

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

GISELLE BARATTI MAGDALENO

Alguns estudos da fluorescência e quimiluminescência
de substâncias húmicas

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
28/09/2007

GISELLE BARATTI MAGDALENO

Alguns estudos da fluorescência e quimiluminescência
de substâncias húmicas

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química (Química Analítica)

Orientadora: Profa. Dra. Nina Coichev

São Paulo

2007

Giselle Baratti Magdaleno

Alguns estudos da fluorescência e quimiluminescência de substâncias húmicas

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química Analítica.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais
Fernando e Suefy
com carinho*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas aquelas pessoas e instituições que acompanharam, apoiaram e ajudaram na realização desta tese, em especial:

À professora Nina Coichev, pela prestativa e dedicada orientação, que não poupou fins de semana e feriados quando precisei, e, sobretudo pela amizade e incentivo ao longo destes 7 anos de trabalho em conjunto, desde a graduação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado (02/11649-3) e a subsequente bolsa de Doutorado Direto (04/14609-8).

Aos professores Eduardo A. Neves, Julio César Rocha, Maria Olímpia de Oliveira Rezende, Jorge César Masini, pelo gentil fornecimento das amostras de ácidos húmicos, fúlvicos e substâncias húmicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

A todo os companheiros do grupo de pesquisa do laboratório de estudos cinéticos e termodinâmicos em química analítica: María, Rubem, Rodrigo, Margareth, Horácio e Patrícia.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial à amiga Maria Cristina, pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Às secretárias da Química Analítica, Marlene e Célia.

A Eduardo Enrich pela revisão do “*abstract*”.

Aos amigos químicos, companheiros da pós-graduação, que sempre estiveram por perto durante o desenvolvimento deste trabalho: Mafê, Lúcia, Luciana, Rodrigo, Osmar, Ricardo “Habib” e Volnir. Sem deixar de mencionar os demais amigos “Moitas” do IQ-USP, entre eles Gisele “Loira”, Fábio Mielle, Ricardo “Tchaca”, Gabriel, Jorge Luiz, e, com certeza, muitos outros.

Ao querido amigo e namorado Gaston, pela ajuda na formatação das tabelas, figuras e revisão do texto e por todo apoio na reta final de elaboração desta tese.

A meus pais Fernando e Suely, meu irmão Denis, minha cunhada Camilla e toda família pelo enorme apoio e amor, e por tudo que eles representam.

RESUMO

Magdaleno, G.B. **Alguns estudos da fluorescência e quimiluminescência de substâncias húmicas**. 2007. (139p). Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Investigou-se a influência de íons metálicos Al(III), Ca(II), Fe(III), Pb(II), Cu(II) e Cr(III) (10^{-6} a 10^{-3} mol L⁻¹) na intensidade relativa de fluorescência (IRF) do ácido húmico (AH, 10 mg L⁻¹). Os íons Cu(II), Pb(II) e Cr(III) produziram um efeito de supressão, enquanto os íons Fe(III), Al(III) e Ca(II) não influenciaram significativamente nos valores de IRF.

A partir dos valores de IRF foram calculadas a constante de estabilidade (K) dos complexos e a capacidade complexante do AH com Cu(II), Pb(II) e Cr(III). Os valores de K seguiram a ordem: Cr(III) > Pb(II) > Cu(II) e a capacidade complexante: Cr(III) ~ Pb(II) > Cu(II).

Desenvolveu-se um novo método analítico baseado na reação quimiluminescente da oxidação do AH com peroxomonossulfato de potássio (PMS; 0,6 mol L⁻¹) em meio básico (NaOH 1,0 mol L⁻¹). A intensidade máxima de radiação emitida ($I_{máx}$) e a área em função do tempo foram lineares com a quantidade de AH em solução na faixa de 0,5 a 20 mg L⁻¹, com limite de detecção de 0,24 mg L⁻¹. Um estudo comparativo foi realizado utilizando-se H₂O₂ (0,58 mol L⁻¹) na presença de CH₂O (0,44 mol L⁻¹) em meio básico (NaOH 0,16 mol L⁻¹), com limite de detecção de 0,4 mg L⁻¹.

As adições dos íons Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, CO₃²⁻, Fe(III), Cu(II), Cr(III) e Ca(II) na reação quimiluminescente de AH com PMS, não interferiram significativamente no sinal.

Adições de 50 mg L⁻¹ de Co(II) ou Mn(II) à solução de AH Aldrich, na forma de complexos de EDTA ou cloretos, aumentaram o valor de $I_{máx}$ devido à formação de espécies fortemente oxidantes como SO₅^{•-}, SO₄^{•-} e HO[•] durante a reação de decomposição do PMS. O método foi aplicado para determinar a concentração de AH em amostra de água do Rio Miranda – MS, obtendo-se valores entre 2,9 a 12,3 mg L⁻¹.

As reações de oxidação, com emissão de radiação, de alguns compostos orgânicos com PMS em meio básico foram estudadas. Com os polifenóis obtiveram-se intensidades de radiação mais significativas e os valores de área seguiram a seguinte ordem: floroglucinol >> ácido fúlvico > ácido húmico > resorcinol > ácido pirogálico > catecol > hidroquinona. Desta forma, como polifenóis existem na estrutura de substâncias húmicas, acredita-se que essas porções da molécula devem ser as responsáveis pela produção de quimiluminescência.

Palavras-chave: (substâncias húmicas, polifenóis, peroxomonosulfato, fluorescência, quimiluminescência)

ABSTRACT

Magdaleno, G.B. **Some studies on fluorescence and chemiluminescence of humic substances.** 2007. 139p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The influence of Al(III), Ca(II), Fe(III), Pb(II), Cu(II), and Cr(III) metal ions (10^{-6} to 10^{-3} mol L⁻¹) on the relative fluorescence intensity (RFI) of humic acid (HA, 10 mg L⁻¹) was investigated. Cu(II), Pb(II), and Cr(III) ions produced a quenching effect, while Fe(III), Al(III), and Ca(II) ions did not significantly interfere with RFI values.

Stability constants (K) and complexing capacities of HA with Cu(II), Pb(II), and Cr(III) were obtained using RFI values. Stability values of complexes followed the order: Cr(III) > Pb(II) > Cu(II) and the complexing capacity values: Cr(III) ~ Pb(II) > Cu(II).

A new analytical method was developed based on the chemiluminescent oxidation of HA by peroxymonosulfate (PMS; 0.6 mol L⁻¹) in basic medium (NaOH 1.0 mol L⁻¹). The intensity of radiation emission (I_{\max}) and area vs. time were linear functions of HA concentration range of 0.5-20 mg L⁻¹. The detection limit was 0.24 mg L⁻¹. A comparative study was conducted using H₂O₂ (0.58 mol L⁻¹) in the presence of CH₂O (0.44 mol L⁻¹) in basic medium (NaOH 0.16 mol L⁻¹). The detection limit was 0.4 mg L⁻¹ of HA.

The addition of Cl⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, CO₃²⁻, Fe(III), Cu(II), Cr(III), and Ca(II) to the chemiluminescent reaction of HA with PMS did not interfere with the signal.

The addition of 50 mg L⁻¹ Co(II) or Mn(II) (as EDTA complexes or chloride salts) to the HA sample enhanced radiation emission, due to the formation of strong oxidant species such as SO₅^{•-}, SO₄^{•-}, and HO[•] during PMS decomposition reaction. This method was applied to determine HA concentration in a sample of river water (Miranda River – MS), obtaining values between 2.9 and 12.3 mg L⁻¹.

Oxidation reactions of some organic compounds by PMS in basic medium were studied, which produced radiation emission. Polyphenols produced the highest emissions and the area values followed the order: phloroglucinol > fulvic acid > humic acid > resorcinol > pyrogalic acid > catechol > hydroquinone. Since polyphenolic groups

are supposed to exist within humic acid structure, those portions of the molecule are most likely to be responsible for that chemiluminescence.

Keywords: humic substances; polyphenols, fluorescence, chemiluminescence, and peroxymonosulfate.

LISTA DE ABREVIATURAS

A = coeficiente linear da curva analítica

AF = ácido fúlvico

AH = ácido húmico

C_c = capacidade complexante

C_L = concentração total de sítios de coordenação do AH

C_M = concentração total de íon metálico

DPR = desvio padrão relativo

I_{máx} = intensidade máxima de radiação emitida

I_{ML} = intensidade de fluorescência quando todo AH está complexado com íon metálico

IRF = Intensidade relativa de fluorescência

K = constante de estabilidade condicional do complexo ML (1:1). $K = [ML]/([M] * [L])$, sendo [L] a concentração de AH não complexado e [M] a concentração do íon metálico livre

LD = limite de detecção

M = coeficiente angular da curva analítica

m = razão dos valores de M na presença e na ausência de Co(II) ou Mn(II)

PMS = íon peroxomonosulfato (HSO₅⁻)

QL = quimiluminescência

SH = substância húmica

PREFÁCIO

Os estudos realizados nesta tese de doutoramento são apresentados nos capítulos a seguir.

No capítulo 1 são apresentados os objetivos da tese, além de um levantamento amplo, com apreciação crítica, dos trabalhos reportados na literatura sobre a interação de substâncias húmicas com íons metálicos e dos principais métodos analíticos utilizados na determinação da concentração de substâncias húmicas aquáticas.

Os capítulos 2 a 5 descrevem as investigações sobre a fluorescência e quimiluminescência de substâncias húmicas aquáticas e de alguns compostos orgânicos. Para um entendimento melhor do leitor optou-se por apresentar cada um dos estudos separadamente, dividindo-os em parte experimental, resultados, discussões e conclusões. A numeração de equações, figuras e tabelas também foram organizadas considerando-se cada capítulo individualmente.

No capítulo 6, algumas considerações finais e conclusões são apresentadas comparando os resultados obtidos com a literatura.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Objetivos.....	16
1.2. As substâncias húmicas	17
1.3. Interação entre ácido húmico e íons metálicos.....	23
1.4. Determinação da concentração de ácidos húmicos e fúlvicos.....	35
1.5. Referências Bibliográficas	39
CAPÍTULO 2. FLUORESCÊNCIA DE SOLUÇÕES DE ÁCIDO HÚMICO NA PRESENÇA DE ALGUNS ÍONS METÁLICOS.....	47
2.1. Introdução.....	48
2.2. Uso da fluorescência nos estudos da interação do ácido húmico com íons metálicos.....	49
2.3. Parte Experimental	50
2.4. Resultados e Discussões.....	51
2.5. Conclusões	63
2.6. Referências Bibliográficas	67
CAPÍTULO 3. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO QUIMILUMINESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS.....	69
3.1. Introdução.....	70
3.1.1. Quimiluminescência de ácidos húmicos.....	70
3.2. Parte Experimental	73
3.2.1. Reagentes e materiais	73
3.2.2. Procedimento: método analítico empregando-se PMS	77
3.2.3. Procedimento: método analítico empregando-se H ₂ O ₂ / CH ₂ O.....	77
3.3. Resultados e Discussões.....	78

3.3.1. Curvas de calibração.....	81
3.3.2. Influência de alguns ânions e cátions no método PMS	88
3.3.3. Influências do solo de origem e dos procedimentos de extração e purificação na análise de amostras de AH, AF e SH	90
3.3.4. Determinação da concentração de AH em amostra de água natural	96
3.4. Conclusões	96
3.5. Referências Bibliográficas	100
<i>CAPÍTULO 4. EFEITO DA ADIÇÃO DE Co(II) E Mn(II) NA REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE PEROXOMONOSULFATO COM ÁCIDOS HÚMICOS E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....</i>	102
4.1. Introdução.....	103
4.2. Parte Experimental	104
4.3. Resultados e Discussões.....	106
4.3.1. Influência de Co(II) e Mn(II) no método PMS	106
4.3.2. Experimentos com substâncias e ácidos húmicos extraídos de solos diferentes	111
4.3.3. Determinação da concentração de AH em amostra de água natural	113
4.4. Conclusões.....	115
4.5. Referências Bibliográficas	117
<i>CAPÍTULO 5. REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE PEROXOMONOSULFATO COM ALGUNS COMPOSTOS ORGÂNICOS.....</i>	120
5.1. Introdução.....	121
5.2. Parte Experimental	121
5.3. Resultados e Discussões.....	124
5.3.1. Ausência de complexos de Co(II)EDTA	128

5.3.2. Presença de complexos de Co(II)EDTA.....	129
5.4. Conclusões.....	129
5.5. Referências Bibliográficas	131
CAPÍTULO 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	132
6.1. Considerações finais.....	133
6.2. Conclusões finais.....	134
6.3. Referências Bibliográficas	136
SÚMULA CURRICULAR.....	137

CAPÍTULO 1. *INTRODUÇÃO*

1.1. Objetivos

Os ácidos húmicos e fúlvicos exercem papel importante em ambiente aquático, pois possuem alta capacidade complexante, influenciando assim na biodisponibilidade e transporte de espécies orgânicas e inorgânicas, sejam elas tóxicas ou nutrientes.

