas são necessários níveis de detecção muito baixos em relação aos níveis de detecção requeridos para outros tipos de amostras ambientais. Conseqüentemente, a extração e a quantificação de poluentes orgânicos em água potável tem sido objeto de vários trabalhos de desenvolvimento analítico (Daisey, et al., 1982, Barrionuevo, et al., 2001; Lacerda et al., 1999; Moreira et al., 2002; Deok-Hee, et al., 2003).

O clorofórmio é um dos principais trihalometanos produzidos das reações entre a matéria orgânica e o cloro (Brian, 1986). Seus efeitos crônicos estão associados à carcinogenicidade, danos ao fígado, rins e ao coração. Concentrações da ordem de 2 mg L^{-1} de clorofórmio apresentam resultados positivos em bio-ensaios do desenvolvimento de câncer (Calabrese, et al., 1991, Fawell, 2000).

Para o monitoramento de trihalometanos em água, é desejável um método de análise que apresente um limite de detecção abaixo de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Um método de análise utilizado com bastante eficácia, na detecção de baixas concentrações de trihalometanos em água, é a cromatografia gasosa, em conjunto com a detecção por captura de elétrons.

A cromatografia gasosa é um processo físico de separação, envolvendo processos de adsorção ou partição de um composto entre duas diferentes fases a móvel e a estacionária. Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás inerte como

He, H₂ e a fase estacionária mais utilizada é a líquida de alta massa molecular, depositada na superfície de partículas finamente divididas ou nas paredes de um longo tubo capilar. O fluxo do gás carregador é controlado por reguladores de pressão e válvulas medidoras de gás. A coluna é conectada ao sistema de injeção da amostra, o qual encontra-se uma temperatura suficiente para a sua volatilização; esta é carregada pelo gás através da coluna cromatográfica onde ocorre a separação e os componentes eluídos são analisados pelo detector o qual, por sua vez, deve ser insensível à fase móvel. A amostra é introduzida no cromatógrafo através de um sistema de injeção, em uma coluna contendo a fase estacionária (Lanças, 1993). O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra (injetor) e na coluna, possibilita a vaporização destas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, serão retidas por tempos determinados e chegarão à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna, torna possível a detecção e quantificação destas substâncias (Perry, 1981).

A função do detector em um sistema cromatográfico é acusar a presença e medir a quantidade dos componentes no efluente da coluna. Em um sistema de cromatografia gasosa o detector é, sem dúvida, o principal responsável pela quantidade mínima detectada, enquanto que, em princípio, cabe à coluna a responsabilidade de estabelecer a quantidade máxima (Lanças, 1993).

O detector por captura de elétrons (DCE) tem seu funcionamento baseado na captura de elétrons pela amostra, elétrons estes gerados pela ionização do gás de arraste por uma fonte radioativa. A medida em que o gás de arraste (geralmente nitrogênio) flui através do detector, uma lâmina contendo a fonte radioativa (3H ou 63Ni), ioniza as moléculas do gás e forma elétrons lentos. Uma molécula contendo

grupos que apresentam afinidade por elétrons sendo eluída da coluna junto com o gás de arraste, ao passar pelo detector irá capturar os elétrons livres produzidos na ionização do gás de arraste, diminuindo a corrente e ocasionando o aparecimento do sinal. Através de uma calibração apropriada pode-se determinar a concentração da amostra presente, com base na queda da corrente (Lanças, 1993).

O DCE é um detector seletivo, sensível (pode chegar a detectar picogramas de substância) e é não destrutivo. Tem sido empregado no estudo de haletos de alquila, nitrilos, nitratos, carbonilas conjugadas e, compostos organometálicos, sendo no entanto, bastante sensível a presença de hidrocarbonetos, álcoois, cetonas e várias outras classes de compostos orgânicos. Dessa forma, esse detector é usado com sucesso no estudo de certos compostos presentes ao nível de traços, tais como resíduos de agrotóxicos em alimentos (Lanças, 1993).

I - Micro extração em fase sólida

Após a Extração em Fase Sólida (EFS), uma técnica bastante vantajosa de extração quando comparada a métodos ortodoxos, surgiu um novo conceito entre as técnicas de extração que se utilizam de sorbentes: a Microextração em Fase Sólida MEFS (Araújo, 2001).

A MEFS é um método de extração utilizado para a determinação de compostos voláteis em água, como o clorofórmio. Uma das principais vantagens dessa técnica, é que os processos de extração e pré-concentração dos analitos, ocorrem em uma única etapa, como mostrada na figura 2.5. A técnica de MEFS consiste na sorção dos analitos em uma fibra (figura 2.6) de sílica fundida com pequeno diâmetro, revestida com um sorbente (fase estacionária). A fibra é introduzida diretamente na amostra

aquosa ou em seu “*headspace*”, extraíndo e concentrando o analito de interesse. Por partição, o analito é concentrado na superfície da fibra. É um método rápido, que não requer o uso de solventes (Barrionuevo et al., 2001). Posteriormente, a fibra com os analitos concentrados é transferida para o instrumento analítico, onde ocorre a dessorção, separação e quantificação dos analitos. A etapa de dessorção ocorre no injetor do cromatógrafo a gás.

Figura 2.5 - Etapas que consistem o processo analítico na MEFS.

Figura 2.6 - Partes que constituem o sistema de microextração por fase sólida.

Fonte: Arthur et al., 1992.

A introdução da fibra no “*headspace*” da solução, tem sido um procedimento muito utilizado para a determinação de compostos voláteis em diversas matrizes. A análise por este procedimento consiste em injetar-se, no cromatógrafo, a fração gasosa que está em contato e em equilíbrio com uma amostra líquida ou sólida. A extração baseia-se no equilíbrio entre os analitos presentes na amostra e na fase gasosa. Entretanto, esta é uma técnica utilizada para análise de compostos em concentrações baixas, em que o analito é necessariamente, mais volátil que a matriz, sendo determinado sem os interferentes da amostra (Loffe et al., 1983). O processo de extração envolve a partição entre os analitos e a fase estacionária. No equilíbrio, a quantidade extraída é proporcional à concentração do analito na amostra (Louch, et al., 1992).

As vantagens da micro extração em fase sólida em relação ao preparo da amostra são as seguintes: não utiliza solvente, tem alto poder de concentração (adequando-se com as sensibilidades dos detectores do cromatógrafo gasoso), é aplicável a muitos tipos de analitos e facilita o transporte do material extraído para o cromatógrafo.

A microextração em fase sólida (MEFS) tem sido indicada como o processo que reduz o tempo de preparo da amostra; elimina os erros da extração líquido-líquido e, os erros provenientes de injeção. Além destas vantagens, apresenta limite de detecção na ordem de 15 ppt (Arthur et al., 1992).

O sistema é constituído por uma haste de aço inoxidável com a ponta recoberta por uma fibra (fase sólida), e protegida por uma capa de aço inoxidável (agulha) que permite a exposição da fibra de maneira manual, através de um suporte metálico denominado “*holder*” ou de maneira automática, figura 2.7 (Arthur et al., 1992).

Figura 2.7 – Esquema mostrando o processo de imersão da fibra de MEFS

II. - Fibras utilizadas na MEFS

Diversos materiais, como cristal líquido e carvão ativado, são utilizados como fase estacionária para as fibras de MEFS. As primeiras fibras desenvolvidas comercialmente foram de polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA); estes polímeros possuem características apolar e polar, respectivamente. Recentemente foram desenvolvidas fibras com materiais poliméricos mais porosos como divinilbenzeno, carboxen e carbowax (Pawliszyn, 2000).

O tipo de fibra a ser utilizado depende da massa molecular e da polaridade dos compostos a serem extraídos. Compostos voláteis, como os THM, são extraídos pela fibra 100 mm polidimetilsiloxano (PDMS). A fibra de PDMS-100 μm é a mais utilizada, por possuir maior capacidade, ou seja, possui um volume de fase maior. A temperatura de operação desta fibra está entre 200 e 270 $^{\circ}\text{C}$, sendo indicada para extrações de compostos voláteis. Novas fibras, vem sendo desenvolvidas, para a determinação de muitos outros compostos tais como herbicidas em água (Lacerda et al., 2001).

Para a análise de compostos clorados, que contaminam amostras de água, a U.S. Environmental Protection Agency (EPA) indica o processo de imersão da

agulha, na amostra a ser analisada. A exposição da fibra dentro da amostra de água permite a adsorção dos compostos organoclorados pelo polidimetilsiloxano. O tempo de adsorção é definido em função de referências bibliográficas e da realização de um experimento preliminar. Este tempo, em geral, varia de dois a vinte minutos. O processo de dessorção ocorre após a exposição da fibra dentro do injetor. Este tempo também é definido com base em referências bibliográficas e em experimentos preliminares. O tempo de extração para organoclorados, segundo referências bibliográficas, varia de um a cinco minutos (Arthur et al., 1992).

III. Sistema cromatográfico

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo SHIMADZU 17A, com detector de captura de elétrons e um sistema de micro extração em fase sólida (MEFS), pertencente ao Laboratório de Cromatografia da USP-IQSC, São Carlos/SP.

IV. Otimização das condições experimentais para a extração do clorofórmio

Neste trabalho, o trihalometano analisado foi o clorofórmio. Para tanto, foi necessária a otimização das melhores condições de extração de uma amostra padrão desse composto. Inicialmente, preparou-se uma solução de clorofórmio, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em metanol e, em seguida, diluiu-se esta solução para $1 \mu\text{g L}^{-1}$, em água deionizada. A extração do clorofórmio foi feita utilizando-se um “holder” manual da Supelco (Bellefonte, PA, USA), com uma fibra de polidimetilsiloxano de $100 \mu\text{m}$. Antes do início as extrações, a fibra foi condicionada a 250°C (no injetor do cromatógrafo) por uma hora aproximadamente.

O tempo de extração foi otimizado, variando-se o tempo de imersão da fibra no “*headspace*” da solução. Pelo gráfico do tempo versus área determinou-se o melhor tempo de extração. Variou-se a temperatura de extração e, utilizando o gráfico da temperatura versus a área obtida, determinou-se a temperatura ótima. O último parâmetro otimizado foi o tempo de equilíbrio no “*headspace*”, ou seja, o tempo que a solução permanece com agitação (magnética) antes da introdução da fibra no “*headspace*” da solução. Pelo gráfico do tempo de equilíbrio versus a área, determinou-se o tempo de equilíbrio ótimo.

As extrações foram realizadas com solução padrão (5,0 mL) dos analitos, em um frasco de 10,0 mL com barra de agitação. A dessorção térmica dos analitos foi efetuada a 250 °C por 5 min, no injetor do cromatógrafo a gás com coluna CROMA-5 (30m x 0,25mm x 0,33µm). A programação da temperatura foi de 35°C (3 min.) a 4 °C min⁻¹ até 44 °C (6 min.) a 8 °C min⁻¹ até 150 °C. As melhores condições para a extração de uma amostra padrão de clorofórmio foram: 1)tempo de extração: 5 min; 2)temperatura de extração: 30 °C e 3) tempo de equilíbrio no “*headspace*” da solução: 10 min

V. Análise quantitativa em cromatografia

Na validação de uma metodologia é necessário escolher um método de quantificação que apresente vantagens como baixo custo, rapidez de análises, simplicidade, etc. Entretanto, esta escolha também depende de outros fatores como tipo de matriz, disponibilidade de padrões, número de amostras, etc.

Há vários métodos disponíveis para a quantificação de compostos, em trabalho sobre a validação de métodos analíticos, especificamente sobre quantificação, Krull e

Swartz (1998) relatam métodos quantitativos muito empregados nas técnicas cromatográficas, apresentando vantagens e desvantagens de cada uma.

Quantificação, por exemplo, é a habilidade em demonstrar a quantidade do analito presente na amostra. Para proceder a quantificação, é necessário usar uma dentre as seguintes técnicas (Araújo, 2001):

- Normalização;
- Normalização da área corrigida;
- *Padrão externo;*
- Padrão interno;
- Adição de padrão.

Neste trabalho foi empregado o método do padrão externo; a seguir são descritos aspectos gerais do método.

A concentração de um analito em determinada amostra não é uma grandeza física observável. Em um processo analítico, a concentração é obtida de forma indireta a partir de medidas de outras grandezas como absorção ou emissão de luz, ou no caso da maioria dos detectores da cromatografia gasosa, por condutividade. Antes da obtenção de valor de concentração – objetivo final da análise – é necessário encontrar uma função que relacione as medidas efetuadas com a concentração procurada, procedimentos denominados calibração (Araújo, 2001).

A calibração consiste em duas etapas. Na primeira etapa, as medidas são feitas utilizando-se uma série de padrões analíticos de concentrações conhecidas que são usados para construir um modelo, também conhecido como gráfico de calibração ou curva analítica. Na segunda etapa emprega-se o modelo para prever a concentração do analito desejado na matriz, a partir das medidas realizadas (Pimentel 1996).

No método do padrão externo utilizado, uma curva de calibração foi construída utilizando-se no mínimo cinco concentrações conhecidas de solução padrão da amostra a ser analisada e preparada separadamente no mesmo solvente que foi utilizado na amostra. Neste trabalho utilizou-se uma solução padrão de clorofórmio para as análises.

Fazendo-se um gráfico das concentrações no eixo X e suas respectivas áreas cromatográficas (ou altura do pico) no eixo Y, com a média aritmética de três injeções, determinou-se uma equação da curva analítica (equação da reta) de forma geral $Y = A + BX$, onde Y corresponde ao valor da área (ou altura do pico) registrada, X é o valor da concentração do padrão, A e B são os coeficientes angular e linear da reta, respectivamente.

A concentração do analito em questão em uma amostra real é determinada após a injeção do extrato obtido por uma técnica de extração selecionada, e o cálculo da concentração é realizado através da equação da reta, com o valor da área do pico encontrado no mesmo tempo de retenção do padrão.

VI. Gráfico de Calibração

Depois de determinadas, a condição ótima construiu-se um gráfico de calibração. Para isto, preparou-se uma solução de clorofórmio padrão, em metanol, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. A partir desta, foram preparadas soluções em água deionizada com várias concentrações. As concentrações utilizadas para a construção do gráfico de calibração foram de 0,005; 0,010; 0,020 e $0,050 \mu\text{g L}^{-1}$. Depois de realizadas as extrações, em diferentes concentrações, pode-se fazer uma curva de calibração, que foi utilizada para a quantificação de amostras cujas concentrações eram desconhecidas.

A figura 2.8 ilustra o gráfico de calibração obtido a partir das extrações das soluções padrões de clorofórmio em diferentes concentrações. O coeficiente de correlação foi de 0,994.

Figura 2.8: Gráfico de calibração de uma solução padrão de clorofórmio

VII. Validação

A validação de metodologias analíticas é um processo pelo qual um método é testado com base nos dados obtidos quanto a sua confiabilidade, trabalho que pode ser realizado pelo analista responsável em desenvolvê-lo ou mesmo por um usuário (Araújo 2001). Normalmente os seguintes itens são estudados : seletividade, precisão (%DPR), exatidão, recuperação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), Bressole et al., 1996.

No presente trabalho foram avaliados os seguintes itens: *Precisão*, *Limite de Detecção* e *Limite de Quantificação*. A seguir definem-se os conceitos utilizados na validação e forma de cálculo de cada uma das nomenclaturas relacionadas.

Precisão (repetibilidade)

A precisão expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra. A precisão reflete o desvio apresentado pelo método, ou seja, a variação nos resultados quando análises repetidas são efetuadas na mesma amostra. É possível a obtenção de um valor numérico dado pelo desvio padrão relativo (RSD). Este foi determinado calculando-se o desvio padrão obtido pela média das áreas de cada composto em 3 extrações independentes no mesmo dia. Numericamente é calculado pela seguinte fórmula (Simplicio et al., 1999):

$$RSD = \frac{S}{x} \times 100(\%)$$

onde: $S = [\sum (x_i - x_m)^2 / n - 1]^{1/2}$, $x_m = \sum x_i / n$

n = número de repetições

x_i = número de medidas individuais

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor quantidade de analito detectável, nas condições experimentais estabelecidas para a metodologia, não necessariamente quantificada como valor exato. Corresponde à concentração produtora de sinal medindo três vezes o nível de ruído médio medido (Green 1996). O limite de quantificação corresponde a menor quantidade de analito passível de quantificação com exatidão e com uma fidelidade determinada. Pode também ser definido como dez vezes o sinal do ruído (Francotte et al., 1996).

Neste trabalho, para a determinação do limite de detecção e quantificação uma série de soluções com concentrações variadas do padrão de clorofórmio foram

analisadas. Dos cromatogramas obtidos foi selecionado o pico (referente ao composto de interesse) cuja altura (h_s) foi três vezes maior do que o ruído (h_n) da linha de base. O ruído na linha de base (h_n) foi determinado como a variação máxima do ruído no tempo de retenção do composto de interesse, sendo medido em milímetro (mm). O tempo de obtenção do sinal (ruído na linha de base) é equivalente a 20 vezes a largura do pico na base, sendo 10 antes do tempo de retenção do composto e 10 após o mesmo.

O limite de detecção e quantificação, são definidos como:

$$LD = \frac{C_s \times 3 h_n}{h_s} \quad \text{ou} \quad LD = 3 \times N$$

$$LQ = \frac{C_s \times 6 h_n}{h_s} \quad \text{ou} \quad LD = 10 \times N$$

onde:

C_s é a quantidade injetada do analito e N corresponde ao ruído. Os valores de LD e LQ são expressos em unidades de concentração.

A tabela 2.I mostra os valores dos limites de detecção e quantificação determinados para uma solução padrão de clorofórmio.

Tabela 2.I: Limite de detecção e quantificação.

Composto	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	RSD (%)
Clorofórmio	0,002	0,006	1,6

2.3.5 Obtenção das soluções contendo a matéria orgânica dissolvida na presença de cloro e dióxido de cloro

Uma vez verificado que as substâncias húmicas aquáticas são predominantemente formadas pelos ácidos fúlvicos, optou-se por trabalhar com esta fração, na realização dos experimentos. Foram preparadas soluções contendo a matéria orgânica dissolvida, no caso a fração fúlvica extraída do Rio João Pereira, em Bertioxa/SP.

A cloração das amostras de AF foi feita em sistema tampão fosfato (0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$), à temperatura ambiente entre 20 e 25 °C. Todas as amostras foram colocadas em frascos de vidro escuro, para protegê-las contra a radiação solar, que poderia degradar o oxidante presente. Ácido ascórbico foi utilizado para, quando necessário, parar a reação de oxidação. A concentração do carbono orgânico dissolvido (COD) foi medida utilizando um equipamento SHIMADZU TOC-5000A, e as concentrações dos oxidantes, seguindo procedimentos descritos no item 2.3. Os experimentos foram realizados preparando-se soluções nas seguintes condições:

- *Concentração dos oxidantes* $\Rightarrow$ 1,25 mg L⁻¹, 2,50 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ (tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente);
- *Tempo de reação* $\Rightarrow$ 1, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas ;
- *Valores de pH* $\Rightarrow$ 5; 7; 9 e 11;
- *Concentração dos ácidos fúlvicos* $\Rightarrow$ variando de 1 a 5 mg L⁻¹.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: influência da concentração dos ácidos fúlvicos, da concentração dos oxidantes, do pH da solução e do tempo de reação, na formação do clorofórmio.