Assim, o presente trabalho tem por objetivo aprofundar o conhecimento sobre a quantificação de substâncias húmicas e suas interações com alguns oxidantes e íons metálicos, empregando-se as técnicas de quimiluminescência e fluorescência, respectivamente.

Para a quantificação das substâncias húmicas foi proposto um novo método analítico baseado na medida da intensidade de radiação emitida pela reação de oxidação de ácidos húmico, fúlvico e substâncias húmicas com peroxomonossulfato de potássio em meio alcalino. Determinou-se o limite de detecção e o efeito de vários interferentes e da natureza da amostra no resultado analítico. O método foi aplicado em amostra de água de rio.

A fim de aperfeiçoar o método analítico proposto, estudou-se o aumento na emissão da radiação devido à oxidação das substâncias húmicas por peroxomonossulfato catalisado pelos íons metálicos Co(II) e Mn(II).

Também foram realizados testes com alguns compostos orgânicos (principalmente polifenóis), em substituição ao ácido húmico, para tentar avaliar quais grupos químicos da molécula de substância húmica poderiam ser responsáveis pela emissão de radiação.

Adicionalmente, investigou-se a interação de ácido húmico com os íons metálicos Al(III), Ca(II), Fe(III), Pb(II), Cu(II), e Cr(III) utilizando-se a técnica de fluorescência, uma vez que o ácido húmico, quando excitado em 300 nm, apresenta

um máximo de fluorescência em 430 nm, que é suprimido pela ligação com alguns íons metálicos.

A seguir nesta introdução ressaltam-se as propriedades estruturais de ácidos húmico e fúlvico relacionadas à sua interação com íons metálicos. Também apresenta um levantamento bibliográfico com as principais técnicas analíticas utilizadas no estudo dessa interação e vários métodos desenvolvidos para determinação da concentração de ácidos húmico e fúlvico em meio aquoso.

1.2. As substâncias húmicas

As substâncias húmicas (SH) são formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente. Devido à natureza complexa das SH, pouco se sabe sobre sua estrutura química, estas se apresentam como misturas heterogêneas de moléculas polidispersas com elevada massa molar (Aiken *et al.*, 1985; Senesi e Milano, 1994).

As substâncias húmicas estão amplamente distribuídas em águas naturais e solos (Fukushima *et al.*, 1995.). Elas desempenham papel importante no crescimento de plantas bem como em diversos processos ambientais e geoquímicos (Muller-Wegener, 1988), não sendo tóxicas aos seres humanos. Devido à sua alta capacidade complexante, as SH exercem considerável influência na biodisponibilidade e transporte de compostos orgânicos e inorgânicos, sejam eles tóxicos ou nutrientes.

As SH podem ser classificadas de acordo com sua solubilidade em água. O ácido húmico (AH) constitui a fração das substâncias húmicas solúvel em meio

alcalino, que precipita após acidificação. O ácido fúlvico (AF) permanece em solução quando o meio é acidificado e a humina é a fração insolúvel tanto em ácido quanto em álcali diluídos (Stevenson, 1982; Malcom, 1990). Do ácido húmico, fração mais abundante das substâncias húmicas, pode ser extraído o ácido himatomelânico, que é a parte do ácido húmico solúvel em álcool (Rezende, 1999). A solubilidade é relacionada com o peso molecular, que também pode ser usado para diferenciá-los. O AF tem menor massa molecular, variando de 500 a 2000 Daltons, comparado com o AH que tem massa molecular entre 2000 a 5000 Daltons (McGarry e Baker, 2000).

Na figura 1.1 é apresentado um modelo de estrutura para ácido húmico (Schulten e Schnitzer, 1993). Os principais grupos funcionais presentes neste modelo são: estruturas alifáticas e aromáticas, grupos OH fenólicos livres e ligados, estruturas quinonas, nitrogênio ligando unidades estruturais e grupos carboxílicos em diferentes pontos dos anéis.

Na figura 1.2 é apresentado um modelo de estrutura para o ácido fúlvico (Elkins e Nelson, 2002). Os principais grupos funcionais são: carboxilas e dicarboxilas alifáticas e aromáticas, hidroxilas fenólicas e alcoólicas, carbonilas, hidroxiácidos e ácido salicílico.

As substâncias húmicas aquáticas podem ser representadas utilizando-se diferentes modelos conformacionais: de espiral ou de agregados dos tipos micelar e membrana.

A conformação espiral (figura 1.3) pode ser representada como uma fita, com grupos polares e cargas negativas ao longo de sua extensão (Hayes, 1985). Essa estrutura flexível resulta em uma molécula de geometria aproximadamente esférica, com alta densidade de massa no centro e decrescente nas extremidades (Swift, 1989). A dimensão da esfera depende da extensão da fita, densidade de carga,

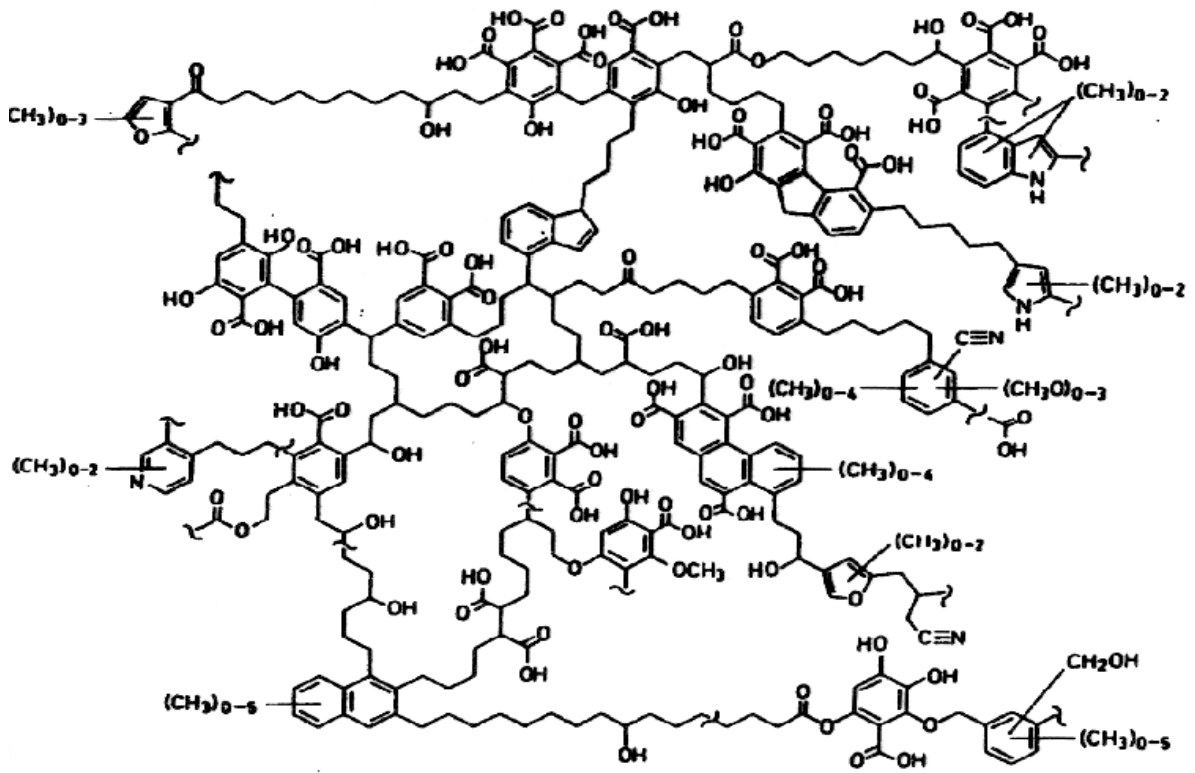


Figura 1.1: Modelo de estrutura de ácido húmico proposta por Schulten e Schnitzer (1993; extraído de Rezende, 1999)

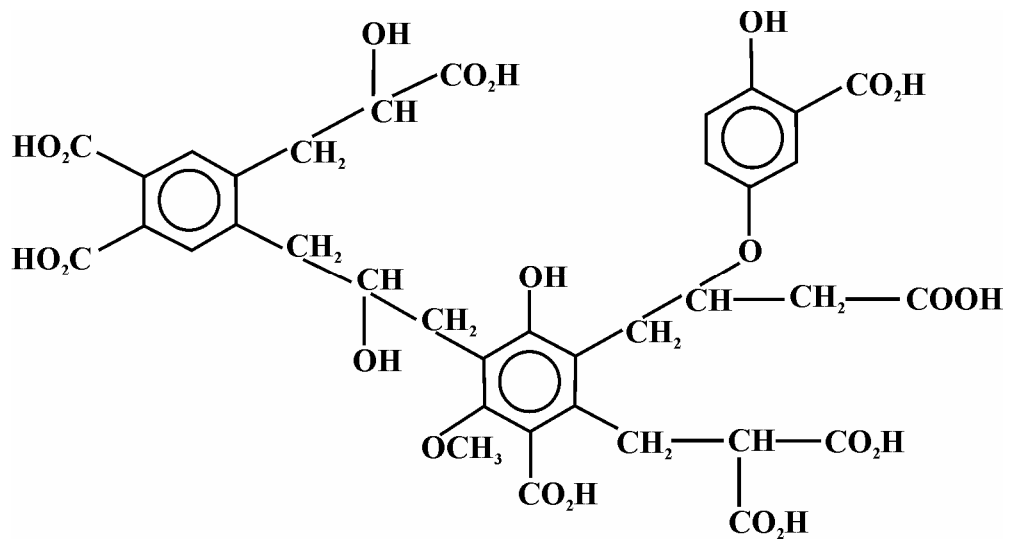


Figura 1.2: Modelo de estrutura de ácido fúlvico proposta por Elkins e Nelson (2002).

solvatação, ionização dos grupos ácidos, concentração de sais na solução, extensões das ramificações e ligações cruzadas (Hayes, 1985; Gosh e Schnitzer, 1980).

Utilizando-se o modelo da figura 1.3 pode-se explicar as irregularidades de estrutura química e as ligações intramoleculares e cruzadas (Rocha e Rosa, 2003). Na estrutura das SH há a predominância de cargas negativas, em razão da ionização de grupos ácidos, que variam de acordo com o pH do meio. Devido à repulsão das cargas negativas, a energia eletrostática da molécula é minimizada quando está na forma expandida (Schnitzer e Khan, 1978). As cargas negativas da macromolécula são balanceadas por um número igual de possíveis cargas positivas (cátions), evitando a expansão da molécula. Em razão do efeito das cargas, podem ocorrer interações intra e intermoleculares.

A intensidade das forças de repulsão de uma molécula de substância húmica e a distância entre as moléculas dependem de vários fatores como intensidade de cargas, tamanho, solvatação, pH e força iônica da solução.

O processo de hidratação pode influenciar na estabilidade do complexo SH-íon metálico devido ao seu efeito no valor da constante dielétrica dos sítios complexantes vizinhos (Rocha e Rosa, 2003; Scheraga, 1979).

Em solução com concentração alta de eletrólito ou pH menor do que 2, a quantidade de cargas negativas na molécula de substância húmica aumenta, possibilitando a aproximação mais forte das macromoléculas, o que resulta na formação da estrutura condensada ou esférica (Gosh e Schnitzer, 1980).

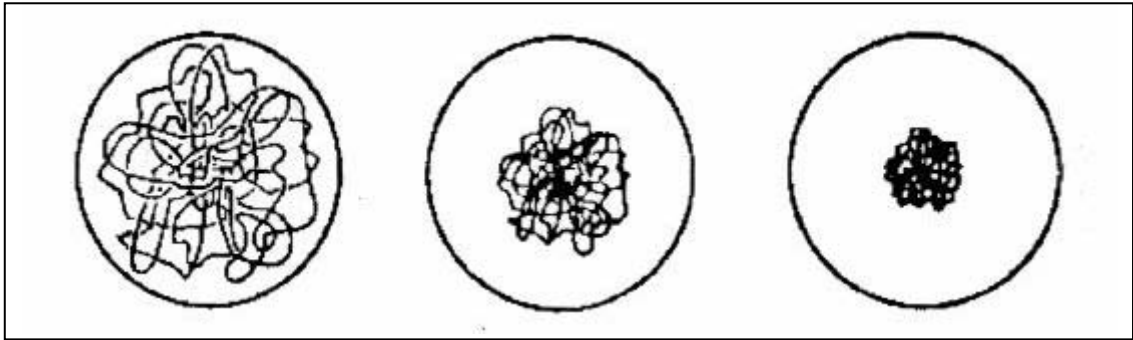


Figura 1.3: Diagrama representativo da condensação da estrutura espiral ao acaso (Swift, 1989; adaptado de Rocha e Rosa, 2003).

Estudos de espalhamento de raios-X e medições de tensão superficial em função da concentração têm mostrado que os ácidos húmico e fúlvico também formam agregados em solução (Wershaw,1992).

De acordo com o modelo de Wershaw (1993), as reações de decomposição que produzem os ácidos húmicos consistem principalmente de reações de despolimerização enzimática e oxidações enzimáticas. Estas reações dão origem a moléculas anfifílicas, que são estabilizadas em solos e sedimentos quando incorporadas na estrutura de membrana que cobre grãos minerais (figura 1.4) ou pela incorporação em micelas dispersas em solução (figura 1.5).

Nestes agregados, a parte hidrofóbica das moléculas está no interior e as partes hidrofílicas das moléculas constituem a superfície exterior. Espécies iônicas interagem com a superfície hidrofílica das micelas ou membranas húmicas, enquanto espécies hidrofóbicas se particionam nos interiores hidrofóbicos de membranas e micelas húmicas.

1.3. Interação entre ácido húmico e íons metálicos

Uma propriedade importante das substâncias húmicas é sua capacidade de formar complexos com íons metálicos em ambientes aquáticos (Saar e Weber, 1982).

Os estudos da interação de ácidos húmicos com íons metálicos são importantes porque determinam a disponibilidade de íons metálicos tóxicos. Alguns íons metálicos têm sua toxicidade diminuída em ambientes aquáticos quando complexados com ácidos húmicos, como por exemplo, Cu(II) e Cd(II). Além disso, a

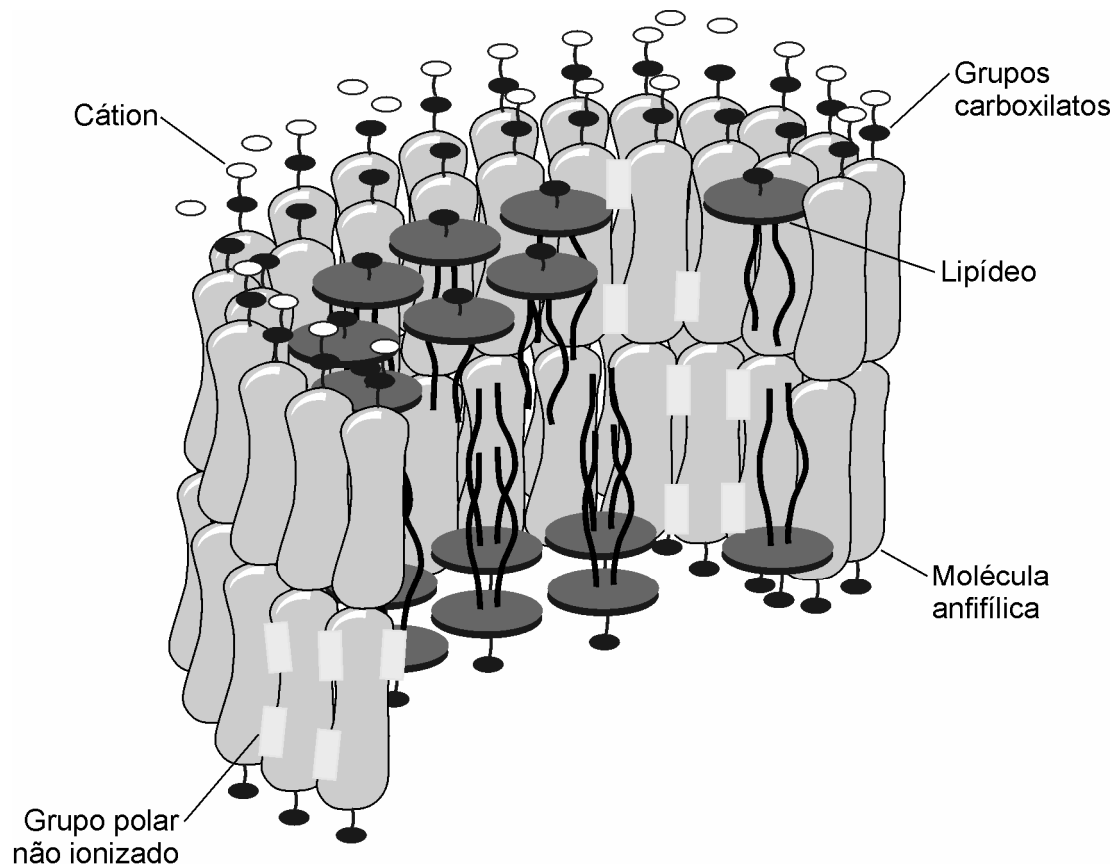


Figura 1.4: Modelo conformacional do tipo membrana de substâncias húmicas (Wershaw, 1993).



Figura 1.5: Modelo conformacional do tipo micela de substâncias húmicas. Porção externa da molécula (em preto) é polar enquanto a interna é apolar (Northeastern University, Humic Acid Research Group, 2007).

complexação com ácido húmico pode alterar a mobilidade dos íons metálicos em ambientes naturais (Saar e Weber, 1982).

Os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre - doadores de elétrons- presentes no ácido húmico são os principais responsáveis pela coordenação com íons metálicos. O ácido húmico contém cerca de 35 % de oxigênio, o qual encontra-se predominantemente na forma de grupos carboxílicos e fenólicos. Os átomos de nitrogênio e enxofre ocorrem em quantidades relativamente baixas (1 a 2%) e estão distribuídas em grupos peptídicos, sulfônicos e tióis (Rocha e Rosa, 2003). Os complexos que possuem ligantes bi ou multidentados são termodinamicamente mais estáveis, mas é provável que os complexos de SH ocorram preferencialmente na proporção 1:1 (Rocha e Rosa, 2003).

A acidez do meio é importante na interação do ácido húmico com íons metálicos, pois determina qual a conformação estrutural do ácido húmico e a forma do íon metálico presentes em solução. As várias formas destas espécies têm tendências diferentes de formação de complexos. Além disso, os íons H^+ competem com os íons metálicos para ligação em sítios aniônicos do ácido húmico, e íons OH^- competem com o ácido húmico para a ligação com os íons metálicos (Buffle, 1990).

Outro fator que influencia a complexação do ácido húmico com íons metálicos é a força iônica do meio; com o aumento da força iônica da solução, a ligação dos íons metálicos com o ácido húmico diminui.

Os cátions monovalentes como Na^+ e K^+ podem formar ligações eletrostáticas fracas com um único grupo aniônico do ácido húmico. Já os íons metálicos bivalentes podem se complexar a dois sítios aniônicos adjacentes, formando um anel quelato, uma associação que é muito mais forte do que aquela formada pela complexação com um único sítio (Saar e Weber, 1982).

As propriedades de ligação dos íons metálicos com a matéria orgânica em ambientes naturais foram estudadas por diversas técnicas analíticas (tabela 1.1), entre as quais, pode-se destacar: fluorimetria, voltametria de redissolução anódica, potenciometria com eletrodo íon-seletivo, absorção atômica com atomização por chama ou eletrotérmica e espectrometria de emissão por plasma indutivamente acoplado.

Na maioria destes trabalhos foram determinadas as quantidades de íons metálicos livres ou de íons metálicos total em solução (Ryan e Weber, 1982a). Em alguns casos, técnicas de separação como troca iônica, ultrafiltração e cromatografia líquida foram acopladas.

As concentrações de ligante ou de íons metálicos livres associados à concentração de íons metálicos total podem ser utilizadas na determinação da capacidade complexante, definida como a quantidade máxima de íons metálicos que se coordenam às substâncias húmicas em solução aquosa.

Técnicas analíticas como voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial, potenciometria com eletrodo íon-seletivo e absorção atômica (associado à separação por diálise) permitiram a detecção de concentrações muito baixas de íons metálicos livres. Entretanto essas técnicas apresentam limitações já que os íons metálicos podem ser removidos por complexação com espécies inorgânicas ou por adsorção em particulado coloidal presente inicialmente na amostra. Ainda assim as técnicas eletroquímicas vêm sendo amplamente utilizadas devido ao seu baixo custo, rapidez e alta sensibilidade.

Já a fluorimetria pode ser utilizada na determinação da concentração de alguns ligantes orgânicos, como as substâncias húmicas aquáticas. A fluorimetria é vantajosa no estudo da interação SH – íons metálicos, pois apresenta um limite de

detecção pequeno para a determinação de matéria orgânica natural, é rápida e não necessita de eletrólito suporte (Saar e Weber, 1982).