2.4 - Resultados e discussões

2.4.1 - Variação do tempo de reação e concentração dos oxidantes

A figura 2.9 ilustra os cromatogramas obtidos para soluções de ácidos fúlvicos na presença de cloro e dióxido de cloro e para uma solução padrão de clorofórmio. Ambos cromatogramas (amostras com cloro e dióxido de cloro) apresentam um pico, com tempo de retenção entre 2 e 4 min, que possivelmente possa estar relacionado com a formação do clorofórmio, após a reação com os ácidos fúlvicos.

Figura 2.9 Cromatogramas obtidos para uma solução de ácidos fúlvicos contendo dióxido de cloro e cloro e para uma solução, padrão, de clorofórmio. Condições: amostra de ácidos fúlvicos a 4 mg L^{-1} e oxidantes na concentração de 5 mg L^{-1} a pH 7, após 24 horas de reação. Amostra padrão de clorofórmio a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$.

Na figura 2.10 apresenta-se uma comparação do conteúdo de clorofórmio formado para amostras de AF em solução, na presença de cloro e dióxido de cloro. Um dos fatores que contribuem para a formação dos organoclorados, é a concentração do oxidante e o tempo de reação. Nas condições aplicadas, neste trabalho, como utilização de uma amostra de ácidos fúlvicos extraídos de um

manancial de área tropical, isto também pode ser confirmado pelos resultados apresentados na figura 2.10.

Figura 2.10 – Variação do conteúdo de clorofórmio formado, com a variação do tempo de reação. Em (a) amostras de AF na presença de cloro e em (b) amostras de AF na presença de dióxido de cloro. Condições experimentais: soluções de AF a 4 mg L^{-1} , pH 7,0. Concentração dos oxidantes: tratamento (1) 1,25 mg L^{-1} ; (2) 2,50 mg L^{-1} ; (3) 5 mg L^{-1} ; (4) 10 mg L^{-1} e (5) 20 mg L^{-1} .

Observou-se que a formação do clorofórmio aumenta com o aumento do tempo de reação, até um período de 24 horas do seu início. Pode-se observar também que ocorreu um máximo de formação do clorofórmio, neste período, para ambos oxidantes, atingindo aproximadamente 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as amostras com cloro e 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as amostras com dióxido de cloro (tratamento 1 com 1,25 mg L^{-1} dos oxidantes). Para as amostras com 20 mg L^{-1} dos oxidantes (referente ao tratamento 5), foi observada a formação de 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorofórmio, para as amostras com cloro e de 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as amostras com dióxido de cloro. Portanto, neste período, houve uma redução extremamente significativa na formação do clorofórmio, quando o dióxido de cloro foi utilizado, sendo 35 vezes menor para o

tratamento 1 e 60 vezes menor, para o tratamento 5. Estes resultados certamente fornecem algumas opções operacionais para o tratamento de água potável. Foi observado portanto, o mesmo processo de formação do clorofórmio com a utilização dos oxidantes, em um período de reação de 24 horas, variando-se no entanto, apenas em magnitude.

Com o aumento da dose dos oxidantes, não foram observadas mudanças drásticas, na formação do clorofórmio, ocorrendo um decréscimo após 24 horas do início da reação. Depois de um período de 168 horas de reação, ainda foi constatada a presença de clorofórmio, quando ambos oxidantes foram utilizados. Entretanto, o nível detectado foi extremamente inferior para as amostras com dióxido de cloro. No caso do tratamento 5, por exemplo, o conteúdo de clorofórmio detectado, após 168 horas, foi da ordem de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ para a amostra com dióxido de cloro, enquanto que na amostra com cloro o conteúdo foi de $\sim 1,65 \mu\text{g L}^{-1}$, para o mesmo tratamento. Estes resultados, ou seja, menores conteúdos de clorofórmio formado, em soluções na presença de dióxido de cloro, são concordantes com dados apresentados por Korn, et al., (2002).

As figuras 2.11a e 2.11b ilustram uma comparação do conteúdo de clorofórmio formado, variando-se a concentração dos oxidantes. Após um período de 24 horas de reação, observa uma redução do conteúdo de clorofórmio, de mais de 98%, para as amostras contendo dióxido de cloro.

Figura 2.11 - Conteúdo de clorofórmio formado variando-se a concentração dos oxidantes. Em (a) tempo de reação 24 horas e em (b) tempo de reação 168 horas. Amostras de AF a 4 mg L⁻¹ e soluções a pH 7.

A tabela 2.I mostra os valores de COD obtidos para os diferentes tratamentos. Utilizando-se os dados da tabela 2.I, construiu-se os gráficos das figuras 2.12 e 2.13 os quais mostram uma comparação entre o conteúdo de clorofórmio formado, e a variação das razões molares [Cl₂/COD] e [ClO₂/COD], após 24 horas e 168 horas do início da reação.

Tabelas 2.II - Conteúdo de COD obtido para os diferentes tratamentos, na presença dos oxidantes, após 24 horas e 168 horas de reação. Soluções a pH 7 e AF na concentração de 4 mg L⁻¹.

Tratamento	COD (mg L ⁻¹) após 24 horas		COD (mg L ⁻¹) após 168 horas	
	AF + Cl ₂	AF + ClO ₂	AF + Cl ₂	AF + ClO ₂
1	2,47	2,50	2,16	1,73
2	2,40	2,20	1,97	1,73
3	2,45	2,20	2,04	1,85
4	2,80	2,30	2,45	2,04
5	2,91	2,30	2,30	1,61

Figura 2.12 – Conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação da taxa [Cl₂/COD]. Amostra de AF a 4 mg L⁻¹. Tempo de reação: em (a) 24 horas e em (b) 168 horas, soluções a pH 7.

Figura 2.13 – Conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação da taxa $[\text{ClO}_2]/[\text{COD}]$. Amostra de AF a 4 mg L^{-1} . Tempo de reação: em (a) 24 horas e em (b) 168 horas, soluções a pH 7.

O aumento das razões molares $[\text{oxidante}]/[\text{COD}]$, também contribuíram para maior formação do clorofórmio sendo que para as amostras na presença de cloro e após 24 horas, o aumento foi de 5 µg L^{-1} (menor razão molar) para 12 µg L^{-1} (maior razão molar). No caso das amostras com dióxido de cloro, este aumento foi de $0,14 \text{ µg L}^{-1}$ (menor razão molar) para $0,2 \text{ µg L}^{-1}$ (maior razão molar), durante o mesmo período.

Após 168 horas, a presença do clorofórmio ainda foi detectada nas amostras, apresentando a tendência a um aumento do conteúdo, com o aumento da razão molar $[\text{oxidante}]/[\text{COD}]$. Na presença de cloro e após 168 horas, o aumento foi de $0,2 \text{ µg L}^{-1}$ (menor razão molar) para $1,6 \text{ µg L}^{-1}$ (maior razão molar). No caso das amostras com dióxido de cloro, este aumento foi de $0,01 \text{ µg L}^{-1}$ (menor razão molar) para $0,13 \text{ µg L}^{-1}$ (maior razão molar), durante o mesmo período.

2.4.2 - Variação do conteúdo de ácidos fúlvicos e pH da solução

Nas figuras 2.14 e 2.15 apresentam-se as variações do conteúdo de clorofórmio formado, em diferentes valores de pH e concentração de AF, respectivamente.

Figura 2.14 – Conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação do pH da solução. Condições experimentais: amostras de AF a 4 mg L⁻¹ e oxidantes a 5 mg L⁻¹. Tempo de reação: 24 horas.

Figura 2.15 – Conteúdo de clorofórmio formado, em função da variação da concentração dos AF. Condições experimentais: dose dos oxidantes a 5 mg L⁻¹, tempo de reação de 24 horas e soluções a pH 7.

Pôde ser observado maior formação de CHCl_3 , com o aumento do pH e aumento do conteúdo de AF. Com a variação do pH de 5 para 11, o aumento do conteúdo de clorofórmio foi de $\sim 5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para $\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$, para as amostras com cloro e de $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ para $0,34 \mu\text{g L}^{-1}$ para as amostras com dióxido de cloro. Aumentando-se o pH ocorre maior formação de THM, em função da reação clássica “halofórmica” ser catalizada por uma base (Symons et al., 1975). O aumento do conteúdo de AF na solução, proporcionou um aumento do clorofórmio $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para $9 \mu\text{g L}^{-1}$, para as amostras com cloro e de $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ para $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ para as amostras com dióxido de cloro.

Em sistemas de tratamento de água, a correção do pH é um método para prevenir corrosão de encanamentos. Tal correção, consiste na alcalinização da água, com a finalidade de remover o gás carbônico livre, através da adição da cal elevando-se o pH em torno de 6,50 a 9,50 (recomendado). Esta faixa de pH torna-se preocupante, visto que nos resultados apresentados na figura 2.14, o aumento dos valores de pH, induz a maior formação do clorofórmio. Entretanto, ao compararmos os dois oxidantes, o dióxido de cloro apresentou valores menores de clorofórmio formado, tanto com o aumento do pH (que foi de no máximo $0,34 \mu\text{g L}^{-1}$ a pH 11), quanto com o aumento do conteúdo de AF (que foi de no máximo $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ para a amostra com maior conteúdo de AF). Sendo assim, o dióxido de cloro pode constituir-se em uma alternativa promissora na oxidação de águas destinadas ao abastecimento público.

Sabe-se que na reação inicial entre o cloro e a matéria orgânica natural, grande parte do cloro que reage é incorporado dentro das moléculas orgânicas. Contudo, devido às condições da reação (tempo de reação, ou aumento da concentração de

cloro), cada vez menos Cl_2 que reage, é incorporado nas moléculas da matéria orgânica natural. Ao invés disto, a maior parte, se não todo o Cl_2 que reage nesse processo é reduzido a Cl^- , sendo incorporado na solução (Li et al., 1998).

As reações entre o Cl_2 e os ácidos fúlvicos, consistem em sucessivas hidrólises e halogenações. Sabe-se, por exemplo, que o cloro reage com as estruturas moleculares responsáveis pela coloração da água, como as cadeias aromáticas conjugadas com cetona ou outras cadeias aromáticas. Isso resulta no desaparecimento da coloração, após a cloração.

Segundo Yamada et al., (1998) e Li et al. (1996), o cloro ataca preferencialmente na posição entre duas hidroxilas ($-\text{OH}$), em anéis aromáticos meta-hidroxi presentes na matéria orgânica aquática, formando anéis (1,3-ciclohexadiona), sendo estes, particularmente efetivos na produção dos THM.

Reckhow e colaboradores (1990) mostraram que o consumo do cloro e a produção dos THM são proporcionais ao conteúdo de carbonos aromáticos presentes na matéria orgânica natural. Em geral os compostos aromáticos susceptíveis a reações, ou seja ricos em elétrons, apresentam alta reatividade com o cloro. Dessa forma materiais húmicos com grande número de centros aromáticos são mais reativos com este oxidante. Galapate e colaboradores (2001) verificaram que a oxidação de sítios reativos, tais como meta-dihidroxi benzeno (indicado pelo decréscimo de grupos fenólicos, $-\text{OH}$), diminuem a reatividade da matéria orgânica dissolvida, em termos de produção de THM.

A tentativa de se explicar os mecanismos de reação que levam à formação de THMs em águas naturais, tem sido uma constante. Entretanto, tais informações ainda são limitadas. Sabe-se que advém da propriedade do cloro em oxidar os brometos e iodetos presentes na água e da capacidade destes halógenos em reagirem com a

matéria orgânica, formando assim os correspondentes THMs (Li, et al., 1996; Yamada et al., 1998).

Entre os mecanismos de reação citados na literatura, destaca-se o que ocorre com a estrutura do tipo resorcinol, ilustrado na figura 2.16. Segundo Rook (1979), é a estrutura presente no material húmico, que mais favorece a formação dos THM's. Por sua vez, a estrutura do tipo pirrol (quadro 2.2) tem grande importância por estar presente em muitas substâncias naturais, como por exemplo na clorofila.

metahidroxifenol (Resorcinol)

Figura 2.16 Estrutura do tipo resorcinol, considerada como capaz de formar o clorofórmio, a partir da reação do cloro com ácidos fúlvicos.

O quadro 2.2 mostra algumas das estruturas consideradas como capazes de formar THM's (Sampaio, 1989). O triclorometano (clorofórmio), bromodiclorometano, dibromoclorometano e tribromometano são os principais compostos oriundos dessas reações.

Quadro-2.2 Estruturas consideradas como capazes de formar THM's

Acetila

Beta-cetoester

Dicetona

metahidroxifenol (Resorcinol)

1,3- dicetona ciclohexano

Pirrol

* Fonte : Sampaio (1989).

O mecanismo proposto por Rook e colaboradores (1979), mostra que na estrutura do tipo resorcinol, o cloro ataca preferencialmente a posição entre duas hidroxilas, formando compostos 1,3-ciclohexadiona, os quais são considerados como extremamente efetivos para a formação do clorofórmio (figura 2.17).

A reação é influenciada por algumas variáveis como: tipo de oxidante, concentração de SHA, temperatura, pH e residual do oxidante (Sampaio Pereira, 1989). A formação de organoclorados aumenta com o aumento da quantidade de SHA, seguindo uma reação de primeira ordem, além de estar diretamente associada com a absorbância no ultravioleta, dessas águas.

Figura 2.17 – Mecanismo de formação do clorofórmio, a partir da estrutura do tipo resorcinol.

**Fonte: Rook (1979).*

No caso do dióxido de cloro, tem sido sugerido que maiores concentrações desse oxidante, aumenta a possibilidade de reações com grupos (-OH, -OCH₃), os quais compõem a estrutura dos precursores orgânicos. Uma possível razão para este fato, é que o dióxido de cloro somente quebra estruturas moleculares grandes em estruturas pequenas (Chang, et al., 2001).

Chang e colaboradores (2000), mostraram que o percentual residual de ácidos húmicos decresce com o aumento da dosagem de dióxido de cloro, entretanto, a porcentagem residual de carbono orgânico dissolvido aumenta. Isso indica o aumento da decomposição das moléculas que compõem a estrutura dos ácidos húmicos, pelo forte poder oxidante do dióxido de cloro, em altas concentrações. Segundo os autores, vários grupos funcionais presentes na molécula orgânica, tais como grupos

hidroxil (R-OH), carbonil (-CO), carboxil (-COOH), fenólicos e grupos quinona reagem igualmente com o ClO_2 .

Segundo Swietlik e colaboradores (2002), os produtos finais da oxidação de moléculas orgânicas presentes na água, ou seja, ligninas e compostos húmicos por dióxido de cloro, são quinonas e ácidos mono e di-carboxílicos. Eles são formados devido as reações proporcionarem uma ruptura na cadeia aromática. Durante este processo não são formados odores de clorofenóis. O dióxido de cloro é também capaz de oxidar compostos orgânicos do grupo metoxil para grupos hidroxílico alifáticos (Demin et al., 1999). Subprodutos inorgânicos, da desinfecção com dióxido de cloro, como os cloritos e cloratos, são formados e devem ser monitorados.

Segundo Colclough e colaboradores (1983), na reação entre o dióxido de cloro e os ácidos fúlvicos, foram identificados compostos como metil éster, por cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que os produtos identificados depois da oxidação a menores valores de pH, não diferem significativamente dos encontrados a maiores valores de pH. Ácidos orgânicos, similares a estes identificados por Colclough et al., (1983), têm sido isolados como produtos de oxidação prévia de materiais húmicos com permanganato e cloro (Christian et al., 1981).

De acordo com estudos realizados nas proximidades de pH neutro, para uma solução contendo AF aquáticos e ClO_2 , a reação é limitada e poucos produtos clorados são produzidos. Estas características fazem do dióxido de cloro, uma alternativa oxidante muito atrativa, embora a proposta de tratamento com dióxido de cloro seja produzida igualmente, pela ativação do cloro, em soluções de cloreto de sódio.

Em geral, o dióxido de cloro reage primeiramente por reações de oxidação, resultando na formação de poucos compostos orgânicos, voláteis ou não voláteis, nos quais os átomos de cloro têm sido incorporados. Em contraste, o cloro reage com compostos orgânicos por oxidação e substituição eletrofilica, resultando em uma variedade de subprodutos orgânicos clorados.

Um dos mecanismos propostos na literatura, para a interação do dióxido de cloro com compostos orgânicos está ilustrado na figura 2.18.

Figura 2.18 – Mecanismos de interação do dióxido de cloro com compostos orgânicos.

*Fonte: Cao et al., (2001).

Cao e colaboradores (2001) mostraram que na reação entre o dióxido de cloro e grupos fenólicos, a pH 7, o fenol é completamente consumido, eliminando todos os produtos clorados. Substâncias hidrofóbicas, com estruturas insaturadas na cadeia, podem necessitar de grandes concentrações de dióxido de cloro, para reagir com esses grupos funcionais (Goel et al., 1995). Segundo Chang e colaboradores (2001), o dióxido de cloro reage com substâncias orgânicas hidrofóbicas destruindo, assim, o

anel benzeno e grupos funcionais insaturados. Mas, por outro lado, não procede com a mineralização para decompor substâncias orgânicas em carbono inorgânico, pela oxidação e redução do COD.

2.5 Conclusões

O monitoramento da formação do clorofórmio, após a interação da matéria orgânica dissolvida, com cloro e dióxido de cloro, pode ser feito, utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa. A partir dos experimentos observou-se um pico de máxima formação, para este trihalometano, no período de 24 horas do início da reação, para ambos oxidantes, para um período de análises de até 168 horas. Este resultado sugere cuidados operacionais em sistemas de abastecimento de água, quando esta for distribuída a população. Após 24 horas de reação a formação do clorofórmio, nas amostras com dióxido de cloro, foi mais de 60 vezes menor quando comparado às amostras com cloro.

O aumento das razões molares [oxidante]/[COD], também contribuíram para maior formação do clorofórmio sendo que para as amostras na presença de cloro e após 24 horas, o aumento foi de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (menor razão molar) para $12 \mu\text{g L}^{-1}$ (maior razão molar). No caso das amostras com dióxido de cloro, este aumento foi de $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ (menor razão molar) para $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ (maior razão molar), durante o mesmo período. Após 168 horas, a presença do clorofórmio ainda foi detectada nas amostras, apresentando a tendência a um aumento do conteúdo, com o aumento da razão molar [oxidante]/[COD]. Na presença de cloro e após 168 horas, o aumento foi de $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ (menor razão molar) para $1,60 \mu\text{g L}^{-1}$ (maior razão molar). No caso das amostras com dióxido de cloro, este aumento foi de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (menor razão molar) para $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ (maior razão molar), durante o mesmo período.

Mostrou-se que o aumento da formação do clorofórmio, também ocorre para amostras a maiores valores de pH e com maior concentração de ácidos fúlvicos. No caso das amostras com cloro, este aumento foi de 5,0 mg L⁻¹ (amostra a pH 5), para ~10 mg L⁻¹ de clorofórmio (amostra a pH 11). Para as amostras com dióxido de cloro, o aumento foi de ~0,10 mg L⁻¹ (amostra a pH 5), para 0,34 mg L⁻¹ (amostra a pH 11). Quando se variou a concentração dos ácidos fúlvicos nas amostras, a formação do clorofórmio foi de aproximadamente 9 mg L⁻¹, para a amostra com maior concentração de AF (5 mg L⁻¹) e na presença de cloro. Para a amostra com dióxido de cloro, essa formação foi de 0,31 mg L⁻¹. O dióxido de cloro portanto, mostrou-se muito mais eficiente quando comparado ao cloro, quanto ao poder de oxidação da matéria orgânica e principalmente quanto a menor formação do clorofórmio.