A separação de íon metálico livre de complexado pode ser realizada por cromatografia ou utilizando-se membranas que excluem os complexos SH-íon metálico.

A ultrafiltração e a diálise são técnicas versáteis que não necessitam de agentes complexantes ou eletrólitos suporte e acima de tudo, não produzem alteração no equilíbrio químico SH-íon metálico (Truitt e Weber, 1981 a). Entretanto, nenhuma membrana tem poro pequeno o suficiente para separar completamente complexos SH-íons metálicos dos íons metálicos adsorvidos em particulado coloidal (Saar e Weber, 1982). Além disso, requerem muito tempo e grande quantidade de SH (Saar e Weber, 1979) e pode ocorrer adsorção de íon metálico na membrana.

Tanto a espectrometria de emissão por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) como a espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) são técnicas importantes para análise elementar devido aos seus limites de detecção baixos para a maioria dos elementos, seu grau alto de seletividade e à precisão e exatidão boas. Ambas as técnicas vêm sendo utilizadas na determinação da concentração de íons metálicos na presença de SH. Entretanto, isoladamente não permitem a determinação da capacidade complexante de SH com íons metálicos.

A técnica de ressonância paramagnética pode ser utilizada como uma ferramenta em estudos de sítios de complexação de SH com íons metálicos paramagnéticos.

São apresentados a seguir, no capítulo 2 estudos que realizamos, empregando-se a técnica de fluorimetria para determinar a capacidade complexante

de ácidos húmicos com íons metálicos bivalentes (Cu(II), Pb(II) e Ca(II)) e trivalentes (Cr(III), Al(III) e Fe(III)), na faixa de concentração de 10^{-6} a 10^{-3} mol L⁻¹. A intensidade de fluorescência emitida dependerá da concentração do AH e da sua coordenação com os íons metálicos, independentemente da concentração de íons metálicos livres ou coordenados.

Tabela 1.1: Técnicas analíticas utilizadas para o estudo da interação de substância húmica com íons metálicos.

Técnica analítica	Dependência do sinal analítico	Referências	Observações
Fluorimetria	Concentração do ligante	Saar e Weber, 1980 a	Efeito da adição de Cu(II), Pb(II), Cd(II), Mn(II), Co(II) e Ni(II) na intensidade de fluorescência de AF
		Seitz, 1981	Métodos fluorescentes para o estudo da especiação de metais pesados em águas naturais.
		Ryan e Weber, 1982 a	Determinação da capacidade complexante e constante de estabilidade de AF-Cu(II)
		Ryan e Weber, 1982 b	Determinação da capacidade complexante de substâncias húmicas em águas naturais com Cu(II)
		Ryan <i>et al.</i> , 1983	Determinação da capacidade complexante de ácido fúlvico em águas naturais com Mn(II), Co(II) e Cu(II)
		Waite e Morel, 1984	Estudo da cinética de reação do ácido fúlvico com Fe(II) e Fe(III)
		Fish e Morel, 1985	Estudo da propagação de erro na titulação de AF com Cu(II)

Tabela 1.1: Continuação.

Técnica analítica	Dependência do sinal analítico	Referências	Observações
Fluorimetria	Concentração do ligante	Frimmel, 1992	Determinação da capacidade complexante de substâncias húmicas aquáticas
		Luster <i>et al.</i> , 1996	Determinação da capacidade complexante de AF-Cu(II) e AF-Al(III)
		Elkins e Nelson, 2002	Determinação da constante de estabilidade condicional AF-Al(III)
		Presente trabalho	Determinação das constantes de estabilidade condicionais e capacidade complexante de AH com Cu(II), Cr(III) e Pb(II)
Voltametria de redissolução anódica	Concentração do íon metálico livre	Frimmel e Abbt-Braun, 1991	Determinação da capacidade complexante de substâncias húmicas aquáticas
		Bhat <i>et al.</i> , 1981	Determinação da capacidade complexante de AF derivado de solo com Cu(II). Comparação com eletrodo íon-seletivo
		Abate e Masini, 2002	Estudo da interação AH-Cd (II) e AH-Pb (II)

Tabela 1.1: Continuação.

Técnica analítica	Dependência do sinal analítico	Referências	Observações
Potenciometria (eletrodo íon-seletivo)	Concentração do íon metálico livre	Bresnahan e Weber, 1978	Determinação da constante de estabilidade de complexos AF-Cu(II). Comparação com as técnicas de polarografia de pulso diferencial.
		Saar e Weber, 1979	Determinação da constante de estabilidade condicional de complexos AF-Cd (II)
		Saar e Weber, 1980 b	Determinação da constante de estabilidade condicional e solubilidade de complexos AF-Pb (II)
		Burba <i>et.al.</i> , 1994	Determinação da capacidade complexante de SH-Cu(II).
Potenciometria (eletrodo amalgama)	Concentração do íon metálico livre	Abate e Masini, 1999 e 2001	Determinação da capacidade complexante e constante de estabilidade condicional dos complexos AH-Pb(II); AH-Cd(II), AH-Zn(II) e AH-Cu(II)
Polarografia de pulso diferencial	Concentração do íon metálico livre	Frimmel e Geywitz, 1983	Determinação da capacidade complexante dos complexos SH-Cu(II); SH-Fe(III) e SH-Hg(II)

Tabela 1.1: Continuação.

Técnica analítica	Dependência do sinal analítico	Referências	Observações
Ultrafiltração/ Voltametria de redissolução anódica	Concentração do íon metálico livre e total	Smith, 1976	Determinação da capacidade complexante do Cu(II) com frações de diferentes massas moleculares de matéria orgânica.
Diálise	Concentração do íon metálico total e livre	Truitt e Weber, 1981 a	Determinação da capacidade complexante de AF derivado de solo com Cu(II) e Cd(II).
		Truitt e Weber, 1981 b	Determinação da capacidade complexante de SH aquáticas de diferentes amostras naturais.
AAS – chama e AAS – eletrotérmica	Concentração do íon metálico total	Burba, 1994	Estudo da labilidade/ inércia de metais complexados a SH em ambientes aquáticos
		Burba <i>et al.</i> , 1994	Estudos da labilidade/ inércia de complexos de SH com os íons metálicos: Cd(II), Mn(II), Zn(II), Pb(II), Co(II), Ni(II) e Cu(II)
AAS – eletrotérmica e Voltametria anódica de pulso diferencial		Donat <i>et al.</i> , 1994	Determinação da capacidade complexante de SH-Ni e SH-Cu. Especificação de Cu e Ni.

Tabela 1.1: Continuação.

Técnica analítica	Dependência do sinal analítico	Referências	Observações
ICP-OES	Concentração do íon metálico total	Rocha, 2000	Determinação de metais alcalinos, alcalinos terrosos e pesados em amostras de SH aquáticas.
ICP-MS	Concentração do íon metálico total	Shkinev <i>et. al</i> , 1996	Especiação de metais associados com diferentes frações da matéria orgânica dissolvida em águas naturais
ICP-MS	Concentração do íon metálico total	Vogl e Heumann, 1997	Determinação de complexos de SH com: Ag, Cd, Cu, Mo, Ni, Pb, Ti, U, W, Zn e Zr separados por HPLC.
Ressonância eletrônica paramagnética	Espécies paramagnéticas	Bresnahan e Weber, 1978	Determinação do número de classes de sítios de complexação AF-Cu(II).
		Templeton e Chasteen, 1980	Determinação da distância entre os sítios de complexação e a constante de estabilidade condicional para complexos AF-V(IV).

1.4. Determinação da concentração de ácidos húmicos e fúlvicos

A concentração de substâncias húmicas em ambientes aquáticos naturais é muito baixa (concentração média de 10 mg L⁻¹; Reuter e Perdue, 1977). Desta forma, poucas técnicas analíticas possuem sensibilidade suficiente para a determinação de sua concentração (Klavins *et al.*, 1999). Na tabela 1.2 estão relacionadas as principais técnicas analíticas utilizadas na determinação da concentração de ácido húmico e fúlvico, entre as quais pode-se destacar: espectrofotometria, quimiluminescência e fluorimetria.

O método padrão para a determinação de substâncias húmicas aquáticas (Standard Method, 1998) baseia-se na pré-concentração em uma coluna cromatográfica com resina XAD ou dietilaminoetil (DEAE) celulose, seguida da dessorção com dodecil sulfato de sódio (SDS). Para a quantificação recomenda-se a utilização de um analisador de carbono orgânico (Standard Method, 1998). Entretanto a presença de qualquer material orgânico não-húmico na amostra irá interferir na quantificação das SHA.

Métodos analíticos para a determinação da concentração de ácidos húmicos baseados na absorção em 430 nm e fluorescência têm sido os mais amplamente utilizados (tabela 1.2). Todavia estas técnicas analíticas não são precisas nem pela análise direta nem pelo uso de padrões de AH de procedências diferentes porque suas absorvidades molares podem diferir em até 270% (Marino e Ingle Jr., 1981 e Schnitzer e Khan, 1978).

Um outro método bastante sensível para a determinação de SH é o imunensaio utilizando o teste de ELISA, que segundo Ulrich *et al.* (1993) é mais rápido e econômico do que os métodos espectrofotométricos e fluorimétricos.

A comparação visual com padrões de diferentes concentrações conhecidas de SH é um modo fácil de estimar a concentração de SH em águas naturais. Entretanto, esta técnica é bastante imprecisa, pois vários fatores podem produzir alteração na coloração de uma solução de SH, como sua massa molecular e forma de agregação, pH e a presença de íons ferro, manganês, alumínio e nitrato. (Wang *et al.* 1990; Carpenter e Smith, 1984; Pennanen e Frisk, 1984; Heikkinen, 1990 e McDonald, *et al.*, 2004).

Os métodos quimiluminescentes geralmente apresentam limites baixos de detecção e rapidez de análise. Além disso, alguns autores mostraram valores praticamente idênticos obtidos através da curva analítica e o método de adição de padrão, utilizando a técnica quimiluminescente (Marino e Ingle Jr., 1981; Kitano *et al.*, 1994; Michalowski *et al.*, 2001).

Um novo método baseado na reação quimiluminescente de PMS com SH foi desenvolvido (Magdaleno e Coichev, 2005) e os resultados obtidos estão descritos no capítulo 3. Este método apresentou boa sensibilidade com limite de detecção de 0,24 mg L⁻¹. Verificou-se que a sensibilidade do método depende dos tipos de solos dos quais foram extraídas as substâncias húmicas, bem como dos processos de extração e purificação.

Tabela 1.2: Técnicas analíticas utilizadas na determinação da concentração de ácidos húmicos e fúlvicos.

Técnica analítica	Referência	Tipo de amostra	Limite de detecção	Observações
Quimiluminescência	Marino e Ingle Jr., 1981	Água de rio	0,7 mg L ⁻¹	Oxidante: MnO ₄ ⁻
	Kitano <i>et al.</i> , 1994	Água de rio, lago e efluente tratado	0,050 mg L ⁻¹	Oxidante: H ₂ O ₂ + CH ₂ O
	Michalowski <i>et al.</i> , 2001	Água de rio	0,012 mg L ⁻¹	Oxidante: N-bromosuccinamida
	Magdaleno e Coichev, 2005	Água de rio	0,24 mg L ⁻¹	Oxidante: HSO ₅ ⁻
	Tian <i>et al.</i> , 2005	Água de rio	0,5 µg. L ⁻¹	Oxidante: 1,3-dibromo-5,5-dimetilhydantion
Espectrofotometria	Carpenter e Smith, 1984	Águas naturais	0,01 mg L ⁻¹	Quantificação de AH e Fe(III)
	Ohzeki <i>et al.</i> , 1991	Águas naturais	1,3 µg/ injeção	Quantificação de AH e Fe(III) em estado sólido
	Sorouradin <i>et al.</i> , 1993	Águas naturais	1,1 mg L ⁻¹	Pré-concentração de AH em resinas XAD ou DEAD celulose
	Hiraide <i>et al.</i> , 1994	Água de rio	–	Separação de AH dissolvido e particulado
	Wuilloud <i>et al.</i> , 2003	Água de rio	1,0 mg L ⁻¹	Pré-concentração/ extração de AH e AF por ponto nuvem
Fluorimetria	Brun e Milburn, 1977	Águas de rio e estuário	0,5 mg L ⁻¹	Quantificação de AH
	Susic e Boto, 1989	Águas de rio, mar e solo	15 ng	Separação por HPLC. Quantificação de AH
	Tatar <i>et al.</i> , 2002	Água de caverna	0,6 mg L ⁻¹	Separação por HPLC. Quantificação de AF

Tabela 1.2: Continuação

Espectrofotometria e Fluorimetria	Hautala <i>et al.</i> , 2000	Águas naturais	1,0 mg L ⁻¹	Quantificação de AH e AF
	Hutta e Gora, 2003	Solo, turfa e particulado do ar	3,3 mg L ⁻¹	Separação por HPLC. AH padrão extraído de solo
Reflectância difusa acoplada com Espectroscopia no Infravermelho	Tremblay e Gagné, 2002	Sedimento seco de SH	Não reportado	Análise na frequência de 2930 cm ⁻¹
Imunoensaio	Ulrich <i>et al.</i> , 1993	Águas naturais	0,5 µg L ⁻¹	Quantificação de AH
Comparação visual de cor	Cuthbert e Giogio, 1992	Águas naturais	–	Método Hazen
Analisador de carbono orgânico	Standard Method, 1998	–	–	Pré-concentração de AH em resinas XAD ou DEAD celulose

1.5. Referências Bibliográficas

- ABATE, G. e MASINI, J.C.**, *Utilização de eletrodos potenciométricos de amálgama em estudos de complexação de substâncias húmicas*, Química Nova 22 (5), 1999.
- ABATE, G. e MASINI, J.C.**, *Acid-basic and complexation properties of a sedimentary humic acid. A study on the Barra Bonita Reservoir of Tietê River, Sao Paulo State, Brazil*, Journal of Brazilian Chemical Society 12 (1), 109-116, 2001.
- ABATE, G. e MASINI, J.C.**, *Complexation of Cd(II) and Pb(II) with humic acids studied by anodic stripping voltammetry using differential equilibrium functions and discrete site models*, Organic Geochemistry 33 (10), 1171-1182, 2002.
- AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, M.D.; WERSHAW, R.L. e MACCARTHY, P.**, *Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, isolation and characterization*; John Wiley e Sons; New York; p. 363-385, 1985.
- BHAT, G.A.; SAAR, R.B.; SMART, R.B. e WEBER, J.H.**, *Titration of soil-derived fulvic acid by copper (II) and measurement of free copper (II) by anodic stripping voltammetry and copper (II) selective electrode*. Analytical Chemistry 53 (14), 2275-2280, 1981.
- BRESNAHAN, W.T. e WEBER, J.H.**, *Stability constants for the complexation of copper (II) ions with water and soil fulvic acid measured by an ion selective electrode*. Analytical Chemistry 50 (12), 1675-1679, 1978.
- BRUN, G.L e MILBURN, D.L.D.**, *Automated fluorimetric determination of humic substances in natural water*. Analytical Letters 10 (14), 1209-1219, 1977.
- BUFFLE, J.**, *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*. New York: Ellis Horwood, p. 692, 1990.
- BURBA, P.**, *Labile/ inert species in aquatic humic substances; an ion-exchange study*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 348 (4), 301-311, 1994.

BURBA, P.; ROCHA, J.C. e KLOCKOW, D., *Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances investigations by means of ion exchange-based flow procedure*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 349 (12), 800-807, 1994.

CARPENTER, P.D. e SMITH, J.D., *Simultaneous spectrophotometric determination of humic acid and iron in water*, Analytica Chimica Acta 159, 299-308, 1984.

CUTHBERT, I.D. e GIORGIO, P., *Toward a standard method of measuring color in freshwater*. Limnology and Oceanography 37(6), 1319-1326, 1992.

DONAT, J.R.; LAO, K.A. E BRULAND, K.W., *Speciation of dissolved copper and nickel in South San Francisco Bay: a multi- method approach*. Analytica Chimica Acta 284, 547-571, 1994.

ELKINS, K.M. e NELSON, D.J., *Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with humic substances*. Coordination Chemistry Reviews 228, 205-225, 2002

FISH, W. e MOREL, F.M.M., *Propagation of error in fulvic acid titration data: a comparison of three analytical methods*. Canadian Journal of Chemistry 63, 1185-93, 1985.

FRIMMEL, F.H., *Investigations of metal complexation by polarography and fluorescence spectroscopy*, In: MATTHESS, G. et al. (Ed.). Progress in hydro geochemistry. Berlin: Springer- Verlag, p. 61-65, 1992.

FRIMMEL, F.H. e ABBT-BRAUN, G., *Comparison of aquatic humic substances of different origin*, In: ALLARD, A., BOREN, H., GRIMVALL, A. (Ed.). Humic substances in the aquatic and terrestrial environment. Berlin: Springer, p.35-46, 1991.

FRIMMEL, F.H. e GEYWITZ, J., *On the coordination between metals and aquatic humic materials*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 316 (6), 582-588, 1983.

FUKUSHIMA, M.; NAKAYASU, K.; TANAKA, S. e NAKANURA, H., *Chromium (III) binding abilities of humic acids*. Analytical Chimica Acta 317, 195-206, 1995.

- GOSH, K. e SCHNITZER, M.**, *Macromolecular structure of humic substances*, Soil Science 129, 266-276, 1980.
- HAUTALA, K.; PEURAVUORI, J. e PIHLAJA, K.**, *Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyse*. Water Research 34 (1), 246-258, 2000.
- HAYES, M.H.B.**, *Extraction of humic substances from soil*. IN: Aiken, G. R. et al. (Eds.) *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization*. New York: John Wiley e Sons, p. 330-334, 1985.
- HEIKKINEN, K.**, *Nature of dissolved organic matter in the drainage basin of a boreal humic acid river in northern Finland*. Journal of Environmental Quality 19, 649-657, 1990.
- HIRAIDE, M.; SHIMA, T. e KAWAGUCHI, H.**, *Separation and determination of dissolved and particulate humic substances in river water*. Mikrochemica Acta 113, 269-276, 1994.
- HUTTA, M. e GORA, R.**, *Novel stepwise gradient reversed-phase liquid chromatography separations of humic substances, air particulate humic-like substances and lignins*. Journal of Chromatography A 1012, 67-79, 2003.
- KITANO, M.; OGASAWARA, Y.; XINCHENG, H.; TAKENAKA, N.; BANDOW, H. e MAEDA, Y.**, *Continuous determination of trace amounts of humic acid in natural waters by chemiluminescent method*. Microchemical Journal 49, 265-274, 1994.
- KLAVINS, M.; EGLITE, L. e SERZANE, J.**, *Methods for analysis of aquatic humic substances*. Critical Reviews in Analytical Chemistry 29(3), 187-193, 1999.
- LUSTER, J.; LLOYD, T.; SPOSITO, G. e FRY, I.V.**, *Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper (II) and aluminum (III) complexation by dissolved organic matter*. Environmental Science & Technology 30, 1565-1574, 1996.

MAGDALENO, G.B. e COICHEV, N., *Chemiluminescent determination of humic substances based on the oxidation by peroxymonosulfate*. *Analytical Chimica Acta* 552, 141-146, 2005.

MALCOM, R.L., *The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments*. *Analytical Chimica Acta* 232, 19-30, 1990.

MARINO, D.F. e INGLE JR., J.D., *Determination of humic acid by chemiluminescence*. *Analytica Chimica Acta* 124, 23-30, 1981.

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

MCGARRY, S.F. e BAKER, A., *Organic Acid Fluorescence: Applications to Speleotem Paleoenvironmental Reconstruction*. *Quaternary Science Reviews*, 1087-1101, 2000.

MICHALOWSKI, J.; HALABURDA, P. e KOJLO, A., *Determination of humic acid in natural waters by flow injection analysis with chemiluminescent detection*. *Analytica Chimica Acta* 438, 143-148, 2001.

MULLER-WEGENER, U., in *Humic Substances and Their Role in the Environment*, ed. F. H. Frimmel and R. F. Christman, John Wiley and Sons, New York, p. 179, 1988.

Northeastern University - Humic Acid Research Group. Disponível em www.hagroup.neu.edu, acessado em 13/06/2007.

OHZEKI, K.; TATEHANA, M.; NUKATSUKA, I. e ISHIDA, R., *Determination of humic-acid and iron(III) by solid-state spectrophotometry to study their interactions*. *The Analyst* 116 (2), 199-205, 1991.

PENNANEN, V. e FRISK, T., *A statistical model for conversion of absorbance measurements with significant iron interference into organic carbon in a polyhumic lake*. *Aqua Fennica* 14, 171-178, 1984.

- REUTER, H. e PERDUE, E.M.**, *Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41 (2), 325-334, 1977.
- REZENDE, M.O.O.**, *A importância ambiental das substâncias húmicas*. Livredocência, Instituto de Química - São Carlos, 1999.
- ROCHA, J.C.**, *Aquatic humus from an unpolluted Brazilian dark-brown stream: general characterization and size fractionation on bound heavy metals*. *Journal of Environmental Monitoring* 2, 39-44, 2000.
- ROCHA, J.C. e ROSA, A.H.**, *Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas*, São Paulo: Editora Unesp, p. 67-77, 2003.
- RYAN, D.K.; THOMPSON, C.P. e WEBER, J.H.**, *Comparison of Mn^{2+} , Co^{2+} , and Cu^{2+} binding to fulvic acid as measured by fluorescence quenching*. *Canadian Journal of Chemistry* 61(7), 1505-1509, 1983.
- RYAN, D.K. e WEBER, J.H.**, *Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid*. *Analytical chemistry* 54, 986-990, 1982 a.
- RYAN, D.K. e WEBER, J.H.**, *Copper (II) complexing capacities of natural waters by fluorescence quenching*. *Environmental Science & Technology* 16, 866-872, 1982 b.
- SAAR, R.A. e WEBER, J.H.**, *Complexation of Cadmium (II) with water and soil-derived fulvic acids: effect of pH and fulvic acid concentration*. *Canadian Journal of Chemistry* 57 (11), 1979.
- SAAR, R.A. e WEBER, J.H.**, *Comparison of spectrofluorometry and ion-selective electrode potentiometry for determination of complexes between fulvic acid and heavy-metal ions*. *Analytical Chemistry* 52, 2095-2100, 1980 a.
- SAAR, R.A. e WEBER, J.H.**, *Lead (II)-fulvic acid complexes. Conditional stability constants, solubility, and implications for lead (II) mobility*. *Environmental Science & Technology* 14 (7), 877-880, 1980 b.