Os resultados obtidos proporcionaram um melhor entendimento sobre a formação do clorofórmio, em soluções de ácidos fúlvicos tratados com cloro e dióxido de cloro, mostrando as características de formação e a influência da variação de fatores como tempo de reação, pH, conteúdo de AF bem como do tempo de reação. Fica evidente portanto, a importância de estudos e alternativas oxidantes que minimizem e até mesmo bloqueiem a formação dos organoclorados com potencial carcinogênico. Os experimentos também contribuíram para um melhor entendimento sobre as características das substâncias húmicas aquáticas, extraídas de um manancial de área tropical, na presença e ausência de alternativas oxidantes como o cloro e o dióxido de cloro. Essas informações poderão contribuir para o desenvolvimento de novos processos ou ajustes nos procedimentos do tratamento de água.

CAPÍTULO 3**MECANISMOS DE REAÇÕES DE SHA E TRIHALOMETANOS DETERMINADOS POR ESPECTROSCOPIA E CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO MOLECULAR****3.1 Influência do cloro e do dióxido de cloro sobre cromóforos e fluoróforos presentes em uma amostra de ácido fúlvico aquático tropical, detectado por fluorescência e absorção de luz no UV-Visível.**

A matéria orgânica natural é tipicamente composta pelas substâncias húmicas. Estas, por sua vez, são operacionalmente definidas como uma classe de polímeros com massas moleculares variando de <1000 a >100000 Da (Thurman, 1985).

As substâncias húmicas contêm uma quantidade substancial de unidades aromáticas tais como, grupos hidroxilas, carboxílicos e metoxílicos, os quais são comumente denominados de poli-hidroxi-aromáticos, PHA, (Stevenson et al., 1982). Esses compostos são subprodutos com potencial carcinogênico, resultante da interação entre as substâncias húmicas aquáticas e oxidantes utilizados no tratamento de água.

Os PHA são considerados como importantes substratos em reações de halogenação, tais como, estruturas aromáticas β -di-cetonas (do tipo resorcinol, ácidos 3,5-di-hidroxibenzeno), os quais são provavelmente muito importantes na geração dos trihalometanos, e possivelmente, de ácidos haloacéticos (Boyce e Horning 1983; Reckhow et al., 1990).

A importância da atividade aromática (especialmente de grupos β -di-cetonas), na geração dos trihalometanos, tem sido evidenciada por experimentos com compostos modelos. Entretanto, a utilização de métodos sensíveis para esclarecer a natureza dessas reações com as SH tem sido limitada (Rook, 1977; Boyce et al., 1983; Howard et al., 1985).

Um maior entendimento sobre a natureza de sítios reativos presentes na MON, pode ser obtido através de métodos “in situ”, ao utilizar a MON em concentrações típicas como as encontradas em água potável ($< 10 \text{ mg L}^{-1}$ de COD). Isso proporciona informações sobre os intermediários que possam ser empregados para estudos da MON de várias origens, com soluções a vários valores de pH, dentre outros parâmetros de reação (Korshin et al., 1999).

A absorção de luz no UV-Visível e a fluorescência, da MON, satisfazem vários desses requisitos, são técnicas simples e possuem uma correlação intrínseca com a estrutura interna das SH (Korshin et al., 1999). As aplicações dessas técnicas em estudos sobre halogenação da MON são atrativas, uma vez que cromóforos e fluoróforos, presentes na MON, são unidades aromáticas suscetíveis a reações com PHA e seu envolvimento na halogenação pode ser monitorado por ambas técnicas.

Korshin et al., (1997a e 1997b) e Li et al., (1998), mostraram boas correlações entre mudanças no espectro de absorção de luz no UV-Vis da MON e formação de subprodutos da oxidação aquática. Korshin e colaboradores (1999 e 2002), avaliaram a influência do cloro sobre a matéria orgânica natural extraída do Rio Suwannee, correlacionando os dados obtidos por fluorescência e absorção de luz no UV-Visível. Segundo os autores, as variações nos espectros estão diretamente relacionadas com a quebra da molécula orgânica e a formação de subprodutos.

Entretanto, embora sejam vários os estudos sobre a matéria orgânica na presença do cloro (Korshin et al., 1997a, 1997b e Li et al., 1998), pouco se conhece sobre as características desse material na presença do dióxido de cloro, com a utilização dessas técnicas.

Portanto, o propósito nesta etapa do trabalho, foi comparar os efeitos da halogenação sobre espectros obtidos por absorção e fluorescência de luz no UV-Visível, da MON, na presença dos dois tipos de oxidantes de água, como o cloro e o dióxido de cloro, explorando suas implicações para possível entendimento sobre os mecanismos de halogenação. Também foi avaliada, por RPE e por cromatografia de exclusão por tamanho molecular, a influência da presença dos oxidantes sobre o conteúdo de radicais livres do tipo semiquinona e sobre o tamanho molecular dos AF.

A contribuição desta parte do trabalho de tese, está em efetuarem-se variações, tais como, tipo de oxidante utilizado, tempo de reação, concentração dos oxidantes bem como no tipo de amostra, no caso, ácidos fúlvicos extraídos de uma região tropical, verificando as possíveis influências das variações desses fatores sobre a MON.

3.2 - Objetivos

Avaliar as características dos ácidos fúlvicos extraídos do Rio João Pereira, em Bertioga/SP (Capítulo 1) e suas interação com cloro e dióxido de cloro, por técnicas espectroscópicas como absorção e fluorescência de luz no UV-Visível, ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e por cromatografia de exclusão por tamanho molecular.

3.3 – Materiais e métodos

I. Obtenção das soluções contendo a matéria orgânica dissolvida na presença de cloro e dióxido de cloro

Uma vez verificado que as substâncias húmicas aquáticas são predominantemente formadas pelos ácidos fúlvicos, optou-se por trabalhar com esta fração na realização dos experimentos. Foram preparadas soluções contendo a matéria orgânica dissolvida, no caso a fração fúlvica extraída do Rio João Pereira, Bertioga/SP.

A cloração das amostras de AF foi feita em sistema tampão fosfato (0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$), à temperatura ambiente entre 20 e 25 °C. Todas amostras foram colocadas em frascos de vidro escuro, para protegê-las contra a radiação solar, que poderia degradar o oxidante presente. A concentração do carbono orgânico dissolvido (COD) foi medida utilizando um equipamento SHIMADZU TOC-5000A, e as concentrações dos oxidantes, seguindo procedimentos descritos no item 2.3.

Os experimentos foram realizados preparando-se soluções nas seguintes condições:

- *Concentração dos oxidantes* $\Rightarrow$ 2,5 mg L⁻¹, 5,0 mg L⁻¹, 10,0 mg L⁻¹ e 20,0 mg L⁻¹ (tratamentos 1, 2, 3 e 4 respectivamente);
- *Tempo de reação* $\Rightarrow$ 1, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h;
- *Valores de pH* $\Rightarrow$ 5, 7, 9 e 11.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- i. Influência do oxidante sobre as características fluorescentes das amostras de ácidos fúlvicos;

- ii) Influência do oxidante sobre a absorção de luz UV-Visível das amostras de ácidos fúlvicos;
- iii) Influência do tempo de reação, concentração do oxidante e pH, sobre os espectros da MON halogenada.

II - Espectroscopia de fluorescência e absorção de luz no UV-Visível

Os espectros de absorção foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Shimadzu modelo UV-1601 PC.

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrômetro da Perkin Elmer modelo LS50B, utilizando-se comprimento de onda de excitação de 320 nm. Os espectros de emissão foram obtidos a uma velocidade de varredura 300 nm min⁻¹, no intervalo de 350 a 650 nm.

3.4 - Resultados e discussões

3.4.1 Técnica de fluorescência com luz UV-Visível

1. Influência da concentração do oxidante

As figuras 3.1a e 3.1b, ilustram uma comparação dos espectros de emissão de fluorescência obtidos para a amostra de AF na presença de cloro e dióxido de cloro respectivamente, variando-se a concentração do oxidante, e após 24 horas do início da reação. Observou-se que quanto maior, a concentração dos oxidantes, mais rápido ocorre o processo de oxidação da matéria orgânica, ocorrendo um decréscimo significativo das bandas de emissão, quando comparadas à amostra de AF puro. A presença dos oxidantes, também promove uma alteração na forma da banda.

Figura 3.1 – Espectros de emissão com excitação a 320 nm, obtidos para amostras de AF (concentração a 8 mg L^{-1} em pH 7), na presença de diferentes concentrações dos oxidantes ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$, tratamentos 1,2,3 e 4 respectivamente), após 24 horas de reação. Em (a) ácidos fúlvicos com cloro e em (b) ácidos fúlvicos com dióxido de cloro.

Quando os espectros mostrados nas figuras 3.1a e 3.1b foram normalizados por suas respectivas intensidades máximas de emissão (figuras 3.2a e 3.2b), duas tendências foram evidentes: a posição máxima de emissão (λ_{max}) exibe um deslocamento para o azul, ou seja, um deslocamento do espectro para menores comprimentos de onda, e a banda de emissão apresenta uma diminuição com o aumento da concentração do oxidante.

Figura 3.2 – Espectros de emissão, normalizados, para uma mesma intensidade máxima obtidos para a amostra de AF (concentração de 8 mg L^{-1} em pH 7) e os tratamentos 1,2,3 e 4, após 24 horas, (excitação a 320 nm).

Uma vez que as curvas fluorescentes são gaussianas na energia, nos espectros da figura 3.1, transformou-se o comprimento de onda de nanômetros para cm^{-1} . Dessa forma nestes espectros de emissão, foi utilizado o ajuste da função gaussiana com o intuito de se avaliar a influência da presença dos oxidantes, sobre os possíveis fluoróforos (que compõe as substâncias húmicas) responsáveis pela fluorescência dessas substâncias. A figura 3.3 mostra os resultados obtidos para os tratamentos 1 e 4 (extremos). Observou-se (figura 3.3) que a gaussiana principal pode ser uma composição de pelo menos 4 bandas distintas, cada uma com contribuições específicas dos diferentes fluoróforos. Essas bandas sofrem alterações quando oxidantes como o cloro e o dióxido de cloro estão presentes na solução.

Figura 3.3 - Espectros de fluorescência obtidos para a amostra de ácidos fúlvicos, na presença de cloro e dióxido de cloro (tratamentos 1 e 4) com excitação a 320 nm. O ajuste da função gaussiana mostra a possível participação de pelo menos quatro compostos envolvidos na formação da banda principal e a influência da presença dos oxidantes. Tempo de reação 24 h e soluções a pH 7.

As tabelas 3.I e 3.II, mostram as alterações dos valores obtidos para parâmetros como altura, largura, área e posição das gaussianas secundárias, as quais compõem a principal, obtida para os tratamentos 1 e 4, respectivamente.

Tabela 3.I – Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nos AF, na presença de cloro e dióxido de cloro, após 24 horas de reação, obtidos para o tratamento 1, dos espectros no modo de emissão, com λ dado em número de onda.

Gaussianas	Amostras			
	AF			
	Altura	Largura	Área	Posição
1	108,86	3,40 $\pm$ 0,02	464,95 $\pm$ 7,50	21,32 $\pm$ 0,03
2	41,66	1,21 $\pm$ 0,02	63,58 $\pm$ 4,60	21,71 $\pm$ 0,01
3	90,90	1,52 $\pm$ 0,03	173,78 $\pm$ 7,25	22,99 $\pm$ 0,01
4	130,14	2,26 $\pm$ 0,01	369,19 $\pm$ 6,40	24,52 $\pm$ 0,02
AF + Cloro (tratamento 1)				
1	92,62	3,52 $\pm$ 0, 02	409, 58 $\pm$ 10,44	21,97 $\pm$ 0, 04
2	34,00	1,23 $\pm$ 0, 02	52,50 $\pm$ 3,40	21,82 $\pm$ 0, 02
3	51,16	1,29 $\pm$ 0, 02	83,13 $\pm$ 4,05	23,02 $\pm$ 0, 01
4	98,87	2,24 $\pm$ 0, 03	277,40 $\pm$ 10,08	24,29 $\pm$ 0, 01
AF + Dióxido de cloro (tratamento 1)				
1	48,83	3,40 $\pm$ 0, 06	205,88 $\pm$ 10,23	21,33 $\pm$ 0, 08
2	10,14	1,08 $\pm$ 0, 08	13,77 $\pm$ 3,99	21,68 $\pm$ 0, 03
3	60,43	1,98 $\pm$ 0, 12	150,53 $\pm$ 23,01	23,12 $\pm$ 0, 04
4	59,00	2,18 $\pm$ 0, 05	161,75 $\pm$ 13,77	24,94 $\pm$ 0, 08

Tabela 3.II – Parâmetros determinados para as gaussianas referentes aos possíveis fluoróforos presentes nos AF, na presença de cloro e dióxido de cloro, após 24 horas de reação, obtidos para o tratamento 4, dos espectros no modo de emissão, com λ dado em número de onda.

Gaussianas	Amostras				
	AF				
	Altura	Largura	Área	Posição	
1	108,86	3,40 $\pm$ 0,02	464,95 $\pm$ 7,50	21,32 $\pm$ 0,03	
2	41,66	1,21 $\pm$ 0,02	63,58 $\pm$ 4,60	21,71 $\pm$ 0,01	
3	90,90	1,52 $\pm$ 0,03	173,78 $\pm$ 7,25	22,99 $\pm$ 0,01	
4	130,14	2,26 $\pm$ 0,01	369,19 $\pm$ 6,40	24,52 $\pm$ 0,02	
AF + Cloro (tratamento 4)					
1	10,50	3,30 $\pm$ 0, 03	42, 95 $\pm$ 1,30	21,24 $\pm$ 0, 05	
2	4,50	1,22 $\pm$ 0, 04	6,91 $\pm$ 0,80	21,70 $\pm$ 0, 03	
3	8,30	1,50 $\pm$ 0, 04	15,40 $\pm$ 1,05	22,90 $\pm$ 0, 02	
4	18,04	2,50 $\pm$ 0, 01	56,18 $\pm$ 0,93	24,50 $\pm$ 0, 01	
AF + Dióxido de cloro (tratamento 4)					
1	19,66	3,00 $\pm$ 0, 14	74,01 $\pm$ 15, 09	20,65 $\pm$ 0, 25	
2	2,63	0,98 $\pm$ 0, 14	3,26 $\pm$ 1, 50	21,62 $\pm$ 0, 03	
3	41,51	2,68 $\pm$ 0, 34	139,77 $\pm$ 31, 08	23,31 $\pm$ 0, 04	
4	24,25	2,03 $\pm$ 0, 06	61,71 $\pm$ 15, 02	25,40 $\pm$ 0, 09	

Observa-se nas tabelas 3.I e 3.II, que a presença dos oxidantes, nas soluções de AF, afeta principalmente parâmetros como altura e área das gaussianas 1, 2, 3, e 4 (figura 3.3). Sabe-se que a fluorescência total de uma amostra é proporcional a área

sob a curva de emissão fluorescente. Na tabela 3.III observa-se as porcentagens dos decréscimos das áreas das gaussianas, na presença dos oxidantes para os tratamentos 1 e 4 (concentrações de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente).

Tabela 3.III - Porcentagens do decréscimo da área das gaussianas 1, 2, 3, e 4, na presença dos oxidantes, para os tratamentos 1 e 4, após 24 horas de reação.

	Tratamento 1							
	Amostras com cloro				Amostras com dióxido de cloro			
Gaussianas	1	2	3	4	1	2	3	4
Decréscimo da área (%)	12	17	52	25	55	78	13	56
	Tratamento 4							
	Amostras com cloro				Amostras com dióxido de cloro			
Gaussianas	1	2	3	4	1	2	3	4
Decréscimo da área (%)	90	90	91	85	84	95	20	83

De acordo com os resultados da tabela 3.III, no caso do tratamento 1, referente a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ dos oxidantes presentes em solução, à gaussiana 1 e na presença de cloro, apresentou um decréscimo de 12 % da área sob o espectro de emissão, quando comparada à mesma gaussiana, obtida da amostra na ausência dos oxidantes. Na presença de dióxido de cloro, este decréscimo foi de 55 %. Para a gaussiana 2, o decréscimo foi de 17 % (amostra com cloro) e de ~80 % (amostra com dióxido de cloro). Para a gaussiana 3, o maior decréscimo da área foi observado para a amostra na presença de cloro, sendo da ordem de 52 %. Para as amostras com dióxido de

cloro, o decréscimo observado para a gaussiana 4, foi de ~60 %, enquanto que para as amostras com cloro, atingiu no máximo 25 %.

Com o aumento da concentração dos oxidantes para 20 mg L⁻¹ (tratamento 4), observou-se um decréscimo da área sob a curva fluorescente da ordem de 90 % para as gaussianas 1, 2 e 3 (na presença de cloro) e de ~86 % para a gaussiana 4. Na presença de dióxido de cloro, o aumento da concentração deste oxidante, promoveu sobre a área das gaussianas um comportamento diferenciado, quando comparado com as amostras com cloro. Para as gaussianas 1 e 4, o decréscimo da área foi de no máximo 84 %, enquanto que para a gaussiana 2 foi de 95 %. Para a gaussiana 3 o decréscimo da área foi de no máximo 20 %.

Os maiores decréscimos da área sob a curva fluorescente, observado para as amostras com maior concentração de cloro, possivelmente estejam associados ao fato de que este oxidante continua reagindo com as moléculas fluorescentes da solução. Na presença do dióxido de cloro, aparentemente, algumas moléculas fluorescentes são rapidamente oxidadas, enquanto outras não, como foi o caso do fluoróforo responsável pela gaussiana 3, que teve somente 13 % e 20 % de decréscimo na área (tratamentos 1 e 4) quando comparada à amostra na ausência do oxidante.

O comportamento diferenciado, observado no decréscimo da área sob a curva fluorescente, para as amostras de AF, sugere que os possíveis fluoróforos responsáveis pela fluorescência desses ácidos, quando em contato com os oxidantes nas concentrações de 2,5 mg L⁻¹ e 20,0 mg L⁻¹ (tratamentos 1 e 4, respectivamente) tendem a ser eliminados em maiores e menores proporções, de acordo com os passos nos quais a reação halofórmica se procede. O menor decréscimo da área para algumas das gaussianas, na solução contendo dióxido de cloro, sugere que este oxidante não reage com todos os compostos presentes em solução, o que poderia

contribuir para menor formação de subprodutos, como foi verificado no Capítulo 2. Alguns dos possíveis fluoróforos responsáveis pela fluorescência dos ácidos fúlvicos, como grupos metoxílicos e hidroxílicos, estão ilustrados na tabela 1.X (Capítulo 1).

Foi observado que quando a concentração do oxidante, que é adicionado a uma solução de concentração fixa de AF, é gradualmente elevada, a área sob a curva fluorescente, relacionada com a razão molar, $[\text{oxidante}] / [\text{COD}]$, tende a ficar constante para as amostras na presença de dióxido de cloro, a partir da razão molar igual ou superior a 0,08, enquanto que para as amostras com cloro, a área tende para valores acima da razão molar $[\text{Cl}_2] / [\text{COD}] = 1$ (figura 3.4).

Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que concentrações menores de dióxido de cloro (quando comparado ao cloro), são suficientes para obter-se uma redução significativa da fluorescência dos materiais fúlvicos, pois o dióxido de cloro tem maior poder de oxidação da matéria orgânica.

Fazendo-se uma correção com a absorbância a 320 nm, obtida pela técnica de absorção, obteve-se os dados da figura 3.5. Na figura 3.5a, observa-se que aparentemente, a absorbância a 320 nm, decresce com o aumento da razão molar, $[\text{Cl}_2] / [\text{COD}]$, resultado este que poderia confirmar a hipótese de que este oxidante continua reagindo com as moléculas responsáveis pela absorção de luz no UV-Visível (como compostos aromáticos conjugados com cetona, podendo levar portanto, a uma maior formação de subprodutos) após 24 horas de reação. Para as amostras com dióxido de cloro a absorbância a 320 nm aparentemente tende a ficar constante, a partir da razão molar igual ou superior a 0,08 como verificado para a área sob a emissão fluorescente.