SAAR, R.A. e WEBER, J.H., *Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry*. Environmental Science & Technology 16 (9), 1982.

SCHERAGA, H.A., *Interactions in aqueous solution*. Accounts on Chemical Research 12, 7-14, 1979.

SCHNITZER, M. e KHAN, S.U., *Soil organic matter*. Amsterdam: Elsevier, p. 319, 1978.

SCHULTEN, H.R. e SCHNITZER, M.; *A state-of-the-art structural concept for humic substances*. Nature 80 (1), 29-30, 1993.

SEITZ, W.R., *Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water*. Trends in Analytical Chemistry 1 (4), 79- 83, 1981.

SENESI, N. e MILANO, T.M.; *Humic substances in the global environment and applications on human health*. Elsevier; Amsterdam; p. 1368, 1994.

SHKINEV, V.M.; FEDOROVA, O.M.; SPIVAKOV, B.Y.; MATTUSCH, J. WENNRICH, R. e LOHSE, M., *Speciation of metals associated with natural water components by on line membrane fractionation combined with ICP-MS*. Analytica Chimica Acta 327, 167-174,1996.

WUILLOUD, J.C.A.; WUILLOUD, R.G.; SADI, B.B.M. e CARUSO J.A., *Trace humic acid determination in natural water by cloud point extraction/ preconcentration using non-ionic and cationic surfactants with FI-UV detection*. The Analyst 128, 453–458, 2003.

SMITH, R.G., *Evaluation of combined applications of ultra filtration and complexation capacity techniques to natural waters*. Analytical Chemistry 48 (1), 74-76, 1976.

SOROURADIN, M.H.; HIRAIDE, M. e KAWAGUCHI, H., *Spectrophotometric determination of humic substances in water by sorption on XAD-2 resin followed by desorption with sodium dodecyl sulfate*. Analytical Science 9, 863-865, 1993.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 5510 – *Aquatic Humic Substances*. Mary Ann H. Franson (Ed.).

Washington, DC: American Public Health Association, p. 5-31 a 5-34, 1998.

STEVENSON, F.J., *Humus chemistry, genesis, composition, reactions*; John Willey e Sons. New York, 1982.

SUSIC, M. e BOTO, K.G., *High-performance liquid chromatographic determination of humic acid in environmental samples at the nanogram level using fluorescence detection*. *Journal of Chromatography* 482, 175-187, 1989.

SWIFT, R.S., *Molecular weight, size, shape and charge characteristics of humic substances: some basic considerations*. IN: Hayes, M.H.B. et al. (Eds) *Humic Substances II*. New York: John Wiley e Sons, p.450-465, 1989.

TATAR, E.; CSINTALAN, E.; MIHUCZ, V.G.; TOMPA, K.; POPPL, L. e ZARAY, G., *Determination of fulvic acids in water samples of Hungarian caverns*. *Microchemical Journal* 73, 11–18, 2002.

TEMPLETON, G.D. e CHASTEEN, N.D., *Vanadium-fulvic acid chemistry-conformational and binding studies by electron-spin probe techniques*. *Geochimica et cosmochimica acta* 44, 741-52, 1980.

TIAN, Y.H.; SONG, Q.J. e HUA, Z.Z., *Flow injection determination of humic acid with chemiluminescence detection*. *Analytical Letters* 38 (14), 2439-2447, 2005.

TREMBLAY, L. e GAGNE, J.P., *Fast quantification of humic substances and organic matter by direct analysis of sediments using DRIFT Spectroscopy*. *Analytical Chemistry* 74, 2985-2993, 2002.

TRULT, R.E. e WEBER, J.H., *Determination of complexing capacity of fulvic acid for copper (II) and cadmium (II) by dialysis titration*. *Analytical Chemistry* 53 (2), 337-342, 1981a.

TRUILT, R.E. e WEBER, J.H., *Copper(II)- and cadmium(II)-binding abilities of some New Hampshire freshwaters determined by dialysis titration*. Environmental Science & Technology 15 (10), 1204-1208, 1981b.

ULRICH, P.; WELLER, M.G.; KNOPP, D. e NIESSNER, R., *Enzyme-linked immunosorbent assay for humic acids*. Analytical Science 9, 795-797, 1993.

VOGL, J. e HEUMANN, K.G., *Determination of heavy metal complexes with humic substances by HPLC/ ICP-MS coupling using on-line isotope dilution technique*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 359, 438-441, 1997.

WAITE, T.D. e MOREL, F.M.M., *Ligand exchange and fluorescence quenching studies of the fulvic acid- iron interaction. Effects of pH and light*. Analytica Chimica Acta 162, 263-274, 1984.

WANG , Z.D.; PANT, B.C. e LANGFORD, C.H., *Spectroscopic and structural characterization of Laurentian fulvic acid. Notes of the origin of the colour*. Analytica Chimica Acta 232, 43-49, 1990.

WERSHAW, R.L., *Membrane-micelle model for humus in soils and sediments and its relation to humification*. US geological Survey; Denver, open-file report 91-513, 1992.

WERSHAW, R.L., *Model for humus in soils and sediments*; Environmental Science & technology 27 (5), 814-816, 1993.

**CAPÍTULO 2. FLUORESCÊNCIA DE SOLUÇÕES DE ÁCIDO HÚMICO
NA PRESENÇA DE ALGUNS ÍONS METÁLICOS**

2.1. Introdução

Na fluorescência as moléculas do analito são excitadas pela absorção de fótons os quais são emitidos com perda de energia (em comprimento de onda maior do que aquele utilizado para a excitação). As transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência não envolvem mudança de spin eletrônico, apresentando assim tempo de vida curto ($<10^{-5}$ s). (Skoog *et al.*, 2002)

A fluorescência mais intensa é encontrada em compostos contendo grupos funcionais aromáticos com níveis de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de baixa energia. Compostos contendo estruturas alifáticas, alicíclicas carbonílicas, ligações duplas altamente conjugadas ou estruturas com anéis condensados e anéis condensados a núcleos heterocíclicos também podem apresentar fluorescência. (Skoog *et al.*, 2002)

A fluorescência em águas naturais é predominantemente gerada por ácidos orgânicos (húmico e fúlvico) e por aminoácidos que compõem proteínas, as quais são provenientes, principalmente da decomposição de plantas sobre o solo (Senesi *et al.*, 1991), embora a proteína fluorescente possa ser de origem vegetal ou animal. (Burstein e Emelyanenko, 1996)

Os ácidos fúlvico e húmico apresentam picos de intensidade de emissão de radiação nos seguintes comprimentos de onda (Baker e Genty, 1999):

- Ácido fúlvico: λ de excitação e emissão entre 250 - 260 nm e 380 - 460nm, respectivamente.
- Ácido húmico: λ de excitação e emissão entre 300 - 340 nm e 410 - 480 nm, respectivamente.

O ácido húmico (AH) apresenta comprimentos de onda de excitação e emissão maiores e intensidade de fluorescência menor do que o ácido fúlvico (AF) devido a (Miano *et al.*, 1988; Senesi *et al.*, 1991; Barancíková *et al.*, 1997):

- A presença de frações de maior peso molecular no AH;
- Um maior grau de aromaticidade e policondensação em AH, enquanto o AF tem um caráter mais alifático;
- Uma maior quantidade de grupos substituintes com elétrons livres, como carbonilas e carboxilas, em AH do que em AF;
- Maior ocorrência de ligações inter e/ou intramolecular no AH;
- Reabsorção da radiação emitida por outros centros absorventes da molécula, ou de moléculas vizinhas.

2.2. Uso da fluorescência nos estudos da interação do ácido húmico com íons metálicos

A fluorimetria é uma alternativa para a análise da interação de ácido húmico e diversos íons metálicos. As substâncias húmicas exibem fluorescência que é suprimida pela ligação com alguns íons metálicos, principalmente os paramagnéticos, como Cu(II), Ni(II) e Co(II) (Lombardi e Jardim, 1997). A grande diferença entre a fluorimetria e as técnicas mencionadas anteriormente (tabela 1.1, p. 30) é que a intensidade de fluorescência depende da concentração de ligante, ou seja, substância húmica, e a propriedade física medida não é relacionada diretamente com a concentração de íon metálico livre ou total.

A fluorimetria apresenta diversas vantagens, incluindo um limite de detecção baixo para a determinação de matéria orgânica natural. A variação da intensidade de fluorescência pode ser relacionada com a concentração do ligante livre, sendo possível determinar a capacidade complexante, definida como a quantidade máxima de íons metálicos livres que se coordenam às substâncias húmicas em solução

aquosa. A fluorimetria é ainda muito rápida e não necessita de eletrólito suporte na solução a ser analisada (Saar e Weber, 1982). No entanto, como a complexação depende da força iônica do meio, essa deve ser controlada.

No presente trabalho a técnica de fluorimetria foi empregada para avaliar a complexação de ácidos húmicos com íons metálicos bivalentes (Cu(II), Pb(II) e Ca(II)) e trivalentes (Cr(III), Al(III) e Fe(III)), na faixa de concentração de 10^{-6} a 10^{-3} mol L⁻¹.

2.3. Parte Experimental

As medições de intensidade de fluorescência foram realizadas com um espectrofluorímetro Hitashi F4500. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 300 nm, e a intensidade de fluorescência medida em 430 nm, que corresponde à região de máximo de intensidade de radiação emitida de uma solução contendo AH. A voltagem da fotomultiplicadora foi ajustada em 700 V. As aberturas das fendas de excitação e emissão foram fixadas em 10,0 mm e 20,0 mm, respectivamente.

A intensidade de fluorescência da solução de ácido húmico foi comparada a da água deionizada.

A célula de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico foi exaustivamente lavada com água deionizada e com a solução de AH.

Preparou-se uma solução estoque de 10 mg L⁻¹ de ácido húmico, marca Aldrich, em pH em 4, e força iônica 0,1 mol L⁻¹ (NaClO₄).

Além disso, foram preparadas soluções 1×10^{-2} mol L⁻¹ de sais de nitrato dos íons metálicos Cu(II), Cr(III), Al(III), Pb(II) e Ca(II), em pH igual a 4 (ajustado com ácido nítrico) para evitar hidrólise, e força iônica igual a 0,1 mol L⁻¹ (NaClO₄). Para o

teste da influência dos íons Fe(III), preparou-se uma solução de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 1×10^{-4} mol L^{-1} em pH 4 e força iônica ajustada para 0,1 mol L^{-1} (NaClO_4).

Na própria célula de quartzo adicionou-se 2,00 mL da solução de ácido húmico 10 mg L^{-1} (pH 4 e força iônica de 0,1 mol L^{-1} - NaClO_4). Essa solução foi termostaticada a 25 °C.

Efetou-se, então, adições sucessivas de pequenos volumes conhecidos da solução do íon metálico, utilizando uma pipeta Eppendorf® com precisão na faixa de volumes de 2 a 20 μL . Após a adição da solução do íon metálico agitou-se a mistura, utilizando agitador magnético, por alguns minutos. Realizou-se, após 4 minutos, a medição em triplicata da intensidade relativa de fluorescência (IRF) de cada mistura. Cada titulação foi realizada três vezes.

O espectro de absorção da solução de ácido húmico (Aldrich) foi registrado com o espectrofotômetro HP 8452A (diode array), empregando célula de 1,00 cm de caminho óptico e água como solução de referência.

Para as medições de pH das amostras, utilizou-se um pHmetro da marca Metrohm, modelo 713, com eletrodo de vidro marca Metrohm (eletrólito interno NaCl 3 mol L^{-1}). O pHmetro era calibrado utilizando-se soluções tampão prontas para uso da marca Merck: pH 4,00 (citrato/ ácido cítrico), pH 7,00 ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) e pH 9,22 (tetraborato de sódio).

2.4. Resultados e Discussões

Na figura 2.1 observam-se os espectros de absorção de soluções de ácido húmico 5 e 10 mg L^{-1} (Aldrich), ambos em pH 4 e força iônica 0,1 mol L^{-1} (NaClO_4). No presente estudo escolheu-se 300 nm como comprimento de onda de excitação.

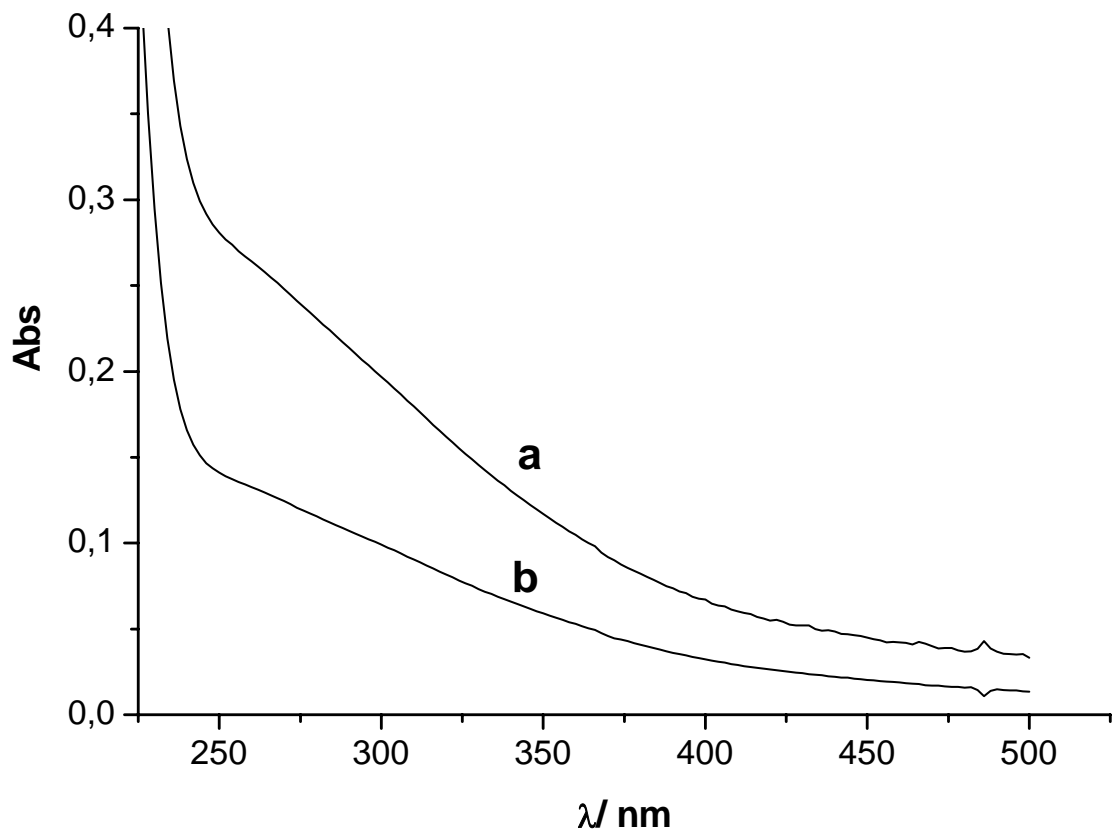


Figura 2.1: Espectro de absorção de uma solução de AH Aldrich em pH 4 e força iônica de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (ajustada com NaClO_4): a) AH 10 mg L^{-1} e b) AH 5 mg L^{-1} .

Nas titulações acompanhando-se a variação de IRF foi empregada solução de AH 10 mg L⁻¹.

Na figura 2.2 observam-se espectros de emissão de uma solução de AH (10 mg L⁻¹) após adições sucessivas de solução de Cu(II) 1 x 10⁻² mol L⁻¹. Verificou-se que a intensidade de fluorescência diminui com o aumento do volume adicionado de solução de Cu(II). As variações de intensidade relativa de fluorescência (IRF) em 430 nm em função da concentração dos íons metálicos Al(III), Ca(II), Cu(II), Pb(II), Cr(III) e Fe(III) estão representados nas figuras 2.3 a 2.8.

Como IRF varia também devido ao efeito de diluição da solução de ácido húmico pela adição de volumes da solução de íon metálico, o valor de IRF foi corrigido multiplicando o valor medido pelo fator:

$$\frac{V + v}{V}$$

onde V é o volume inicial de 2,00 mL e v é a alíquota de solução de íon metálico.

Após a correção do efeito de diluição, os valores de IRF foram normalizados, estabelecendo como 100 a IRF da solução de ácido húmico inicial (antes da adição de íon metálico).

Nas figuras 2.3 e 2.4 estão representados os valores de IRF obtidos após adições de Al(III) e Ca(II), referentes a duas titulações idênticas. Observa-se que a IRF variou muito pouco com o aumento da concentração dos íons metálicos e que o erro relativo foi, portanto elevado.

As adições de íons Cu(II), Pb(II) e Cr(III) produziram supressão significativa da intensidade relativa de fluorescência da solução de AH (figuras 2.5 a 2.7).

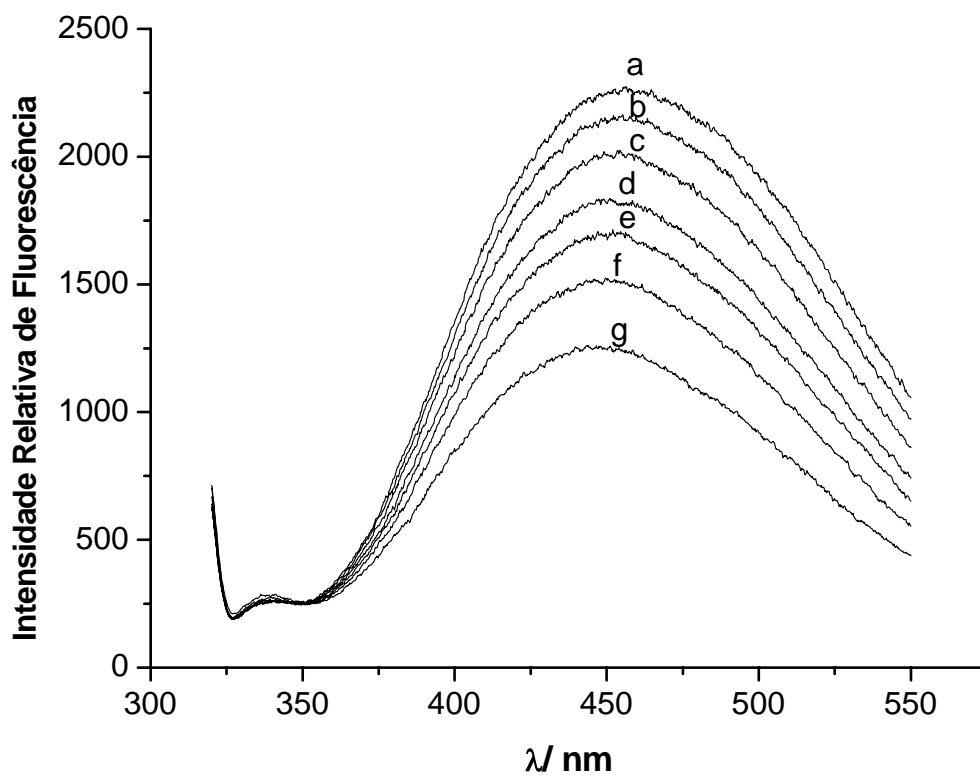


Figura 2.2: Espectros de emissão de uma solução de AH Aldrich 10 mg L⁻¹ após adições sucessivas de solução de Cu(II) 1 x 10⁻² mol L⁻¹: a) 0 μL; b) 5 μL; c) 15 μL; d) 30 μL; e) 50 μL; f) 90 μL e g) 200 μL.

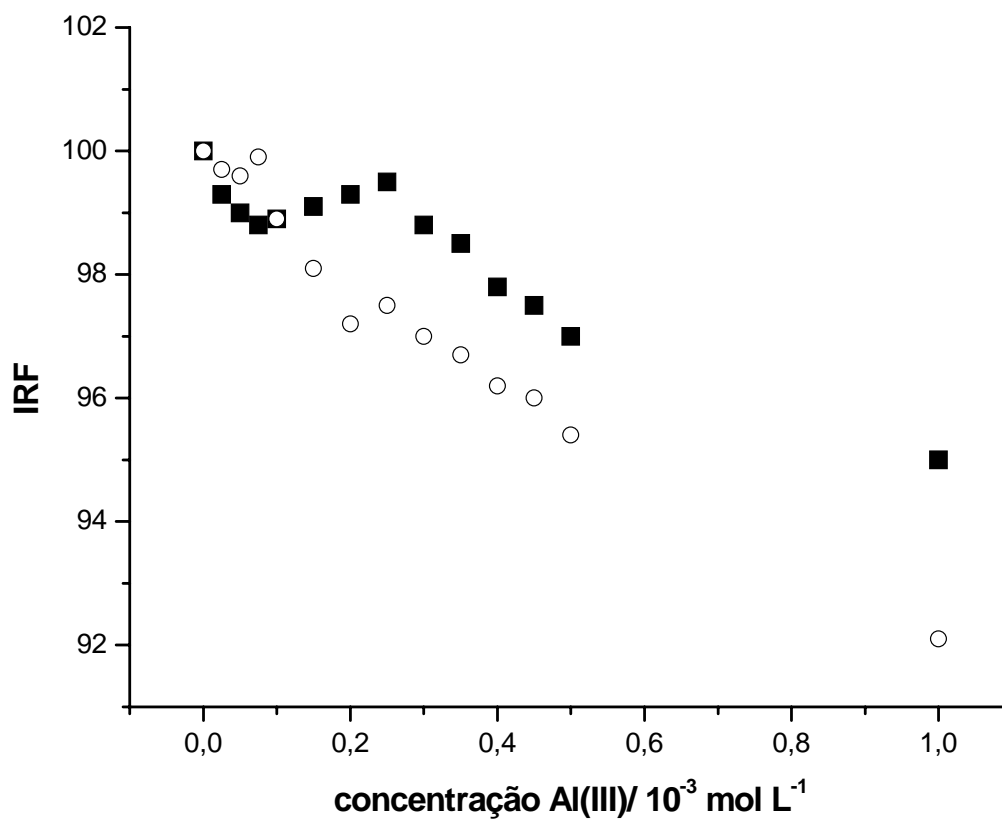


Figura 2.3: Variação da intensidade relativa de fluorescência (IRF) de uma solução de ácido húmico 10 mg L⁻¹, com a adição de uma solução de Al(NO₃)₃. Titulação realizada em duplicata.