Figura 3.4 - Efeito da razão molar [oxidante] / [COD], sobre a área do espectro de emissão fluorescente, obtido para a amostra de AF, pós 24 horas de reação em pH 7. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro.

Figura 3.5 - Efeito da razão molar [oxidante] / [COD], sobre a absorbância a 320 nm, para as amostras de AF após 24 horas de reação em pH 7. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro.

II. Influência do tempo de reação

As figuras 3.6a e 3.6b ilustram o comportamento da área sob o espectro de emissão fluorescente com a variação do tempo de reação, para as soluções de AF na presença de cloro e dióxido de cloro. Os tratamentos 1, 2, 3 e 4 representam concentrações dos oxidantes de 2,5 mg L⁻¹; 5,0 mg L⁻¹; 10,0 mg L⁻¹ e 20,0 mg L⁻¹, respectivamente. Os resultados (nas condições avaliadas) mostraram um comportamento diferenciado da área com a variação do tempo de reação.

Figura 3.6 – Variação da área de fluorescência em função do tempo de reação, obtida para a amostra de AF (concentração de 8 mg L⁻¹), soluções em pH 7. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro. Excitação a 320 nm.

Para as amostras com cloro, o comportamento da área sob a curva fluorescente, com a variação do tempo de reação, foi caracterizado por um decaimento exponencial de segunda ordem. Este decaimento exponencial segue parâmetros de acordo com a seguinte expressão:

$$Y(t) = A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + y_0 \quad \text{eq.3.1}$$

onde: A_1 = amplitude A_1 , τ_1 = constante de decaimento 1
 A_2 = amplitude A_2 , τ_2 = constante de decaimento 2

Os valores obtidos para A_1 , A_2 , τ_1 e τ_2 , nas exponenciais da figura 3.6a estão mostrados na tabela 3.IV.

Tabela 3.IV Valores para A_1 , A_2 , τ_1 e τ_2 obtidos das exponenciais que refletem o decaimento da área sob a curva fluorescente, na presença de diferentes concentrações de cloro.

Cloro (mg L⁻¹)	A₁	A₂	τ_1 (min)	τ_2 (min)
2,5	1482,3	3371,5	45,9	2143,6
5,0	10388,3	9072,4	67,2	2303,5
10,0	8209,5	8718,2	79,2	841,3
20,0	9661,4	2860,4	233,4	1585,5

Nas leis de decaimento e crescimento exponencial, a taxa de variação da quantidade de uma substância em relação ao tempo, é proporcional à quantidade da substância presente, num dado instante. Observa-se uma queda significativa nos instantes iniciais da reação, que possivelmente possa estar associada a um “*quenching*” da fluorescência, resultante da oxidação da matéria orgânica pelo cloro.

Considerando-se que um efeito de “*quenching*” na área, possa estar ocorrendo nos instantes iniciais da reação, uma vez que os valores de τ_1 obtidos para a exponencial da figura 3.6a, foram menores; o primeiro tempo de decaimento possivelmente esteja relacionado com este “*quenching*”, enquanto τ_2 possa estar

associado a uma ação mais efetiva do cloro, sobre a matéria orgânica com o decorrer do tempo, assim como com a própria consumação deste.

Para as amostras com dióxido de cloro, nas condições analisadas, não foi possível obter tais informações uma vez que o comportamento da área sob a curva fluorescente (em função do tempo de reação) não foi caracterizado por um decaimento exponencial, sendo observado somente um “*quenching*”, da área, seguido por uma estabilização da mesma.

Fazendo-se a correção por absorção, obteve-se os gráficos da figura 3.7. Nestes gráficos observou-se um comportamento muito similar ao obtido pela técnica de fluorescência. Na variação da absorbância com a variação do tempo de reação, para as amostras com cloro, também foi observado um decaimento exponencial da absorbância, para todos os tratamentos. Na presença de dióxido de cloro (nas condições analisadas) observou-se um decréscimo na absorbância (referente, ao tratamento 4) de 75 % nos instantes iniciais da reação.

Figura 3.7 - Efeito da variação do tempo de reação sobre a absorbância a 320 nm, para as amostras de AF, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4. Em (a) amostras na presença de cloro e em (b) amostras na presença de dióxido de cloro. Soluções em pH 7.

Os espectros de fluorescência dos AF na presença dos oxidantes em função do tempo de reação (obtidos para o tratamento 4) estão ilustrados nas figuras 3.8a e 3.8b. Em ambos casos observaram-se reduções na intensidade de fluorescência, nas regiões de menores e maiores comprimentos de onda, sendo este comportamento verificado para todos os tratamentos aqui analisados.

Para os espectros referentes às soluções contendo cloro, nota-se que o processo de oxidação da matéria orgânica ocorre mais lentamente, quando comparado aos resultados obtidos nas amostras com dióxido de cloro. Estes resultados comprovam a grande ação oxidante do dióxido de cloro. Ao contrário das soluções, contendo cloro, a intensidade de fluorescência nas amostras com dióxido de cloro, decresce significativamente após os 25 min iniciais de reação, estabilizando-se após este período. Nas amostras com cloro, este fato tende a ocorrer após 48 horas do início da reação.

Figura 3.8 - Espectros da intensidade de emissão de fluorescência, com excitação a 320 nm, obtidos para o tratamento 4 (AF 8 mg L⁻¹) e (oxidantes 20,0 mg L⁻¹) em diferentes intervalos de tempo de reação. Em (a) ácidos fúlvicos na presença de cloro, e em (b) ácidos fúlvicos na presença de dióxido de cloro, soluções em pH 7.

Para as amostras com cloro, após um período de reação de 24 h, a intensidade de fluorescência decresceu de 235 u.a. para 23 u.a. (para o tratamento 4). Nas amostras com dióxido de cloro, a intensidade de fluorescência apresentou um decréscimo de 235 u.a. para 48 u.a. para o mesmo tratamento. Após um período de reação de 168 h, a intensidade de fluorescência apresentou um valor de aproximadamente 12 u.a., nas amostras na presença de cloro, e de 48 u.a., nas amostras com dióxido de cloro.

Estes resultados sugerem que a ação dos oxidantes, nas condições analisadas, apresenta um comportamento diferenciado. Nas amostras com cloro, a maior redução observada na intensidade de fluorescência com o decorrer do tempo de reação (figura 3.8a) pode ser atribuída ao fato de que o cloro reage com grande parte, dos fluoróforos (ou todos os fluoróforos presentes em solução), destruindo-os com o passar do tempo, podendo a intensidade de fluorescência, atingir um patamar nulo. Ao contrário, o dióxido de cloro na concentração utilizada (na figura 3.8b), oxida mais rapidamente as moléculas responsáveis pela fluorescência dos AF, até um determinado patamar (atingindo um valor de 48 u.a., na intensidade) e estabilizando-se com o decorrer do tempo de reação. Estes resultados mostram que o dióxido de cloro é mais oxidante e, menos reativo quando comparado ao cloro, o que poderia explicar os menores conteúdos de clorofórmio, quantificados nas soluções na presença deste oxidante (Capítulo 2).

Tem sido proposto que o decaimento das características fluorescentes das substâncias húmicas pode ser afetado pela transferência de energia dentro das moléculas poliméricas (Kumke et al., 1998 e 2000). Em moléculas maiores, presentes nas SH, a transferência de energia intrafluoróforos reduz o decaimento aparente do tempo de vida destes. Em moléculas pequenas, este caminho de

dissipação da energia excitada, pode diminuir e o tempo de vida dos fluoróforos pode aumentar. A cloração diminui o tamanho molecular dos AF, destruindo alguns cromóforos aromáticos envolvidos na transferência de energia. Dessa forma, o decréscimo na intensidade de fluorescência dos AF clorados se correlaciona bem com esta hipótese (Korshin et al., 1999).

Como mencionado no Capítulo 1, os AF exibem uma banda com um máximo de emissão localizado entre 400 nm e 450 nm. Esta banda é provavelmente resultante da soma de pelo menos 4 gaussianas referentes aos diferentes fluoróforos presentes na amostra de AF. Nas figuras 3.8a e 3.8b, observou-se que esta banda decresce significativamente com o aumento do tempo de reação e concentração dos oxidantes além de ter sua forma alterada. Observou-se nos espectros de emissão, que após a oxidação, a banda de emissão centrada em aproximadamente 433 nm, tende a deslocar-se para menores comprimentos de onda. Após 168 h, esta banda apresenta um máximo a 421 nm e 424 nm, nas amostras com cloro e dióxido de cloro, respectivamente.

Estes resultados confirmam a hipótese de que os agentes oxidantes tendem a reagir com anéis aromáticos condensados, presentes na matéria orgânica aquática, promovendo um deslocamento do espectro de emissão para menores comprimentos de onda. Estes dados são concordantes com os obtidos por Korshin e colaboradores (2000), para amostras na presença de cloro.

Sabe-se que nas SH, os principais fluoróforos (grupos capazes de absorver e emitir energia na forma de luz) são os compostos aromáticos. Compostos aromáticos com grupos doadores de elétrons, são substratos altamente reativos em reações de substituição e oxidação (Korshin et al., 1999). Ambos tipos de reações são típicas na cloração aquática. A evidência desse comportamento, na oxidação das moléculas que

compõe os AF, é um processo reativo que ocorre principalmente para alguns grupos moleculares. Este comportamento é melhor visualizado no espectro da diferença, para diferentes intervalos de tempo de reação (figuras 3.9 e 3.10, após 24 h do início da reação e figuras 3.11 e 3.12, após 168 h do início da reação).

Figura 3.9– Gráfico mostrando os espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e o espectro da diferença, obtido para soluções de AF na presença de 20,0 mg L⁻¹ de cloro e após 24 horas do início da reação. Soluções na concentração de 8 mg L⁻¹ de AF a pH 7.

Figura 3.10 - Gráfico mostrando os espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e o espectro da diferença, obtido para soluções de AF na presença de 20,0 mg L⁻¹ de dióxido de cloro e após 24 horas do início da reação. Soluções na concentração de 8 mg L⁻¹ de AF a pH 7.

Figura 3.11 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e espectro da diferença, obtido para soluções de AF (8 mg L^{-1}), na presença de cloro ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$) pH 7.

Figura 3.12 - Espectros de emissão com excitação a 320 nm, normalizados para uma mesma intensidade máxima, e espectro da diferença, obtido para soluções de AF (8 mg L^{-1}) na presença de dióxido de cloro ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$) pH 7.

No espectro da diferença, observa-se que na região de maiores comprimentos de onda, (referente às estruturas mais condensadas) e na região de menores comprimentos de onda (estruturas menos condensadas), as estruturas que fluorescem

nessas regiões, tendem a sofrer maior influência dos oxidantes, existindo no entanto, uma região intermediária, a que tende a zero (entre 400 e 475 nm para amostras com cloro e entre 365 e 450 nm para amostras com dióxido de cloro) que aparentemente resistem após 24 horas do início da reação com os oxidantes.

De acordo com Senesi, (1990), essas regiões, com máxima intensidade de fluorescência, no espectro de emissão, podem ser atribuídas à fluorescência de grupos do tipo hidroxí e metoxi (tabela 1.IX, capítulo 1). Esses resultados sugerem que somente alguns fluoróforos que são ativados em regiões de maiores e menores comprimentos de onda, têm sido afetados, após 24 h de reação. Pode-se dizer que a excitação após 24 h de reação foi seletiva, pois foi mais ressonante somente a maiores e menores comprimentos de onda, ressonante portanto, com estruturas específicas, e não necessariamente com todas as estruturas presentes na amostra de AF (Carvalho et al., 2003).

Após um período de reação de 168 h (figuras 3.11 e 3.12) estruturas que fluorescem a menores comprimentos de onda (entre 350 nm e 425 nm), ainda resistem ao ataque dos oxidantes. Entretanto aparentemente, estruturas do tipo hidroxí e metoxi que existiam, após 24 h do início da reação, tendem a ser eliminadas, após 168 h. Segundo Christman et al., (1978) um decréscimo no conteúdo de grupos do tipo hidroxí e metoxi, contribui para menor formação do clorofórmio. Sendo assim, se grupos hidroxí e metoxi, que compõe os ácidos fúlvicos, são eliminados da solução após 168 horas de reação com os oxidantes, como suposto nos espectros da diferença (figuras 3.11 e 3.12), estes dados são concordantes com os obtidos pela técnica de cromatografia gasosa, os quais mostraram menor formação de clorofórmio, após este período de reação.

III. “Quenching” da fluorescência de ácidos fúlvicos por cloro e dióxido de cloro

Nos resultados mostrados anteriormente, observou-se a ocorrência de um “quenching” na intensidade fluorescência, dos AF, pelos oxidantes. A taxa percentual deste “quenching” foi calculada para comprimentos de onda nos quais foram observadas as intensidades máximas de fluorescência, segundo procedimento proposto por Takaho et al., (1992). Esta taxa percentual corresponde ao valor da intensidade de fluorescência inicial da solução (no caso a solução de AF não clorada) menos a intensidade de fluorescência final, ou seja, depois da reação dos AF com o oxidante, dividido pela intensidade de fluorescência inicial. A dependência desta taxa, com a variação da concentração dos oxidantes, é mostrada na figura 3.13.

Figura 3.13 - Variação na extensão do “quenching” da fluorescência do AF por cloro e dióxido de cloro variando-se a concentração dos oxidantes. Soluções de AF na concentração de 8 mg L^{-1} em pH 7.

Observa-se na figura 3.13, que a taxa máxima de “quenching”, na intensidade de fluorescência variando-se a concentração dos oxidantes, foi mais eficiente para as

amostras na presença de dióxido de cloro (taxa de aproximadamente 75 % para a amostra com maior concentração), enquanto que para as amostras na presença de cloro, esta taxa foi de aproximadamente 35 %.

Sendo assim, a variação da concentração dos oxidantes, provocou um efeito de “*quenching*” na intensidade de fluorescência, nos espectros de emissão para os diferentes tratamentos. Como também foram observadas variações na forma das bandas, avaliou-se o efeito do “*quenching*” sobre a área das curvas fluorescentes, referentes aos diferentes tratamentos. Os resultados são mostrados na figura 3.14. Observou-se que a taxa máxima de “*quenching*” sobre a área da curva fluorescente, variando-se a concentração dos oxidantes, foi também mais eficiente para as amostras na presença de dióxido de cloro (taxa de aproximadamente 80 % para a amostra com maior concentração), enquanto que para as amostras na presença de cloro, esta taxa foi de 40%.

Figura 3.14 - Variação na extensão do “*quenching*” da área sob a curva fluorescente obtida para os diferentes tratamentos, para as soluções de AF na presença dos oxidantes. Soluções de AF na concentração de 8 mg L⁻¹ em pH 7.

Geralmente, são dois os mecanismos de “*quenching*” da fluorescência, o dinâmico e o estático. No “*quenching*” estático, as moléculas fluorescentes no estado fundamental e o agente responsável pelo “*quenching*”, combinam fortemente produzindo um complexo que não exibe fluorescência. No “*quenching*” dinâmico, moléculas fluorescentes no estado excitado (P^*) interagem com o agente (Q) e assim, o “*quenching*” é induzido por perda de energia (Takaho et al., 1992).

Pela lei de Stern Volmer a seguinte relação é observada, no caso do “*quenching*” dinâmico:

$$\left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \frac{K_2[P^*][Q]}{K_1[P^*]} = K[Q] \quad \text{eq. 3.2}$$

onde F_0 e F são as intensidades na ausência do agente Q e na presença deste, respectivamente; K_1 e K_2 são as taxas constantes para a fluorescência emitida e a fluorescência dinamicamente afetada pelo “*quenching*”; (Q) é o agente responsável pelo “*quenching*” e (P^*) é o estado excitado.

Os resultados da figura 3.15 mostram que a reação entre os AF e oxidantes envolve um “*quenching*” dinâmico de fluorescência, uma vez que o mesmo evolui com o tempo. A supressão na intensidade de fluorescência, possivelmente esta associada à transferência de energia, por colisão de moléculas excitadas da substância fluorescente (no caso, devido aos grupos aromáticos presentes na solução

de AF), com moléculas do solvente ou de outros solutos, resultando um mecanismo paralelo mas não radiante para voltar ao estado fundamental.

Figura 3.15: Variação do “quenching” na intensidade de fluorescência de AF por cloro e dióxido de cloro. Condições: AF na concentração de 8 mg L⁻¹ e soluções a pH 7.

3.4.2 - Técnica de absorção com luz UV-Visível

Simultaneamente com as mudanças observadas por fluorescência, efeitos consideráveis na absorbância no UV-Visível, para amostras de ácidos fúlvicos, na presença dos oxidantes foram detectados.

As figuras 3.16 e 3.17 ilustram os espectros de absorção de luz no UV-Visível, obtidos para a amostra de AF, na presença de diferentes concentrações de cloro e dióxido de cloro. As figuras 3.18 e 3.19, mostram os espectros, da matéria orgânica clorada, em diferentes tempos de reação.

Observa-se que, em ambos os casos, a absorbância decresce com o aumento da concentração do oxidante, o que também foi observado com o aumento do tempo de reação. O decréscimo rápido da absorbância, a valores de comprimento de onda

maiores, pode ser o resultado da quebra de ligações dentro de estruturas eletrônicas, ou da destruição de compostos conjugados insaturados, presentes na estrutura da matéria orgânica dissolvida. (Monsallier et al., 2000).

Figura 3.16 – Espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF na presença de cloro. Condições: soluções na concentração de 8 mg L^{-1} a pH 7. Tempo de reação: após 24 horas.

Figura 3.17 - Espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF na presença de dióxido de cloro. Condições: soluções na concentração de 8 mg L^{-1} a pH 7. Tempo de reação: após 24 horas.

Figura 3.18 – Espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF, na presença de cloro após 24, 72 e 96 horas de reação, soluções a 8 mg L^{-1} e pH 7.

Figura 3.19 - Espectros de absorção, obtidos para a amostra de AF, na presença de dióxido de cloro, após 24, 72 e 96 horas de reação, soluções a 8 mg L^{-1} e pH 7.

A halogenação, provoca um decréscimo na absorbância de luz UV, devido à destruição e/ou alteração de cromóforos presentes na matéria orgânica (Korsin et al., 1997). Sabe-se, que os espectros obtidos por absorção de luz no UV-Visível de compostos puros dissolvidos em água, consistem de bandas de absorção com valores máximos bem definidos. Esses máximos são definidos a comprimentos de ondas, que correspondem à energia necessária para promover um elétron da molécula para um

orbital com maior energia. Muitos compostos aromáticos apresentam tais bandas. Os grupos funcionais aromáticos são cromóforos que constituem em grande parte, em sítios dominantes, durante o ataque do cloro sobre as moléculas da matéria orgânica. Contudo, grupos alifáticos também podem contribuir (Hook, 1977; Boyce et al., 1983; Reckhow et al., 1990; Korshin et al., 1996).

Quando compostos fenólicos, considerados razoavelmente análogos à grupos funcionais ativos na matéria orgânica natural, são clorados, sua absorbância aumenta no intervalo de 250-400 nm (Korshin et al., 2000). A absorbância a 254 nm (A_{254}) foi proposta como um indicador da concentração de subprodutos organoclorados (Roock, 1977; Boyce et al., 1983).

A absorção de luz no UV-Visível, próxima a 460 nm, é relacionada com a intensidade da coloração amarelada do AF, causada por extensos sistemas de cromóforos em estruturas conjugadas. Por outro lado, o comprimento de onda a 272 nm, é a região de transições $\pi - \pi^*$ em benzenos substituintes. Kulovara et al. (1996) relacionaram a degradação de partes aromáticas, presentes nas substâncias húmicas, com o decréscimo da absorbância a 272 nm. Contudo, Gauthier et al., 1987 apontaram alternativamente, que a comprimentos de onda adjacentes, tais como 254 nm, também podem ocorrer essas transições. Sabe-se que a absorção de luz das substâncias húmicas, em intervalos do UV-Visível, é devido a bandas insaturadas conjugadas e também à presença de elétrons livres e heteroátomos. Ácidos fenólicos, por exemplo, constituem em grande parte os cromóforos dos AF, são os responsáveis pela coloração desses compostos (Korshin et al., 2000).

Nas amostras com cloro, observaram-se reduções da absorbância, a 254 nm, de mais de 70 % após 96 horas do início da reação, e de 83 % para a absorbância a 272 nm, após este mesmo período. Para as amostras com dióxido de cloro, as

reduções das absorbâncias a 254 nm e 272 nm foram de $\cong 90\%$ e 93% , respectivamente, após este mesmo período (figuras 3.18 e 3.19 respectivamente).

Sabe-se que na reação inicial entre o cloro e a matéria orgânica natural, uma grande parte do cloro que reage, é incorporado dentro das moléculas orgânicas. Contudo, devido às condições em que as reações procedem, como tempo ou aumento da concentração de cloro, o cloro que reage, é cada vez menos incorporado nas moléculas da matéria orgânica. Assim, a maior parte, se não todo o Cl_2 que reage nesse processo é reduzido à Cl^- , sendo incorporado na solução (Li et al., 1998).

Wu et al., 2000 e Korshin et al., (2000 e 2002) mostraram que quando a matéria orgânica natural (MON) é halogenada, mudanças em certos pontos do seu espectro de absorção, podem servir como indicativo do progresso da reação e concentração de subprodutos formados. Também tem sido fundamentado, que as absorbâncias das soluções diminuem com os aumentos das concentrações de cloro livre (HOCl ou OCl^-) e do tempo de reação; além disso, as magnitudes desses decréscimos, próximos a 272 nm são indicativos sensíveis, da formação do total de halogênios orgânicos, trihalometanos e ácidos haloacéticos (TOX, THMs, e HAAs, respectivamente). Várias expressões têm sido propostas para relatar parâmetros de qualidade de água e condições de halogenação, de forma a estimar a formação de subprodutos. Contudo, a complexidade dessas reações gera uma dificuldade acentuada (Korshin et al., 2000).

Tem sido registrado por Korshin e colaboradores (2002), que medidas baseadas na diferença entre as absorbâncias obtidas do espectro de UV-Visível da água, podem ser relacionados através da seguinte equação:

$$\Delta A_{\lambda} = A_{\lambda}^{\text{clorada}} - A_{\lambda}^{\text{inicial}} \quad \text{eq. 3.3}$$

cloração, e ΔA_λ é a absorvância diferencial naquele comprimento de onda (Korshin et al., 2002). O significado da absorvância diferencial está relacionado ao fato de que a absorvância de águas naturais, no ultravioleta, deve-se especialmente a diversas moléculas que compõem a matéria orgânica natural (MON). Quando a MON reage com oxidantes, formam-se subprodutos como os trihalometanos e simultaneamente, a absorvância dessa matéria orgânica sofre alterações, favorecendo assim, ao aumento da absorvância diferencial (Korshin et al., 2000 e 2002).

As figuras 3.20 e 3.21 mostram a absorvância diferencial, obtida pelos dados das figuras 3.16 e 3.17, respectivamente. Nas amostras com cloro, observou-se um máximo bem definido na região entre 250 nm e 300 nm, cuja intensidade aumenta com o aumento da concentração do oxidante e do tempo de reação.

Figura 3.20 – Espectros de absorção diferencial, obtidos para a amostra de AF, na presença de cloro. Condições: soluções com 8,00 mg L⁻¹ de AF, pH 7,00 e após 24 horas de reação.

Figura 3.21 - Espectros de absorção diferencial, obtidos para a amostra de AF, na presença de dióxido de cloro. Condições: soluções com 8,00 mg L⁻¹ de AF, pH 7,00 e após 24 horas de reação.

No caso das amostras com dióxido de cloro, não foi observado um máximo neste intervalo, entretanto, pode-se observar (figura 3.21) que a amostra com maior

concentração do oxidante, apresentou variações na absorbância diferencial, entre 250 nm e 300 nm, sendo maior, quando comparada às amostras com menores concentrações dos oxidantes.

Korshin et al., (2002 e 2001) mostraram que o espectro diferencial gerado quando a matéria orgânica aquática é clorada, apresenta várias características. Primeiro, o sinal da absorbância diferencial é sempre negativo, isto significa que a cloração diminui a absorbância da matéria orgânica, e conseqüentemente da solução. Segundo, a forma do espectro diferencial da matéria orgânica clorada é reproduzível para águas de diferentes origens e condições de cloração.

Em particular, o espectro diferencial da matéria orgânica clorada, apresenta um pico bem definido, próximo a 272 nm, em contraste com o espectro de absorbância convencional da matéria orgânica, antes da cloração, o qual não apresenta picos definidos. Terceiro, a intensidade dos espectros diferenciais aumenta com o aumento do tempo de reação e concentração do oxidante (Korshin et al., 2002). Nos resultados obtidos neste trabalho, a fração fúlvica, também apresentou tais características, sendo, no entanto, menos realçadas para as amostras com dióxido de cloro quando comparada às amostras com cloro.

Como mencionado no Capítulo 1, a absorbância a 254 nm tem sido descrita como sendo proporcional à aromaticidade das substâncias húmicas. É aceito que essa posição (254 nm), é principalmente determinada pela susceptibilidade de grupos aromáticos, e o decréscimo desta, sugere um ataque do oxidante nestes sítios aromáticos, em amostras de origem aquática (Korshin et al., 1999). A absorbância a 254 nm (A_{254}), foi proposta também como sendo um indicador da concentração de subprodutos organoclorados (Roock, 1977; Boyce et al., 1983; Che-Yu et al., 2001). Dessa forma, avaliou-se o comportamento das absorbâncias a 254 nm e 272 nm e

absorbâncias diferenciais a $-\Delta A_{254}$ e $-\Delta A_{272}$, com a variação da concentração dos oxidantes, obtendo-se os dados das tabelas 3.V e 3. VI.

Tabela 3.V - Valores das absorbâncias a 254 nm e 272 nm, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos na presença de cloro e dióxido de cloro, após 24 horas de reação.

Dose do oxidante (mg L ⁻¹)	A ₂₅₄		A ₂₇₂	
	Cl ₂	ClO ₂	Cl ₂	ClO ₂
0	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02
2,5	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,04
5,0	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02
10,0	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,03
20,0	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,02

Tabela 3. VI - Valores das absorbâncias diferenciais $-\Delta A_{254}$ e $-\Delta A_{272}$, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos na presença de cloro e dióxido de cloro, após 24 horas de reação.

Dose do desinfetante (mg L ⁻¹)	Absorbância Diferencial $-\Delta A_{254}$		Absorbância Diferencial $-\Delta A_{272}$	
	Cl ₂	ClO ₂	Cl ₂	ClO ₂
0	-	-	-	-
2,5	0,20 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,04 ± 0,01
5,0	0,23 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,05 ± 0,02
10,0	0,30 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,36 ± 0,05	0,06 ± 0,03
20,0	0,32 ± 0,05	0,07 ± 0,03	0,73 ± 0,03	0,06 ± 0,02

Observou-se que as absorbâncias a 254 nm decrescem com o aumento da concentração dos oxidantes, variando de 0,14 (amostra sem oxidantes), para

aproximadamente 0,06 (amostra com maior concentração de ambos oxidantes). Estes decréscimos, nas absorvâncias a 254 nm e 272 nm, evidenciam possível formação de halogênios. A 272 nm, as absorvâncias decresceram de 0,12 para 0,05 (amostras com cloro) e 0,06 (amostras com dióxido de cloro), respectivamente. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças acentuadas, quando comparados entre os diferentes oxidantes (tabela 3.V).

Entretanto, diferenças significativas foram observadas para as absorvâncias diferenciais (tabela 3. VI). As absorvâncias diferenciais a 254 nm ($-\Delta A_{254}$) variaram de 0,20 (menor concentração de cloro) para 0,32 (maior concentração de cloro). Para as amostras com dióxido de cloro, a variação foi de 0,05 (menor concentração de dióxido de cloro) para 0,07 (maior concentração de dióxido de cloro). Por outro lado, os valores obtidos para as absorvâncias diferenciais a 272 nm ($-\Delta A_{272}$) variaram de 0,18 (menor concentração de cloro) para 0,73 (maior concentração de cloro), enquanto que para as amostras com dióxido de cloro, variaram de 0,04 (menor concentração de dióxido de cloro) para 0,06 (menor concentração de dióxido de cloro) no período analisado.

Em todos os espectros obtidos neste trabalho observou-se um decréscimo das absorvâncias a 254 nm e 272 nm e um aumento das absorvâncias diferenciais, evidenciando a possível formação de halogênios.

A diversidade de cromóforos, presentes na matéria orgânica natural, pode causar sobreposição nas bandas de absorção. Korshin et al., (1996) concluíram que o espectro de absorção de luz no UV-Visível, para a matéria orgânica natural, pode ser uma composição de três bandas distintas, cada uma com contribuições de muitos cromóforos diferentes. Cada banda foi caracterizada matematicamente, pela representação da absorvância como uma função gaussiana da energia de luz

absorvida. Segundo Korshin e colaboradores (1997), quando uma regressão linear com bom ajuste passa pela origem, representa que o cloro ao reagir com a matéria orgânica, elimina os compostos responsáveis pela absorção no UV. Essa eliminação é acompanhada pela incorporação de halogênios nas moléculas orgânicas.

Também tem sido sugerida a existência de correlações entre espectros de absorbância com a formação de clorofórmio e HAAs clorados (Korshin et al., 1996; Li et al., 1998; Korshin et al., 1999). Contudo dados que sustentam estas ultimas relações são muito escassos e a existência de possíveis relações entre a formação de outros subprodutos não tem sido examinadas (Korshin et al., 2002).

Dados da literatura (Korshin et al., 1996), têm mostrado que há uma forte correlação entre a variação da absorbância a 254 nm (ΔA_{254}) e a geração de clorofórmio (CHCl_3). Contudo, essa correlação intercepta a abcissa a $\Delta A_{254} > 0$, isto significa que alguma absorbância UV foi destruída, pela reação de cloração, antes de qualquer CHCl_3 aparecer na água. Definindo esta absorbância como ΔA_{254}^0 , a relação entre a geração de CHCl_3 e ΔA_{254} , pode ser representada por :

$$\begin{aligned} \text{CHCl}_3 (\text{gerado}) &= 0 && \longrightarrow && \text{se } (\Delta A_{254} < \Delta A_{254}^0) \\ &= k'(\Delta A_{254} - \Delta A_{254}^0) && \longrightarrow && \text{se } (\Delta A_{254} > \Delta A_{254}^0) \end{aligned}$$

O aumento do valor de k' e o decréscimo de ΔA_{254}^0 com o aumento do pH, é consistente com muitas observações referentes à formação de CHCl_3 , em reações de cloração da matéria orgânica natural (Stevens et al., 1989).

A relação anteriormente apresentada indica que a geração do CHCl_3 corresponde a um processo de múltiplos passos. Assumindo que na formação de

CHCl_3 , os sítios onde o Cl incorpora dentro das moléculas da MON, destrói alguma absorbância UV, e gera algum halogênio, então o CHCl_3 não se forma até que tais incorporações tenham destruído uma quantidade de absorbância igual a ΔA^0_{254} e formado uma quantidade de halogênio igual a $k\Delta A^0_{254}$.

Com os dados obtidos pela técnica de cromatografia gasosa, abordada no capítulo 2, para as amostras de ácidos fúlvicos na presença dos diferentes oxidantes, obteve-se os resultados apresentados nas figuras 3.22 e 3.23. Estes resultados mostram a formação do clorofórmio após um período de 24 horas de reação, em função da variação da concentração dos oxidantes (comparados com as variações das absorbâncias a 254 nm e 272 nm, obtidas pela técnica de absorção de luz no UV-Visível). Observou-se que para a amostra com menor valor para absorbância a 254 nm (de 0,06 na amostra com maior concentração de cloro), há maior conteúdo de clorofórmio ($\sim 12 \text{ mg L}^{-1}$). Por outro lado nas amostras com dióxido de cloro, a formação foi de aproximadamente $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (amostra com maior concentração de dióxido de cloro) apresentando um valor para a absorbância a 254 nm, de 0,08. O mesmo comportamento foi observado para a absorbância a 272 nm.

(a)

(b)

Figuras 3.22 Conteúdo de clorofórmio formado e absorbância a 254 nm, variando-se a concentração dos oxidantes. Em (a) amostras contendo cloro e em (b) contendo dióxido de cloro. Concentração dos AF, 4 mg L^{-1} , soluções a pH 7.

(a)

(b)

Figuras 3.23 Conteúdo de clorofórmio formado e absorbância a 272 nm, variando-se a concentração dos oxidantes. Em (a) amostras contendo cloro e em (b) contendo dióxido de cloro. Concentração dos AF, 4 mg L^{-1} , soluções a pH 7.

3.4.3 Influência da presença de cloro e dióxido de cloro sobre radicais livres presentes em amostras de ácidos fúlvicos aquáticos avaliados por RPE

A natureza química e a concentração de radicais livres em materiais biogênicos dependem sobretudo, das reações ácido-base, de redução-oxidação e complexação (Jezierski et al., 2002). Os radicais livres são importantes intermediários em processos de polimerização e despolimerização, durante a transformação da matéria orgânica nos solos e sedimentos.

Como mencionado, na transformação da matéria orgânica largamente difundida no ambiente natural são formados compostos como os ácidos húmicos e fúlvicos (Stevenson et al., 1982; Senesi et al., 1998). Estes processos podem ser quantitativamente monitorados pela técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), visto que matrizes moleculares, sobretudo fenóis, estabilizam efetivamente os radicais livres orgânicos. Sabe-se, por exemplo, que a concentração desses radicais é influenciada pelo conteúdo de metais presentes na matéria orgânica (Jezierski et al., 2002). O conteúdo do radical livre do tipo semiquinona, fornece informações a respeito das unidades estruturais que aceitarão elétrons das moléculas de AF como, por exemplo, as quinonas.

A RPE é utilizada em amostras de SH para a identificação e/ou quantificação de radicais livres semiquinona e metais de transição (Martin-Neto et al., 1998; Saab, 1999; Martin-Neto et al., 2000). O conteúdo desses radicais livres pode variar segundo o pH das soluções, com a alteração da temperatura, presença de processos redox; ou quando as SH são irradiadas por luz UV (Senesi, 1990; Senesi, 1992; Saab, 1999). As semiquinonas podem ser produzidas pela redução de quinonas ou pela oxidação de fenóis, como apresentado na figura 3.24.

Figura 3.24 - Esquema da estabilização do radical livre semiquinona (Schnitzer, 1990).

I - Materiais e métodos

Um espectrômetro de RPE Bruker EMX, operando na frequência da banda X (9 GHz), à temperatura ambiente, foi utilizado para a obtenção de espectros dos AF liofilizados, na ausência e presença de cloro e dióxido de cloro, para diferentes valores de pH.

Os radicais livres do tipo semiquinona, presentes nos AF, foram quantificados utilizando uma aproximação, onde a densidade de spin foi considerada proporcional à intensidade e ao quadrado da largura de linha ($I \propto \Delta H^2$) (Poole e Farach, 1972). Esse procedimento é baseado no padrão secundário (um cristal de rubi calibrado com 'strong pitch'), de acordo com a metodologia de Singer (Singer, 1959; Martin-Neto et al., 1991).

O padrão secundário proporciona uma quantificação de spins mais precisa do que a calibração convencional devido a sua capacidade de detecção de pequenas variações no fator de qualidade, na cavidade de microondas. As condições

experimentais utilizadas foram cuidadosamente monitoradas, utilizando baixas potências de microondas (em torno de 0,2 mW) e uma amplitude de modulação de 0,5 G para evitar a saturação do sinal da semiquinona e impedir a deformação deste, pelo aumento da largura de linha (Poole e Farach, 1972).

Para a preparação das amostras, utilizou-se a fração fúlvica extraída do Rio João Pereira. As soluções foram preparadas adicionando-se separadamente 5 mg L⁻¹ de cloro (na forma de hipoclorito de sódio NaOCl 5%) e dióxido de cloro, em 10 mL de tampão fosfato (0.1 M KH₂PO₄/ NaOH nos valores de pH de 5; 7 e 11), contendo o AF. A cloração foi feita a temperatura ambiente variando entre 20 e 25 °C. As soluções permaneceram em agitação constante por 15 min, após uma hora de reação foram congeladas, e posteriormente liofilizadas. Ácido ascórbico foi utilizado para parar a reação. Para as análises no espectrômetro de RPE, as amostras foram colocadas em tubos de quartzo de 3,5 mm de diâmetro interno, com massa de AF variando de 25 a 27 mg.

II - Resultados e discussões

Na figura 3.25, apresentam-se os espectros do sinal do radical livre do tipo semiquinona, obtidos para a amostra liofilizada de ácidos fúlvicos, em diferentes valores de pH e na ausência e presença de cloro e dióxido de cloro. A forma do sinal é semelhante, com valor para o fator-g de 2,005.

Figura 3.25 - Espectros obtidos por RPE mostrando o sinal do radical livre semiquinona, obtidos para as amostras de ácidos fúlvicos em diferentes valores de pH. Em a) amostras a pH 11, b) amostras a pH 7 e em c) amostras a pH 5. Condições experimentais: medidas feitas à temperatura ambiente, $\nu = 9,74$ GHz e amplitude de modulação = 0,5 G e potência de 0,2 m W.

A tabela 3.VII mostra os efeitos da variação do pH sobre parâmetros obtidos por RPE, como largura de linha e conteúdo de radicais livres presentes nas amostras, respectivamente.

Tabela 3.VII - Quantidade de radicais livres (em spins g C⁻¹) e valores da largura de linha (ΔH) obtidos para as amostras de AF, em diferentes valores de pH, na presença de cloro e dióxido de cloro.

Amostra	pH 11		pH 7		pH 5	
	ΔH (Gauss)	Spins /g de C (*10 ¹⁸)	ΔH (Gauss)	Spins /g de C (*10 ¹⁷)	ΔH (Gauss)	Spins /g de C (*10 ¹⁷)
AF	7,04±0,04	3,70±0,04	7,08±0,04	3,60±0,02	6,61±0,02	2,90±0,05
AF + Cl ₂	6,70±0,07	3,50±0,01	6,20±0,01	3,41±0,04	6,00±0,04	2,70±0,01
AF + ClO ₂	6,50±0,09	3,11±0,03	6,18±0,06	3,01±0,03	6,20±0,01	2,30±0,04

Com base nos resultados apresentados na tabela 3.VII observou-se maiores valores para a largura de linha, para as amostras em pH 11 e 7. Uma hipótese para explicar esse resultado é que os radicais livres do tipo semiquinona, nesse intervalo de pH, são menos protegidos, interagindo mais com o meio e relaxando mais rapidamente (aumento da largura de linha). Observou-se também que a presença dos oxidantes e o decréscimo do pH, promoveram decréscimos na largura de linha do sinal do radical livre.

Martin-Neto e colaboradores (2001), ao estudarem os mecanismos de interação da atrazina e hidroxiatrazina com SH (de solos e turfas), também observaram que houve um decréscimo da largura de linha, do sinal do radical livre semiquinona, com o decréscimo do pH. Segundo os autores, esse evento provavelmente esteve relacionado com o aumento do tempo de relaxação do estado excitado, deste radical livre presente na amostra de AF, com o decréscimo do pH.

Em valores menores de pH os ambientes moleculares incluindo os sítios protegidos de hidrofobicidade significativa aumentam, devido às mudanças conformacionais (induzidas pela protonação de grupos funcionais ácidos). Nestes sítios protegidos as interações, com os ambientes externos, são menos efetivas resultando em aumentos dos tempos de relaxação dos radicais. Segundo Martin-Neto et al., (1994) e Sposito et al., (1996), mudanças no sinal de RPE para os radicais livres do tipo semiquinona, em diferentes valores de pH, podem ser atribuídas a mudanças conformacionais.

Conforme mostrado na tabela 3.VII. também foi observado, para todas as amostras, que o conteúdo de radicais livres, decresceu com a diminuição do pH de 11 para 5. Verificou-se ainda, que para as condições em que as amostras foram analisadas e das reações com oxidantes, houve maior redução no nível de semiquinonas para as amostras de AF + ClO₂, quando comparadas as amostras na ausência de oxidante (AF) e na presença de cloro (AF + Cl₂), em todos os valores de pH. Estes resultados sugerem que houve redução no conteúdo de grupos contendo anéis aromáticos condensados e que a maior redução para a amostra AF + ClO₂, indica maior capacidade de oxidação deste oxidante, no período analisado. Esta observação é consistente com os resultados obtidos na emissão de fluorescência, com excitação a 320 nm (figura 3.1) e na absorção de luz UV-visível, na região do ultravioleta (250 nm e 272 nm), figuras 3.22 e 3.23, nas amostras AF + ClO₂.

3.4.4 Influência da presença de cloro e dióxido de cloro sobre o tamanho molecular de ácidos fúlvicos aquáticos

A cromatografia por exclusão de tamanho é um método que tem sido muito utilizado para a determinação do tamanho de moléculas como proteínas, polissacarídeos, dentre outras (Christian et al., 2000).

Atualmente há um intenso interesse no meio científico sobre a estrutura, forma e tamanho das moléculas de substâncias húmicas (Schulten e Schnitzer, 1993 e 1997; Swift, 1999; Wershaw, 1999; Piccolo et al., 1996 e 1999; Piccolo 2000; Simpson et al., 2000). Em diversos trabalhos foi empregada a cromatografia por exclusão de tamanho para fracionamento e análise das substâncias húmicas (Swift, 1999; Wershaw, 1999; Piccolo et al., 1996 e 1999; Piccolo, 2000; Piccolo e Conte, 2000; Frimmel, 2000).

Sabe-se que o processo de formação da matéria orgânica pode criar moléculas de vários tamanhos moleculares como um resultado das reações de oxidação, e das reações de condensação. Assim, um esforço para o entendimento sobre as condições desses compostos, requer algumas classificações da distribuição do tamanho molecular. Contudo, é preciso ter conhecimento da estrutura química, como ponto de partida, ou analisar alguns pontos do processo de formação da matéria orgânica. Também é importante a identificação do tamanho molecular correlacionando-o a outros grupos de tamanhos similares e/ou à contribuição de determinados compostos, (Alberts et al., 2000).

A cromatografia por exclusão, em vidro de porosidade controlada, apresenta uma grande vantagem em relação aos métodos clássicos como os géis orgânicos, por ser relativamente inerte à maioria das substâncias (Danneberg, 1977).

O vidro de porosidade controlada consiste em grânulos de vidro permeados, que formam uma grande rede interconectada de poros com tamanho controlado (figura 3.26). A separação de moléculas com diferentes tamanhos moleculares, se baseia no princípio de migração diferenciada do material que será analisado na coluna cromatográfica. Pelo fato de ocorrer um maior aprofundamento na matriz porosa, por parte das moléculas com menor tamanho molecular, estas por sua vez exibem um caminho mais tortuoso.

Moléculas com maior tamanho molecular são excluídas em menor tempo, por exibirem menor interação com o espaço poroso da coluna. Compostos de tamanho molecular intermediário exibem velocidades de migração compreendidas entre aquelas das classes de compostos anteriormente citadas (Meyer, 1993).

Figura 3.26 - Microfotografia de um grânulo de vidro de porosidade controlada, o diâmetro médio dos poros mostrado é de 300 nm.

Outras vantagens do vidro de porosidade controlada são: sua alta resistência mecânica o que possibilita a manutenção do fluxo, mesmo com variações na pressão interna; sua alta estabilidade térmica, sua pequena variação na distribuição do tamanho de poros; sua imunidade à degradação microbiana; e a possibilidade de

utilizar um fluxo entre cinco e dez vezes maior do que aquele utilizado em géis, reduzindo significativamente o tempo das análises.

I - Materiais e métodos

O sistema cromatográfico utilizado foi do tipo *Biologic LP System (Biorad)*, constituído por uma bomba peristáltica, vários sistemas de válvulas, um misturador de eluentes, um detector de UV-Vis (254 e 280 nm) equipado com uma célula de fluxo, um condutivímetro e um coletor de frações.

Utilizou-se uma coluna cromatográfica (Econo-Column Chromatography – BIO-RAD), com 10 mm de diâmetro interno e 500 mm de comprimento, que foi empacotada com vidro de porosidade controlada (*“controlled pore glass”-CPG, Electromucleonics, Fairfield, NJ*) de 120-200 *mesh* e um diâmetro de poros de 16,5 nm. Os eluentes utilizados foram previamente evacuados a fim de minimizar-se o problema com gases dissolvidos. O sistema é acoplado a um computador que registra os cromatogramas.

Foram preparadas amostras de ácido fúlvico tratadas e não tratadas com Cl₂ e dióxido de cloro, numa relação *oxidantes : ácidos fúlvicos* de 2 : 1. A solução,, contendo os AF, foi feita em sistema tampão fosfato (0.1 M KH₂PO₄/NaOH), a pH 7. Os experimentos foram realizados fazendo-se as corridas cromatográficas em intervalos de tempo de 15 min.

O valor K_d , conhecido como coeficiente de distribuição nos cromatogramas, é uma medida do tamanho molecular. Este foi calculado utilizando-se a equação 3.4.

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{eq.3.4}$$

onde V_e é o volume eluído, V_0 é o volume morto e V_t o volume total.

Estes valores foram obtidos pela eluição de uma solução aquosa teste, contendo 0,5 % de “blue dextran 2000” (massa molar = 2×10^6), sendo que o V_t foi determinado pela condutividade do eluente. Os maiores valores de K_d , são encontrados em amostras com baixo massa molecular.

II - Resultados e discussões

A oxidação com Cl_2 é um dos métodos mais empregados no tratamento de água, porém, a reação do Cl_2 com a matéria orgânica aquática pode produzir subprodutos com potencial carcinogênico, como os trihalometanos. A produção destes subprodutos, como mencionado anteriormente, está intrinsecamente relacionada com a quebra das moléculas orgânicas (Korshin e Violleau, 2000). No entanto, alternativas oxidantes como o dióxido de cloro têm sido relatadas na literatura. Nesse contexto, a cromatografia de exclusão pode ser utilizada no monitoramento deste tipo de reação;

A figura 3.27a ilustra os cromatogramas obtidos para a amostra de ácidos fúlvicos tratado, com Cl_2 , e a figura 3.27b para a amostra tratada com dióxido de cloro na mesma proporção.

Os ácidos fúlvicos foram eluídos em um único pico cromatográfico, com K_d aproximadamente igual a 0,55. Observa-se que, após 5 min do início do tratamento com os oxidantes, ocorreu um deslocamento do pico cromatográfico com maior valor para o coeficiente de distribuição (K_d). Em todas as amostras, os valores de K_d variaram de 0,55 (amostra sem oxidantes) para aproximadamente 0,60 (amostras com cloro) e de 0,65 (amostras com dióxido de cloro). Este deslocamento, para maiores valores de K_d , possivelmente esteve associado com a redução do tamanho

molecular da amostra de AF, após a reação com os oxidantes. Com o passar do tempo não ocorreu mais o deslocamento do pico cromatográfico, observando-se apenas, uma redução na absorbância. A amostra de AF apresentou uma absorbância a 254 nm de 0,16, e após 5 min do início do tratamento a absorbância foi de 0,13 nas amostras com cloro e 0,12 nas amostras com dióxido de cloro.

Figura 3.27 – Cromatogramas de uma amostra de ácidos fúlvicos tratada com: (a) cloro; (b) dióxido de cloro.

Embora os valores para o coeficiente de distribuição, estejam próximos, fica evidente a tendência à redução, do tamanho molecular das amostras, na presença dos oxidantes. Os dados de fluorescência confirmam a redução do tamanho molecular já que ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência na região de maior comprimento de onda. Como a emissão fluorescente de moléculas de maior tamanho molecular ocorre nesta região, pode-se atribuir o deslocamento do espectro para menores comprimentos de onda, com a redução do tamanho molecular, devido ao tratamento com ambos oxidantes.

3.5 Conclusões

Neste capítulo, técnicas como fluorescência e absorção de luz no UV-Visível, ressonância paramagnética eletrônica e cromatografia por exclusão de tamanho molecular, foram aplicadas para avaliar a influência da presença de dois tipos de oxidantes de água (como cloro e dióxido de cloro) sobre as características de ácidos fúlvicos extraídos de um manancial de área tropical.

Utilizando-se as técnica de fluorescência, foi possível verificar que provavelmente ocorreu uma reação entre os oxidantes e os fluoróforos presentes na matéria orgânica, uma vez que foi observado um decréscimo significativo na intensidade e na área de fluorescência. A intensidade de fluorescência foi afetada tanto pela variação do conteúdo de oxidante presente, como com a variação do tempo de reação. Esta intensidade de fluorescência, tendeu a ficar constante nas amostras com dióxido de cloro, a partir da razão molar igual a $[\text{ClO}_2] / [\text{COD}] \geq 0,08$, enquanto que para as amostras com cloro, a intensidade de fluorescência tende para valores acima da razão molar $[\text{Cl}_2] / [\text{COD}]$ igual a 1.

O comportamento da intensidade de fluorescência com a variação do tempo de reação, é diferenciado, para os AF na presença dos oxidantes. Na presença de cloro, esta intensidade decresceu exponencialmente, enquanto que nas amostras contendo dióxido de cloro, ocorreu um *quenching* seguido por uma estabilização.

Observou-se que ambos oxidantes, promovem um deslocamento do pico de emissão para menores comprimentos de onda, o que pode estar associado com a presença de estruturas aromáticas menos condensadas nos AF, após a reação com os oxidantes. Este deslocamento foi mais acentuado nas amostras contendo dióxido de cloro. Ao contrário do cloro, concentrações inferiores a $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ de dióxido de

cloro, são suficientes para proporcionar modificações na posição e largura da banda de emissão fluorescente.

Foi observado que após um período de reação de 24 horas, a excitação foi seletiva, pois foi mais ressonante somente a comprimentos de onda acima de 475 nm e 450 nm, e abaixo de 390 nm e 350 nm, amostras com cloro e dióxido de cloro, respectivamente. Portanto, após este período, a ressonância ocorreu com estruturas específicas, e não necessariamente com todas as estruturas presentes na amostra de AF. Por outro lado, após 168 horas do início da reação, estruturas que resistiram, ao ataque dos oxidantes (e.g. como grupos metoxi e hidroxil) tenderam a ser eliminadas. A eliminação dessas estruturas, contribuiu para uma menor formação do clorofórmio.

As mudanças observadas, por absorção de luz UV-Visível e particularmente os espectros obtidos por absorbância diferencial, constituíram-se em um indicativo da formação de subprodutos, o que foi confirmado pela técnica de cromatografia gasosa. O aumento da concentração de cloro e dióxido de cloro, adicionados à solução de AF, provou uma diminuição das absorbâncias à 254 nm e 272 nm, sendo que os decréscimos (os quais apresentam uma correlação linear com a concentração do oxidante na amostra) são indicativos da formação do total de halogênios orgânicos, trihalometanos e ácidos haloacéticos. Verificou-se uma redução maior das absorbâncias em 254 nm e 272 nm para as amostras de AF tratadas com dióxido de cloro, coerente com a maior capacidade oxidante deste.

Os dados obtidos por RPE mostraram que a presença dos oxidantes, em soluções a diferentes valores de pH (contendo a amostra de AF), afeta parâmetros como largura de linha e conteúdo de radicais livres presentes. Foi observada uma redução em torno de ~ 7 % e 20 % no conteúdo de radicais livres do tipo semiquinona, nas amostras de AF tratadas com cloro e dióxido de cloro,

respectivamente. O decréscimo mais acentuado dos radicais livres, para a amostra de AF, na presença do dióxido de cloro, mais provavelmente está associado a maior ação oxidante deste oxidante, quando comparado ao cloro e que há envolvimento de grupos aromáticos condensados, que são apontados como sítios de radicais livres semiquinona, nas reações com os oxidantes. Vale ressaltar que as observações obtidas por RPE foram totalmente coerentes com dados de emissão de fluorescência e absorção de luz UV-Visível.

Resultados obtidos com a cromatografia por exclusão de tamanho, em vidro de porosidade controlada, mostraram tendência a redução do tamanho molecular da amostra de AF, na presença dos oxidantes. As análises feitas com as técnicas de fluorescência de luz UV-Visível, absorção de luz UV-Visível, ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e cromatografia por exclusão de tamanho, geraram dados inéditos e coerentes entre si, sobre as alterações estruturais e o envolvimento de grupos químicos específicos (como anéis aromáticos condensados), nas reações de ácidos fúlvicos aquático com os oxidantes Cl_2 e ClO_2 . Também em todas as situações de análises, a maior capacidade oxidativa do ClO_2 , quando comparado ao Cl_2 , pode ser constatado de forma inequívoca.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS E PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

4.1 Conclusões gerais

Os resultados obtidos neste trabalho, reforçam a importância de utilizarem-se diversas técnicas independentes para o estudo de materiais tão complexos e heterogêneos como as substâncias húmicas e demonstram as potencialidades destas técnicas no estudo da estrutura e reatividade dessas substâncias e suas interações.

As combinações de métodos espectroscópicos, (como absorção e fluorescência de luz UV-Visível, ressonância paramagnética eletrônica, ressonância magnética nuclear) e cromatográficos (cromatografia gasosa para detecção dos trihalometanos e da cromatografia de exclusão de tamanho, para estudos de alterações no tamanho molecular) revelaram-se adequadas e geraram uma série de resultados inéditos e de interesse para a pesquisa sobre qualidade de água, para a gestão de recursos hídricos e, em especial para estações de tratamento de água.

Constatou-se um pico de máxima formação do CHCl_3 no período de 24 horas de reação com a utilização tanto do cloro quanto do dióxido de cloro. No entanto, o conteúdo de CHCl_3 formado, a partir do tratamento com dióxido de cloro foi 60 vezes menor quando comparado ao cloro, sendo a formação dependente da concentração dos ácidos fúlvicos e do pH da solução. Esses resultados sugerem novos procedimentos operacionais, para sistemas de abastecimento, com possível recomendação de distribuição da água após 24 horas de tratamento.

Com respeito às alternativas oxidantes, o dióxido de cloro mostrou-se mais eficiente quanto a menor formação do clorofórmio e maior ação oxidante sobre a matéria orgânica, quando comparado ao cloro. O dióxido de cloro oxidou mais rapidamente as estruturas dos AF, como pôde ser constatado através dos decréscimos da emissão de fluorescência, absorção de luz no UV-Vis, do nível de radicais livres do tipo semiquinona, bem como da redução do tamanho molecular desses ácidos.

Os experimentos desenvolvidos, contribuíram para um melhor entendimento sobre as características das substâncias húmicas aquáticas na presença e ausência de alternativas oxidantes como o cloro e o dióxido de cloro. O dióxido de cloro (ClO_2) mostrou-se um eficaz substituto do cloro (Cl_2), podendo melhor controlar a formação de subprodutos indesejáveis da oxidação como por exemplo o clorofórmio.

Fica evidente a importância de estudos e alternativas oxidantes que minimizem e até mesmo bloqueiem a formação de organoclorados, com atividade cancerígena, com a busca de alternativas que elimine o material orgânico refratário aquático, presente em estações de tratamento de água. As informações obtidas, fornecem algumas opções operacionais que poderão contribuir, para o desenvolvimento de novos processos ou ajustes nos procedimentos do tratamento da água para consumo humano.

4.2 Propostas de trabalhos futuros

- ✦ Aplicar técnicas espectroscópicas para avaliar as interações das substâncias húmicas aquáticas na presença de diferentes oxidantes de água, monitorando a formação de outros tipos de subprodutos como bromofórmio, diclorometano, bromo-diclorometano, MX, ácidos haloacéticos, TOX, etc.
- ✦ Monitorar a formação de subprodutos da oxidação em conjunto com testes toxicológicos
- ✦ Realizar estudos na busca de alternativas para a eliminação do material orgânico refratário aquático em estações de tratamento de água
- ✦ Monitorar a formação de subprodutos utilizando-se cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, para a identificação de outros possíveis subprodutos da oxidação.

CAPÍTULO 5**REFERÊNCIAS**

- ACHARD, F. K. Chemische untersuchung des torfs, Creel's. *Chem. Ann.*, n.2, p.391-403, 1786.
- AIETA, E. M.; BERG, J. D. A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *J. Am. Wat. Works Ass.*, v.78, n.6, p.62-72, june, 1986.
- ALBERT'S, J. J.; TAKÁCS, M.; EGEBERG, P.K. Total luminescence fluorescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography. In: International Meeting of the International Humic Substances Society 10th, Toulouse-França, 2000. *Proceedings* Toulouse, 2000. p.147-148.
- AMBERGER, K.; BAUMGÄRTNER, B. Generation and metering of chlorine dioxide crinking water and industrial water treatment applications. ProMinent Heidelberg, Dosiertechnik GmbH, 1995.
- ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos - teoria e prática. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1995. 335p.
- ARAÚJO, W. A. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em amostras de água empregando-se GC-FPD e HAS-SPME-GS-FPD. São Carlos, 2001, 109p, *Dissertação* (Mestrado).- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- ARTHUR, C. L.; POTTER, D. W.; BUCHHOLZ, K.D. Solid-phase microextraction for the direct analysis of water: theory and practice. *LC-GC*, v.10, n.9, p.656-661, sept. 1992.
- ARTINGER, R.; BUCKAU, G.; GEYER, S.; FRITZ, P.; WOLF, M.; KIM, J.I. Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. *Appl. Geochem.*, v.15, p.97-116, 2000.
- ASTER, B.; VON BOHLEN, A.; BURBA, P. Determination of metals and their species in aquatic humic substances by using total-reflection x-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Act.*, v.52, p.1009-1018, 1997.
- AZEVEDO, NETTO J. M.; PARLATORE A. C.; ROSSIN, A. C.; MANFRINI, C.; HESPANHOL, I.; CAMPOS, J. R. Técnica de abastecimento e tratamento de águas. 3 ed. São Paulo: CETESB, 1987, v.2.

- BAKER, A.; GENTY, D. Fluorescence wavelength and intensity variations of cave waters. *J. Hydrol.*, v.217, p.19-34, 1999.
- BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Quím. Nova*, v.24, n.2, mar./apr. 2001, p.172-175.
- BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. IN: 1º Seminário Nacional sobre Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos, Ribeirão Preto, 1999.
- BATALHA, B. H. L. Água para consumo humano. IN: BATALHA B. H. L.; COSTA T. C. R., editores. Água, saúde e desinfecção. São Paulo: CETESB, 1994. p.7-39
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; SAAB, S.C.; MILORI, D.M.P.; BAGNATO, V.S. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. *Geoderma*, v.105, n.1, p. 81-92, 2002.
- BELIN, C.; QUELLEC, C.; LAMOTTE, M.; EWALD, M.; SIMON, P. Characterization by fluorescence of the dissolved organic matter in natural water application to fractions obtained by tangential ultrafiltration and XAD resin isolation. *Environ.. Technol.*, v.14, p.1131-1144, 1993.
- BENNETT, L. E.; DRIKAS, M. The evaluation of colour in natural waters. *Wat. Res.*, v.27, n.7, p.1209-1218, 1993.
- BENNETTI, M. F.; RIEMSDIJK, W. H. V.; KOOPAL, L. K. Humic substances considered as a heterogeneous Donnan gel phase. *Environ. Sci. Technol.*, v.30, p.1805-1813, 1996.
- BERNARDES FILHO, F.; FORATO, L. A.; OSIRO, D.; VIEIRA, E. M.; MARTIN-NETO, L.; BONAGAMBA, T. J.; COLNAGO, L. A. Aplicações de métodos de reconhecimento de padrão em espectroscopia de IV, UV-visível e RMN. Workshop da Pós-Graduação em Química, 3: *Anais*. São Carlos-USP, 1996.
- BLOON, P. R. Vibrational, electronic, and high-energy spectroscopic methods for characterizing humic substances. IN: HAYES, M. H. B.; MACCARTHY, P.; MALCOLN, R. L., *Humic Substances II*, Search of Structure, by: p.409- 445, 1989.
- BOYCE, S. D.; HORNING, J. F. Reaction pathways of trihalomethane formation from the halogenation of dihydroxyaromatic model compounds for humic acid. *Environ.. Sci. Technol.*, v.17, p.202-211, 1983.
- BRASIL Leis, decretos, etc... Portaria n.36, de 19 de janeiro de 1990, Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá

outras providências Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília DF, n.14E, 19 jan. 1990. Secção 1.

BRESSOLE, F.; PETIT, M. B.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr B*, v.686, p. 3-10, 1996.

BRIAN, T. C.; SUMMER, E. M.; LEATHARD, A.D. Determination of Trihalomethanes in water Using Gas Syringe Injection of Headspace Vapours and Electron-capture Gas Chromatography. *Analyst*, v.111, p. 73 -76, 1986.

BUFFLE J.A.E. "Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux", IN: Conference Proceedings de la Commission d'Hydrologie Appliquee de A.G.H.T.M. l'Universite d'Orsay, p.3-10, 1977.

BUFFLE, J. Complexation reactions in aquatics systems: *Analytical Approach*, Chichester, Horwood, 1988.

BULL, R. J. Toxicology of disinfectants and disinfectant by-products. IN: CRAUN GF. Safety of water desinfection: balancing chemical and microbial risks. Washington (DC): ILSI Press, 1993. p.239-256.

BURBA, P.; SHKINEV, V.; SPIVAKOV, B.Y. On-Line fractionation and characterization of aquatic humic substances by means of sequential-stage ultrafiltration. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v.351, p.74-82, 1995.

CAELSON, M.; HARDY, D. Controlling DBPs with monochloramine. *J. Am. Wat. Works Ass.*, p.95-106, february, 1998.

CALABRESE, E. J.; KENYON, E. M. Air Toxics and Risk Assessment; USA, Lewis Publishers 1991, p.235-240,

CALACE N., DE PAOLIS F., MINNITI F., PETRONIO B. M. Purification of soluble fulvic acid low concentration by a diafiltration technique. *Talanta*, v.47, p. 803-809, 1998.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. Part II: Techniques for Study of Biological Structure and Function; Freeman: *Biophys. Chem.*, p.399, 1980.

CARVALHO, E.R. MARTIN-NETO, L.; MILOR, 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. *Aceito para publicação no J.Braz. Chem. S.*, 19p., 2003.

CELI, L.; SCHNITZER, M.; NÈGRE, M. Analysis of carboxyl groups in soil humic acids by wet chemical method, fourier-transform infrared spectrophotometry, and solute-state carbon-13 nuclear magnetic resonance: a comparative study. *Soil Sci.*, v.162, n.3, p.189-197, 1997.

CHANG, CHEN-YU; HSIEH, YUNG-HSU; SHIH, I-CHEN; HSU, SHEN-SHENG; WANG, KUO-HUA. The formation and control of disinfection by-products using chlorine dioxide. *Chemosphere*, v. 41, p. 1181-1186, 2000.

CHANG, CHEN-YU; HSIEH, YUNG-HSU; LIN, YU-MIN; HU, PO-YU; LIU, CHIN-CHUAN; WANG, KUO-HUA. The organic precursors affecting the formation of disinfection by-products with chlorine dioxide. *Chemosphere*, v. 44, p.1153-1158, 2001.

CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provide on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.41, p.352-358, 1977.

CHEN, J.; BAO HUA, GU; LEBOEUF, EUGENE J.; PAN, HONGJUN; DAI, SHENG. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, v. 48, p. 59-68, 2002.

CHEN-YU CHANG; YUNG-HSU HSIEH; YU-MIN LIN; PO-YU. H.; CHIN-CHUAN, L. KUO-HUA, W. The organic precursors affecting the formation of disinfection by-products with chlorine dioxide. *Chemosphere*, v.44, p.1153-1158, 2001.

CHOUDHRY, G. G. Interactions of humic substances with environmental chemicals. IN: AWTZINGER, O. The handbook of environmental chemistry. Berlin, SpringerVerlag 1982. p.103-127.

CHRISTIAN, H. S.; FRIMMEL, F. H. Specific interactions of organic substances in size-exclusion chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, p.2361-2366, 2000.

CLARCK, R. M. Managing water quality in distribution systems: simulating TTHM and chlorine residual propagation. *J. Wat. SRT-AQUA*, v.43, n.4, p.182, 1994.

CONDIE, W. L. Toxicological Problems Associated with Chlorine Dioxide. *J. Wat. Works Ass. Res. Technol.*, v.78, n.6, p. 73-78, june, 1986.

COLCLOUGH CA, JOHNSON JD,CHRISTMAN RF,MILLINGTONDS. Organic reaction products of chlorine dioxide and natural aquatic fulvic acids. IN: JOLLEY R.L.; BRUNGS W.A.; COTRUVO J.A.; CUMMINGS R.B.; MATTICE J.S.; JACOBS V.A., editors. Water chlorination, environmental impact and health e effects Ann Arbor, M.I: *Ann Arbor Sci.*, 1983. v.4, p.219 – 229.

CHRISTMAN, R. F.; JOHNSON, J. D.; HASS, J. R.; PFAENDER, F. K.; LIAN, W. T.; NORWOOD, D. L.; ALEXANDER, H. J. Natural and model aquatic humic : reactions with chlorine. IN: JOLLEY, H. GORCHEV; HAMILTON, D. H. eds. Water chlorination envirommental impact and health effects. *Ann Arbor Ann Arbor, Science*, 1978. v.2, p.15-28.

- CRUZES, M. V. Estudo de sítios de interação de ácidos húmicos com metais. São Carlos IQSC-USP Instituto de Química de São Carlos-USP, *Dissertação* (Mestrado), 1996. 65p.
- CZOCH, R.; FRANCIK, A. Instrumental effects in homodyne electron paramagnetic resonance spectrometers. New York, John Wiley & Sons, 1989.
- DAHLÉN, J.; BACKSTROM, M.; EPHRAIM, J.; BOÉM, H.; ALLARD, B. Determination of the molecular weight of fulvic acids by UV/VIS spectroscopy. *Chemosphere*, v.38, n.4, p.783-794, 1999.
- DANIEL, F. B.; CONDIE, L. W.; ROBINSON, M. STOBBER, J. A.; YORK, R. G.; OLSON, G. R.; WANG, S. R. Comparative subchronic toxicity studies of three disinfectants. *J. Am Water Works Assoc*, v.82, n.10, p.61-69, 1990.
- DANIELSSON, L. G. On the use filters for distinguishing between dissolved and particulate fractions in natural waters. *Wat. Res.*, v.16, p.179-182, 1982.
- DANNEBERG, O.H. Chromatography of humic substances of controlled pore glass. IN: SOIL organic matter studies: proceedings of a symposium on soil organic matter Studies Jointly organized by the International Atomic Energy Agency and the Food and Agriculture Organization of the United Nations in co-operation with Agrochimica and held in Braunschweig, 6-10, september 1976. Vienna: IAEA, v.2, 1977. p.221-228.
- DAVIS, R. B.; ANDERSON, D. S; BERGE, F. Palaeolimnological evidence that lake acidification is accompanied by loss of organic matter. *Nature*, v. 316, p. 436-438, 1985.
- DAISEY, J. M.; LEWANDOWSKI, C. G.; ZORZ, M. A photoreactor for investigations of the degradation of particle bound PAH's under simulated atmospheric conditions. *Environ. Sci. Technol.*, v.16, p. 857-67, 1982.
- DAVIS, W. M.; JOHNSTON, C. T.; DELFINO, J. J., PORTER, J. E. Quantitative Fourier transform infrared spectroscopic investigation of humic substance functional group composition. *Chemosphere*, v.38, n12, p.2913-2928, 1999.
- DEANGELO, A. B.; DAVID R. GETER; DANIEL W. ROSENBERG; CRARY C. K.; MICHAEL H. GEORGE. The induction of aberrant crypt foci (ACF) in the colons of rats by trihalomethanes administered in the drinking water. *Cancer Letters*, v.187, p. 25-31, 2002.
- DEMIN VA, SHERESHOVETS VV; MONAKOV J.B. Reactivity and the problems of oxidative destruction of lignin. with peroxy-reagents. *Uspekhi Khimii*, v. 68, n.11, p.1029-1050, 1999.
- DEOK-HEE CHO; SUNG-HO KONG, SEONG-GEUN O.H. Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. *Wat. Res.*, v.37, n.2, p. 402 -408, 2003.

- DE PAOLIS, F.; KUKKONEN, J. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere*, v.34, n.8, p.1693-1704, 1997.
- DE SOUZA SIERRA, M. M.; GIOVANELA, M.; DONARD, O. F. X.; BELIN, C. A utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da material orgânica dissolvida nas águas naturais : evolução e perspectivas. *Quim. Nova*, v.19,n.3, p.294, 1996.
- DIANOVA, I. V.; SINIKOVA, N.A. LEBEDEV, A. T. Formation of organochlorine compounds during aquatic chlorination of the phenolic fragments of humic matter. IN: International Meeting of the International Humic Substances Society, 10th (Toulouse-França) 2000, *Proceedings* Toulouse, 2000. p.1039-1042.
- DODDS, L.; KING, W.; WOOLCOTT, C.; POLE, J. Trihalomethanes in public water supplies and adverse birth outcomes. *Epidmiology*, v.10, n.3, p.233-237, 1999.
- DYCHDALA, G. R. Chlorine and chlorine compounds. IN: BLOCK S.S., editor. Disinfection, sterilization and preservation. 3 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983. p.157-182.
- ERICH, M. S.; TRUSTY, G. M. Chemical characterization of dissolved organic matter released by limed and unlimed forest soil horizons. *Canadian Journal of Soil Science*, v.77, n.3, p.405-413, 1997.
- ESTEVEES, V. I, DUARTE, A.C. Differences between humic substances from riverine, estuarine, and marine environments observed by fluorescence spectroscopy. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, v.28, n 7, p.359-363, 2000.
- EWALD, M.; BERGER, P.; VISSER, S.A. UV-visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as function of their molecular weights. *Geoderma*, v. 43, n.1, p.11-20, 1988.
- FAWELL, J. Risk assessment case study-chloroform and related substances. *Food and Chemical Toxicology*, v.38, n.1, p.91-95, 2000.
- FERNICOLA, N. A. G. G.; AZEVEDO, F. A. Water levels of trihalomethanes (THM) in four different supply systems from São Paulo, (Brazil). *J. Environ. Health*, v.46, p.187-188, 1984.
- FERREIRA, J. A.; NASCIMENTO, O. R.; MARTIN-NETO, L. Hydrophobic interactions between spin-label 5-SASL and humic acid as revealed by ESR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, n.4, p.761 – 765, 2001.

- FRANCOTTE, E.; DAVATAZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. *J.Chromatogr. B*, v.686, p.77-83, 1996.
- FRIMMEL F. H., CHRISTMAN R. F. Humic Substances and Their Role in the Environment, Berlin, John Wiley Interscience, 1988.
- FRIMMEL F.H., CHRISTMAN R.F. Development in aquatic humic chemistry. *Agronomie*, n.20, p.451-463, 2000.
- GALAPATE, R. P.; BAES, A. U.; OKADA, M. Transformation of dissolved organic matter during ozonation: effects on trihalomethane formation potential. *Wat. Res.*, v.35, n.9, p.2201-2206, 2001.
- GAUTHIER, T. D.; SEITZ, W. R.; GRANT, C. L. Compositional variations of dissolved humic materials on pyrene values. *Environ. Sci. Technol.*, v.21, p.243-248, 1987.
- GINWALLA, A. S.; MIKITA, M. A. Reaction of suwannee river fulvic-acid with chloramine - characterization of products via n-15 NMR. *Environ. Sci. Technol.*, v.26, n.6, p.1148-1150, 1992.
- GHOSH, K.; SCHNITZER, M. Effects of pH and neutral electrolyte concentration on free radicals in humic substances. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, v.44, p.975-978, 1980.
- GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*, v.68, n.9, p.305A-309A, 1996.
- GUGGENBERGER, G.; CHRISTENSEN, B.T.; ZECH, W. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. lignin and carbohydrate signature. *Eur. J. Soil Science*, v.45, p.449-458, 1994.
- JOLLEY R. L., BULL R. J., DAVIS W. P., KATZ S., ROBERTS M. H. JR., JACOBY V. A. Water chlorination: chemistry, environmental impact and health effects, chelsea, Lewis Publishers Inc., MI., 1985. v.5.
- JOHNSON, J. D., JENSEN, J. Thm and toxicity formation routes, rates and precursors. In: Awwa Seminar proceedings - strategies for the control of trihalomethanes, 1983, Las Vegas. *Proceedings*. Las Vegas: American Waters Works Association - AWWA, p.1-21, 1983.
- 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. Humic substances, Peats and Sludges. Health and Environmental Aspects; Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, p.39, 1997.

- KORN, C.; ANDREWS, R. C.; ESCOBAR, M.D. Development of chlorine dioxide-related by-product models for drinking water treatment. *Wat. Res.*, v.36, p.330-342, 2002.
- KORSHIN GV, LI C.W, BENJAMIN M.M. Use of UV spectroscopy to study chlorination of natural organic matter. IN: MINEAR R.A.; AMY G., editors. Water disinfection and natural organic matter. Washington DC, *Am. Chem. Soc.*, 1996.
- KORSHIN, G.V., CHI-WANG LI, M.M. BENJAMIN Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy. Evaluation of a consistent theory. *Wat. Res.*, v.31, n7, p.1787-1795, 1997.
- KORSHIN G.V. Section 1: Problem Identification – Overviews – Use of Differential Spectroscopy to Evaluate the Structure and Reactivity of Humics, *Water Sci. Technol.* v.40, p. 9–16, 1999.
- KORSHIN, G.; VIOLLEAU, D. Correlation between molecular weight and fluorescence emission in studies of NOM chlorination. IN: International Meeting of the International Humic Substances Society 10th, Toulouse-França, 2000. *Proceedings* Toulouse, 2000. p.73-76.
- KORSHIN, GREGORY V., WELLS W.WU; MARK M.BENJAMIN, OANA HEMINGWAY Correlations between differential absorbance and the formation of individual DBPs, *Wat. Res.*, v.36, n.13, p.3273- 3282, 2002.
- KRULL, I.; SWARTZ, M. Quantitation in method validation. LC-GC, v.16, n.12, p.1084-1090, 1998.
- KUMKE, M. U., ABBT-BRAUN, G.; DRIMMEL, F. H. Time resolved fluorescence measurements of aquatic natural organic matter (NOM). *Acta Hydrochim. Hydrobio.*, v.26, n.2, p. 73-81, 1998.
- HARRINGTON G.W.; BRUCHET A.; RYBACKI D.; SINGER P.C. Characterization of natural organic matter and its reactivity with chlorine. IN: MINEAR R.A.; AMY G.L., editors. Water disinfection and natural organic matter: characterization and control. Washington D.C., Amer Chem Soc., 1996. p.138 –158.
- HOWARD, A. G.; PIZZIE, R. A.; WHITEHOUSE, J. W. Studies of the halogenation of dissolved organic material during the chlorination of saline cooling waters, the model compounds resorcinol diacetate and resorcinol dimethyl ether. *Wat. Res.*, v.19, n.2, p.241-248, 1985.
- HUFFMAN, E. W. D. JR.; STUBER H. A. Analytical methodology for elemental analysis of humic substances . IN: AIKEN, G. R.; MCKNIGHT, M. D.; WERSHAW, R. L.; MACCARTHY, P. (eds). *Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, isolation and characterization*. New York, John Wiley & Sons, 1985, p.433-451.

JEZIERSKI, A.; FRANCISZEK, C.; JERZYKIEWICZ, M.; IWONA, G., JERZY DROZD C., EWA BYLINSKA, YONA, C.; MARK R.D. SEAWARD, F. Quantitative EPR study on free radicals in the natural polyphenols interacting with metal ions and other environmental pollutants. *Spectrochimica Acta Part A*, v.58, p.1293–1300, 2002.

JOSEPH P.D.; HAKAN B.; FRANK J.L.; TIMOTHY R.G. Preliminary assessment of transport processes in fluencing the penetration of chlorine into wastewater particles and the subsequent inactivation of particle-associated organisms. *Wat. Res.*, v. 37, p.139 –149, 2003.

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*, n.40, p. 1305-1312, 2000.

KARINI, A. A., SINGER, P. C. Trihalomethane formation in open reservoirs. *J. Am. Wat. Works Ass.*, v.83, p.84-88, 1991.

KORSHIN G.V. KUMKE, M. U.; LI, C.W.; FRIMMEL, F.H. Use of differential spectroscopy to evaluate the structure and reactivity of humics. *Wat. Sci. Technol.* v.40, p. 9–16, 1999.

KORSHIN, G.V.; KUMKE, M. U.; LI, C.W.; FRIMMEL, F.H. Influence of chlorination on chromophores and fluorophores in humic substances. *Environ. Sci Technol*, v.33, p.1207-1212, 1999.

KORSHIN, G.; VIOLLEAU, D. Correlation between molecular weight and fluorescence emission in studies of NOM chlorination. IN: International Meeting of the International Humic Substances Society 10th, Toulouse-França, 2000. *Proceedings Toulouse*, 2000. p. 73-76, 2000.

KORSHIN GREGORY V., WELLS W.WU, MARK M.BENJAMIN, OANA HEMINGWAY. Correlations between differential absorbance and the formation of individual DBPs. *Wat. Res.*, n.36, p.3273- 3282, 2002.

KRAYBILL, H.F. Carcinogenesis of Synthetic Organic Chemicals in Drinking Water. *J. Am. Wat. Works Ass.*, n.73, p.370-372, 1981.

KULOVAARA, M.; CORIN, N.; BACKLUND, P.; TERVO, J. Impact of UV 254 irradiação of aquatic humic substances. *Chemosphere*, v.33, n5, p.783-790, 1996.

KUMKE MU,FRIMMEL FH; ARIESE F,GOOIJER C. Fluorescence of humic acids (HA) and pyrene-HA complexes at ultralow temperature. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, p.3818 –23, 2000.

- LACERDA, C. A.; GUANDALINI, S. Comparative study of the extraction efficiency of organophosphorus pesticides in water using Solid-Phase Microextraction (SPME) and Solid-Phase Extraction (SPME). *International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis*, 21, Utah, 1999, p. 90.
- LACERDA, C. A.; PINTO, JAIR SEBASTIÃO DA SILVA; LANÇAS, F. M. Development of new SPME fibers using bonded silica particles for SPME-HPLC determination of herbicides river water. IN: International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 25, Maastricht; p. 234, 2001.
- LANÇAS, F. M. Cromatografia em fase gasosa, São Carlos (SP). Acta Brasil, 1993, 254p.
- LEHTONEN, T.; PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Characterization of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques: tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Analy. Chem. Acta*, n.424, p. 91-103, 2000.
- LEVINE, D. A.; BAUMANN R. E.; LIND, L. B. Curbing THMs in small water systems. *J. Am. Wat. Works Ass.*, p.52-56, 1987.
- LI, J. W., YU, Z.; CAI, X.; GAO, M.; CHAO, F. Trihalomethanes formation in water treated with chlorine dioxide. *Wat.Res.*, v.30, n.10, p.2371-2376, october, 1996.
- LI C.W.; KORSHIN G.V.; BENJAMIN M.M. Monitoring formation of disinfection by-products with differential UV spectroscopy. *J. Am. Wat. Work Assoc*, v.90, n.8, p.88 –100, 1998.
- LIMA; I. R. Controle de trihalometanos em sistemas de abastecimento por adsorção em colunas de carvão ativado granular em estação de tratamento de água. São Paulo, 1993.200p. *Dissertação (Mestrado)*- Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- LOMBARDI, A. T.; JARDIM, W. F. The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching. *Chem. Speciat. Bioavail*, v.9, n.1, p.1-8, 1997.
- LOMBARDI, A. T.; JARDIM, W.F. Fluorescence spectroscopy of high performance liquid chromatography fractionated marine and terrestrial organic materials. *Wat. Res.*, v. 33, n.2, p. 512-520, february, 1999.
- LOUCH, D; MOTLAGH, S; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Anal. Chem.*, v.64, n.10, p.1187-1199, 1992.

- 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. *Appl. Geochem.*, v.15, n.7, p.1019-1033, 2000.
- MACÊDO, J. A. B. Determinação de trihalometanos em águas de abastecimento público e indústria de alimentos. Viçosa, 1997, 90p. Tese (Doutorado)-Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa,
- MACÊDO, J. A. B. *Águas & Águas*. Belo Horizonte: ORTFOFARMA, 2000, 505p.
- McINTYRE, C.; BATTS, B. D.; JARDINE, D. R. Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids. *J. Mass Spectrom*, v.32, n.3, 328-330, 1997.
- MALCOLM, R. L. Applications of solid-state ^{13}C NMR spectroscopy to geochemical studies of humic substances. IN: HAYES, M. H. B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R. L., Humic Substances II, Search of Structure, 1989, New York, Wiley, p.339-372.
- MALLEVIALLE, J. Why is natural organic matter problematic? In: Natural Organic Matter Workshop, Atelier de Recherche matieres Organiques Naturelles, 18-19, p.I-1-I-15, sept., 1996.
- MARINSKY, J. A.; REDDY, M. M. Vapor-pressure osmometric study of the molecular-weight and aggregation tendency of a reference-soil fulvic-acid. *Anal. Chem. Acta*, v.232, n.1, p.123-130, 1990.
- MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J.; POPPI, N.R. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil. *Soil Sci.*, n. 51, 1991, p.369-376.
- MARTIN-NETO, L.; ROSELL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. *Geoderma*, v.81, p. 305-311, 1998.
- MARTIN-NETO, L.; TRAGHETTA, D. G.; VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; SPOSITO, G. News on mechanisms of reaction between atrazine and hydroxy-atrazine with humic and fulvic acids obtained by spectroscopy and polarographic analysis. *J. Environ. Qual.* v. 30, p.520 – 525, 2001.
- MARQUES, J. C. Caracterização química e espectroscópica de substâncias húmicas de solos submetidos à adição de lodo de esgoto. São Carlos, 1998, 93p, *Dissertação* (Mestrado).- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- MELNICK, R. L. Toxicology and carcinogenesis studies or tribromethane. Washington, U.S. Department of Health and Human Services, 1989, 194p.
- MEYER, V.R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. New York, John Wiley, 1994. 352p.

- MEYER, S. T. O uso do cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. *Caderno Saúde Pública*, v.10, n.1, p.99-110, jan/mar, 1994.
- MCCARTHY, P.; CLAPP, C. E.; MALCOLM, R. L.; BLOOM, P. R. Humic substances in soil and crop science: Selected readings: Inc, Madison, American Society of Agronomy, 1990.
- MCKNIGHT, D. M.; HORNBERGER, G. M.; BENCALA, K. E.; BOYER, E. W. Chemical Fractionation of Suwannee River fulvic acid in the sorption onto iron oxides: results from a stream scale experiment in an acid mine drainage stream. In: International Meeting of the International Humic Substances Society 10th, Toulouse-França, 2000. *Proceedings Toulouse*, 2000. p.433-436.
- MEYERS, P.A.; ISHIWATARI, R. Lacustrine organic geo-chemistry: an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Org. Geochem.*, v.20, p.867-900, 1993.
- MIANO, T.M.; SPOSITO, G.; MARTIN, J.P. Fluorescence spectroscopy of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.52, p.1016-1019, 1988.
- MIANO, T. M.; SENESI, N. Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry. *Sci. Total Environ.*, v.117, n.118, p.41-51, 1992.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, D V. S. Humification degree of soil humic acid determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sc.*, v.167, n.11, p.739-749, 2002.
- MONSALLIER, J. M.; SCHERBAUM, F.; BUCKAU, G.; KIM, J. Photodegradation of humic acid. IN: International Meeting of the International Humic Substances Society 10th, Toulouse-França, 2000. *Proceedings Toulouse*, 2000. p.149.
- 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: Spring Verlag, 1990, 190p.
- NIEDAN, V. ; PAVASARS, I.; OBERG, G. Chloroperoxidase-mediated chlorination of aromatic groups in fulvic acid . *Chemosphere* , v.41, n.6, p.779-785, 2000.
- NISSINEN T.K.; MIETTINEN, I.T.; MARTIKAINEN P.J.; VARTIAINEN T. Disinfection by-products in finnish drinking waters. *Chemosphere*, v.48, p. 9-20, 2002.
- NUNES, NILO *Projeto Itapanhaú*, Bertioaga, Bertigraph-Adm, 2002, 76p.

- OXYCHEM. Folha de dados de segurança (MSDS) do dicloroisocianurato de sódio. Dallas, Occidental Chemical Corporation, 2001. 8p.
- PACKHAM R.F. Studies of organic colour in natural water, *Proc. Soc. Water Treat. Exam.*, v.13, p.316-334, 1964.
- PARKINSON, A.; BARRY, M.; HOBDAV, M.; RODDICK, F. The effect of a range of uv walenlghs on aquatic natural organic matter. In: International Meeting of the International Humic Substances Society 10th, Toulouse-França, 2000. *Proceedings* Toulouse, 2000. p.57-60.
- PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, v.38. p.270-277, 2000.
- PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal.Chim. Acta*, v.337, n.2, p.133-149, 1997.
- PIANA, M.J.; ZAHIR, O. Investigation of metal binding of humic substances using fluorescence emission and synchronous-scan spectroscopy. *J. Environ. Sci. Health.*, B35, p.87-102, 2000.
- PICCOLO, A.; STEVENSON, F. J. Infrared spectra of Cu^{+2} , Pb^{+2} and Ca^{+2} complexes of soil humic substances. *Geoderma*, v.27, n.3, 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,n.4, p.595-602, 1996a.
- PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *Euro. J. Soil Sci.*, v.47, p.319, 1996b.
- PICCOLO, A.; CONTE, P.; COZZOLINO, A. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *Euro. J. Soil Sci.*, v.50, p. 1-8, 1999.
- PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. *Adv. Environ. Res.*, v.3, p.508-521, 2000.
- PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: puma revisão para químicos analíticos. *Quim. Nova*, v.19, n.13, p.268-276, 1996.
- PLUMMER, J. D.; EDZWALD, J. K. Effect of ozone on disinfection by-product formation of algae. *Water Sci. . Technol.* v.37, n2, p.49-55, march-april, 1998.
- POMES, M. L. GREEN, W. R.; THURMAN, W. H. O., LERCH, H. E. DBP formation potential of aquatic humic substances. *J. Am. Wat. Works Ass.*,

march, v. 91, p. 103-115, 1999.

POOLE, C. P.; FARACH, H. A. The theory of magnetic resonance. Somerset, John Willey & Sons, 1972. 452p.

REUTER, J. H., PERDUE, E. M. Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural water. *Geochimica Cosmochimica Acta*, v.41, n.2, p.325-334, 1977.

RECKHOW, DAVID A., SINGER, PHILIP C., and MALCOLM, RONALD L. Chlorination of humic materials. Byproduct formation and chemical interpretations. *Environ. Sci. Technol.*, v.24, n.22, p.1655-1664. 1990.

RIBEIRO, L. F.; FASANARO, R.; LAPOLLI, F. R. Dióxido de cloro: suas características e aplicação na desinfecção de águas residuárias. Disponível em: <<http://www.ingenieroambiental.com/info/desinfeccion.pdf>>. Acesso em 23 jun. 2002.

RICHARDSON, S. D.; THRUSTON, JR.; COELLETTE, T. Multispectral identification of chlorine dioxide disinfection byproducts in drinking water. *Environ. Sci. Technol.*, v.28, n.4, p.592-599 1994.

RIFFALDI, R.; SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. P.*, v. 36, p.301 – 305, 1972.

ROCHA, J. C. Estudos das interações de íons metálicos com substâncias húmicas aquáticas. Araraquara, 1997. *Tese* (Livre Docência)- Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

ROCHA, J. C.; SENE, J. J.; BURBA, P.; KLOCKOW, D. Interaction of mercury (II) with Humic Substances from the Rio Negro (Amazonas State, Brazil) by means of an ion exchange procedure. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, n.1, p.79-84, 1998.

ROCHA, J.C.; SARGENTINI JR, É.; ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SANTOS, A.; BURBA, P. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro) – A possible process of the mercury cycle in Brazil. *Talanta*, v.53, n.3, p.551-559, 2000.

ROOK J.J. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Wat. Treat. Exam.*, v.23, p. 234–243, 1974.

ROOK, J. J. Chlorination reactions of fulvic acids in natural waters *Environ, Sci. Technol.*, v.11,n.5, p.478-482, 1977.

ROOK, J., EVANS, S. Removal of trihalomethane precursors from surface waters using weak base resins. *J. Am. Wat. Works Ass.*, v.9, n.71, p.520-524, 1979.

ROSA, A. H. Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfas utilizando-se hidróxido de potássio. Araraquara, 1998. 97p.

- Dissertação* (Mestrado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.
- SAAB, S. Caracterização da material orgânica em gleissolos por espectroscopias de EPR, RMN, IV e UV-Visível. São Carlos, 1999, 111p. *Tese* (Doutorado)-USP, Instituto de Química de São Carlos.
- SAAR R. A.; WEBER H. J. Fulvic acid: metal-ion chemistry. *Environ. Sci. Technol.*, v.16, n.9, p. 510A-517A, 1982.
- SAMPAIO PEREIRA, A. M. Detecção espectrofotométrica de trihalometanos em águas de abastecimento público. Porto Alegre, 1989. 141p. *Dissertação* (Mestrado)- UFRGS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SIMPLÍCIO, A. L.; BOAS, L. V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A*, v.833, n.1, p.35-42, 1999.
- SIMPSON, A.J.; KINGERY, W.L.; HAYES, M.H.B.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P.; KERSSEBAUM, R.; GODEJOHANN, M.; HOFMANN, M. The structure and associations of organic molecules in the terrestrial environment. In: International Meeting of the International Humic Substances Society 10th, Toulouse-França, 2000. *Proceedings* Toulouse, 2000. p.1109-1112.
- SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. Humic Substances in the Environment; New York, Marcel Dekker, 1972. p. 92.
- SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. Soil Organic Matter. Amsterdam, Elsevier Scientific, 1978. 319p.
- SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, v.80, p.29-30, 1993.
- SCHUNLTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften*, v.82, p.487-498, 1995.
- SCHWARZENBACH, R. P. Environmental Organic Chemistry. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1993.
- SENESI, N.; MIANO, T. M.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci. Total Environ.*, v.81, n.82, p.143-156, 1989.
- SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acids and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Anal. Chim. Acta.*, v.232, n.51, p.77-106, 1990.

- SENESE, N.; MIANO, T.M.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, v.152, p.259-271, 1991.
- SIERRA, M. M. S.; GIOVANELA, M. Propriedades de fluorescência de compostos húmicos sedimentares e das águas intersticiais adjacentes. IN: Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas, 2, São Carlos, 1997. *Anais*. São Carlos, Embrapa-Cnpdia, 1997. p.171.
- SILVA M. R. Estudos potenciométricos e flurimétricos dos equilíbrios ácido-básicos e da complexação de metais com o Obisdien e as substâncias húmicas. Contaminação pelos metais em sedimentos da Ilha de Santa Catarina (Brasil) Santa Catarina, 1996. 220p. *Tese* (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina.
- SINGER, L.S. Synthetic ruby as a secondary standard for the measurement of intensities in electron paramagnetic resonance. *J. Appl. Phys.*, v.30, p.1463-1464, 1959.
- SINGER, P. C. Formation and characterization of disinfection. IN: CRAUN G.F. Safety of water disinfection: balancing chemical and microbial risks. Washington (DC): ILSI Press, 1993. p.201-219.
- SILVERSTAIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994. 387p.
- SPARK, K.M.; SWIFT, R.S. Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. IN: STEVENSON, F. J. Humic substances in the global environment and implications on human health. Amsterdam, Elsevier Scientific, 1994. p.153. Humus Chemistry, New York, Wiley & Sons, 1982. p.26-53.
- STEVENSON, F. J. Humus Chemistry: genesis, composition, reactions, 2nd ed.; Wiley, New York, Interscience, 1994. 496 p.
- STEVENSON, F. J. Húmus Chemistry, Gênese, Composição Reações, Spectroscopic Approaches. IN: HAYES, M. H. B., MACCARTHY, P., MALCOLM R. L., SWIFT, R. L., Eds.; J. New York, Wiley and Sons, Chapter 11, p.264-284, 1982.
- STEVENS, A. A.; MOORE, L. A.; MILTNER R. J. Formation and control of non trihalomethane disinfection by-products. *J. Am. Wat. Works Ass.*, v.89, p.5-100 (May 1997).
- SWIFT, R.S. Macromolecular properties of soil humic substances: fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.* v.164, p.790-802, 1999.
- SYMONS, J.M.; BELLAR, T.A.; CARSWELL, J.K.; DeMARCO, J.; KROPP, K.L.; ROBECK, G.G.; SEEGER, D.R.; SLOCUM, C.J.; SMITH, B.L.; STEVENS,

- A.A. National organics reconnaissance survey for halogenated organics in drinking water. *J. Am. Wat. Works Ass.*, v. 67, p. 634-647, november, 1975.
- SWIFT, R. S. Molecular weight, size, shape, and charge characteristics of humic substances: some basic considerations. IN: HAYES, M. H. B., MACCARTHY, P. ; MALCOM, R. L.; SWIFT, R. S.; Humic Substances II: In Search of Structure, Eds.; Wiley: Chichester, 1989. p.449.
- SWIETLIK, J.; RACZYK, U.; BILOZOR S.; ILECKI, W.; NAWROCKI, J. Adsorption of natural organic matter oxidized with ClO_2 on granular activated carbon. *Wat.Res.*, v.36, n.9, p.2328 –2336, 2002.
- SWIFT, R. S. Molecular weight, size, shape, and charge characteristics of humic substances: some basic considerations. In humic Substances II, In: HAYES, M. H. B., MCCARTHY, P. ; MALCOM, R. L.; SWIFT, R. S.; Eds., Search of Structure, Wiley: Chichester, p.449, 1989.
- TANFORD, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. New York, Wiley, 1980.
- TAKAHO, W.; CHANG, Q. L.; SHU, M. C.; YOSHIHIRO, Y.; KATSUMI, U.; KEIKO, O.; KAZUO, I. Fluorophotometric determination of chlorine dioxide with chromotropic acid. *Anal. Sci.*, v.8, p.207-211, april, 1992.
- TOMINAGA, M. Y. Trihalometanos em água de abastecimento-validação e correlação de dois métodos de análise por cromatografia em fase gasosa. São Paulo, 1998. *Dissertação* (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
- TOMINAGA, M. Y.; ANTONIO, F. M. Exposição humana a trihalometanos *Rev. Saudi Publican*, v.33, n.4, p.413-421. Sao Paulo, ago., 1999.
- THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. Preparation isolation of aquatic substances. *Environ. Sci. Technol.*, v.15, p.463-466, 1981.
- THURMAN, E. M. Humic substances in groundwater. IN.: AIKEN, G. R.; MCKNIGHT, D. M.; WERSHAR, R.; MACCARTHY, P. (Eds). Humic Substances in Soil, Sediment and Water, John Wilwy & Sons, New York, 1985. p.87-104.
- THURMAN, E. M. Organic geochemistry of natural waters; The Netherlands, Nijhoff/Junk: Dordrecht, 1985. p489.
- VISSER, S. A.; CHRISTMAN, R. F.; GJESSING, E.T. (Eds) Aquatic and Terrestrial Humic Materials, *Ann Arbor, Ann Arbor Science*, 1983. p.183.
- WAKSMAN, S. A. Humus Baltimore, Willians and Wilkins, 1936. Apud Stevenson, F. J. Humus chemistry. New York, Wiley & Sons, p.26-53, 1936.

- WANGERSKY, P. J. Dissolved organic carbon methods: a critical review. *Marine Chem.*, v.41, n.1, p.61-74, 1993.
- WERSHAW, R. L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.*, v.1, p.29-45, 1986.
- WERSHAW, R. L. Model for humus in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, v.27, n.5, p.814-816, 1993.
- WERSHAW, R.L. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Sci.*, v.164, n.11, p.803-813, 1999.
- WERTZ, J. E.; BOLTON, J. R. Electron spin resonance. New York, Mc Graw Hill, 1972. p.11-61.
- WETZEL, R. G. *Limnology*, Philadelphia: Saunders, 1983. 767p.
- WOLFBEIS, O. S. Molecular luminescence spectroscopy, methods for routine determination of organic carbon in soil. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, v.19, p.1467-1476, 1985.
- WU, W. W.; MARK BENJAMIN, M. M.; KORSHIN, G. V. Effects of thermal treatment on halogenated disinfection by-products in drinking water. *Wat. Res.*, v.35, n.15, p.3545-3550, 2001.
- YAMADA, E.; OZAKI, T.; KIMURA, M. Determination and behavior of humic substances as precursors of trihalomethane in environmental water. *Anal. Sci.*, v.14, n.2, p.327-332, april, 1998.
- 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.
- 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, n.1, p.45-50, 1999.