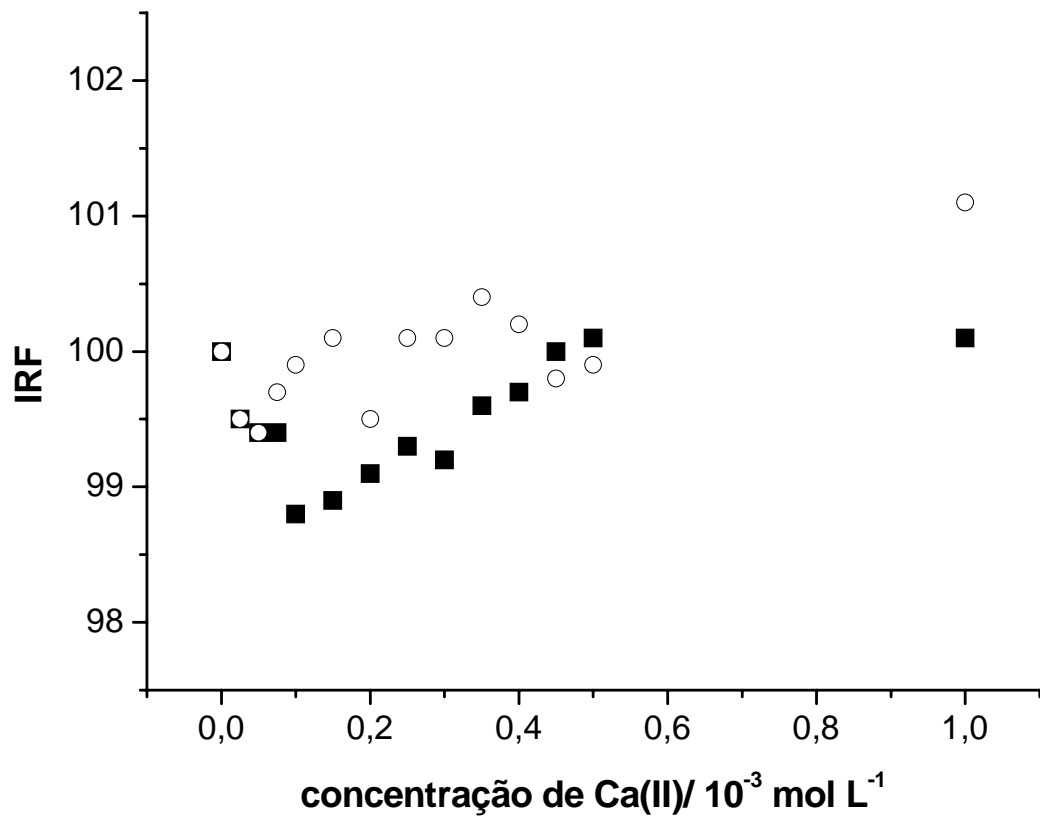


Figura 2.4: Variação da intensidade relativa de fluorescência (IRF) de uma solução de ácido húmico 10 mg L^{-1} , com a adição de uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Titulação realizada em duplicata.

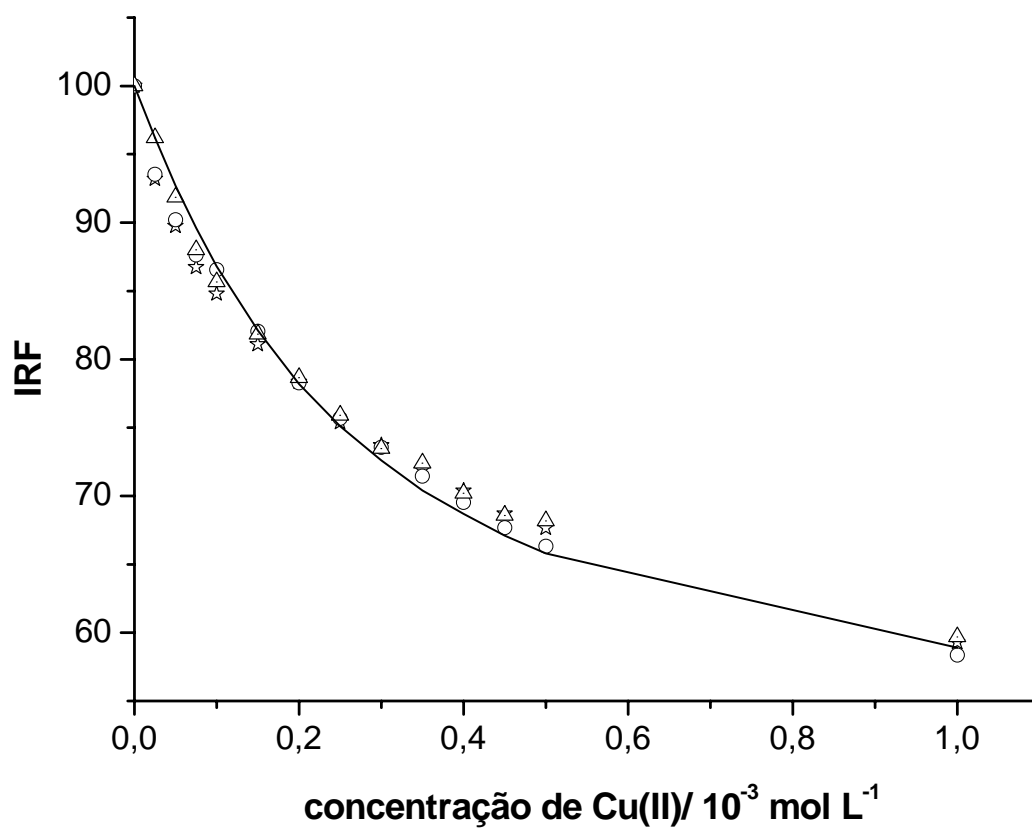


Figura 2.5: Variação da intensidade relativa de fluorescência (IRF) de uma solução de ácido húmico 10 mg L^{-1} , com a adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. Titulação realizada em triplicata. A linha representa os valores calculados a partir da equação 2.1.

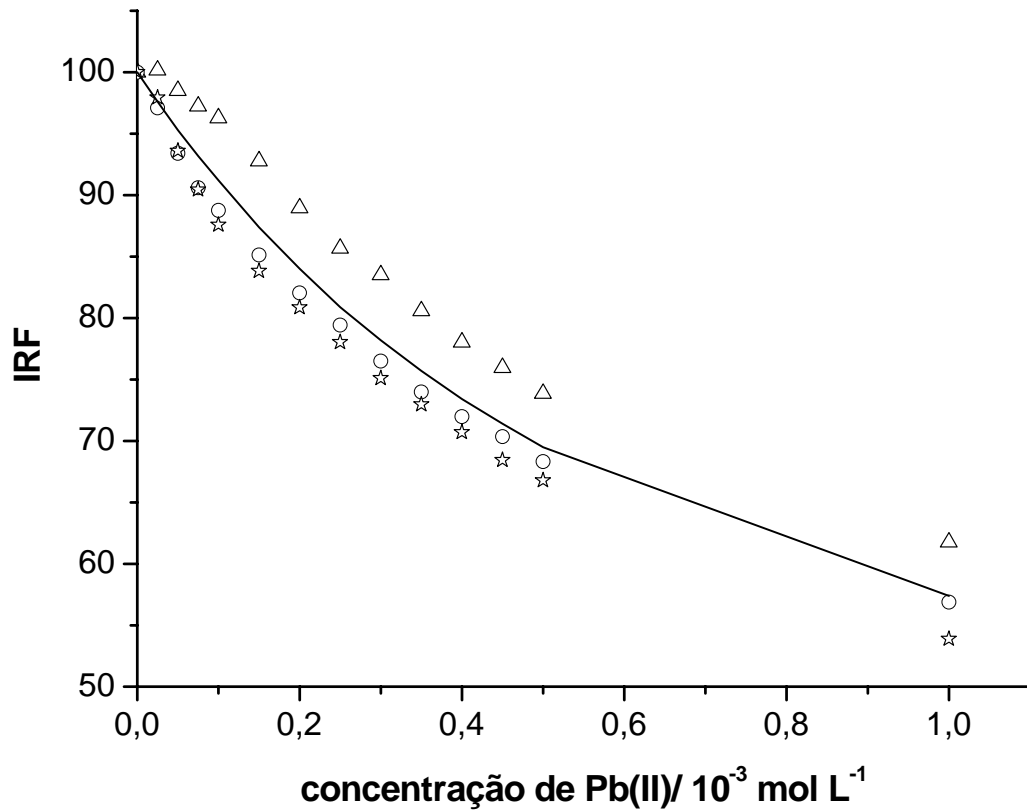


Figura 2.6: Variação da intensidade relativa de fluorescência (IRF) de uma solução de ácido húmico 10 mg L^{-1} , com a adição de uma solução de $Pb(NO_3)_2$. Titulação realizada em triplicata. A linha representa os valores calculados a partir da equação 2.1.

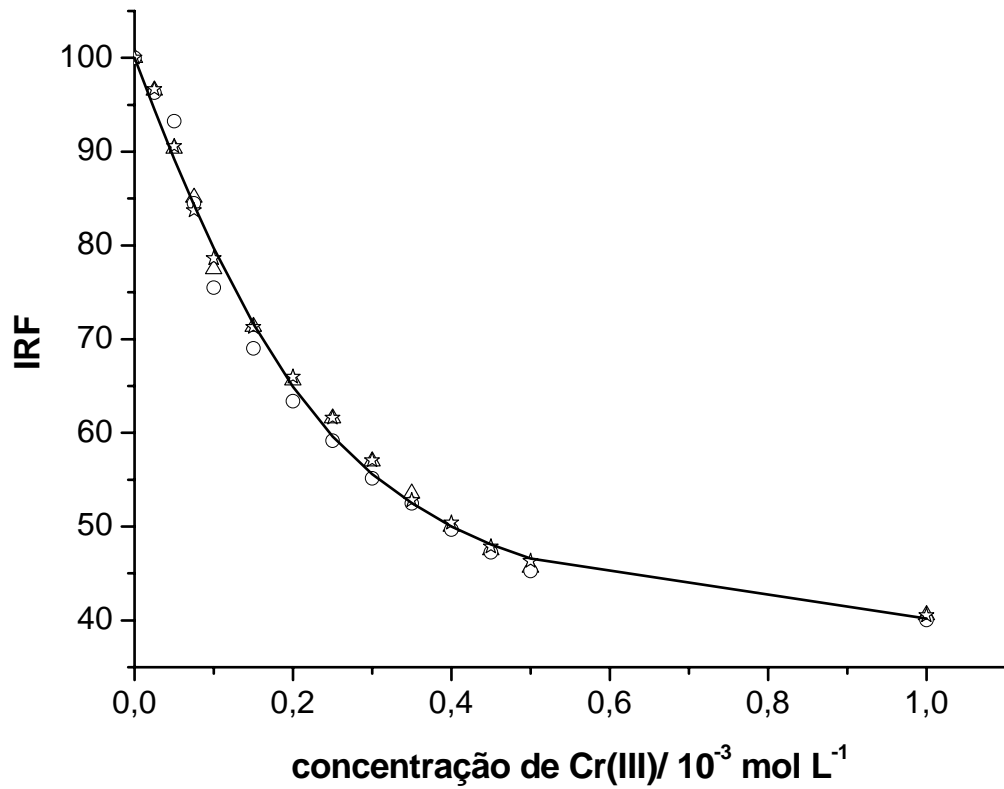


Figura 2.7: Variação da intensidade relativa de fluorescência (IRF) de uma solução de ácido húmico 10 mg L^{-1} , com a adição de uma solução de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$. Titulação realizada em triplicata. A linha representa os valores calculados a partir da equação 2.1.

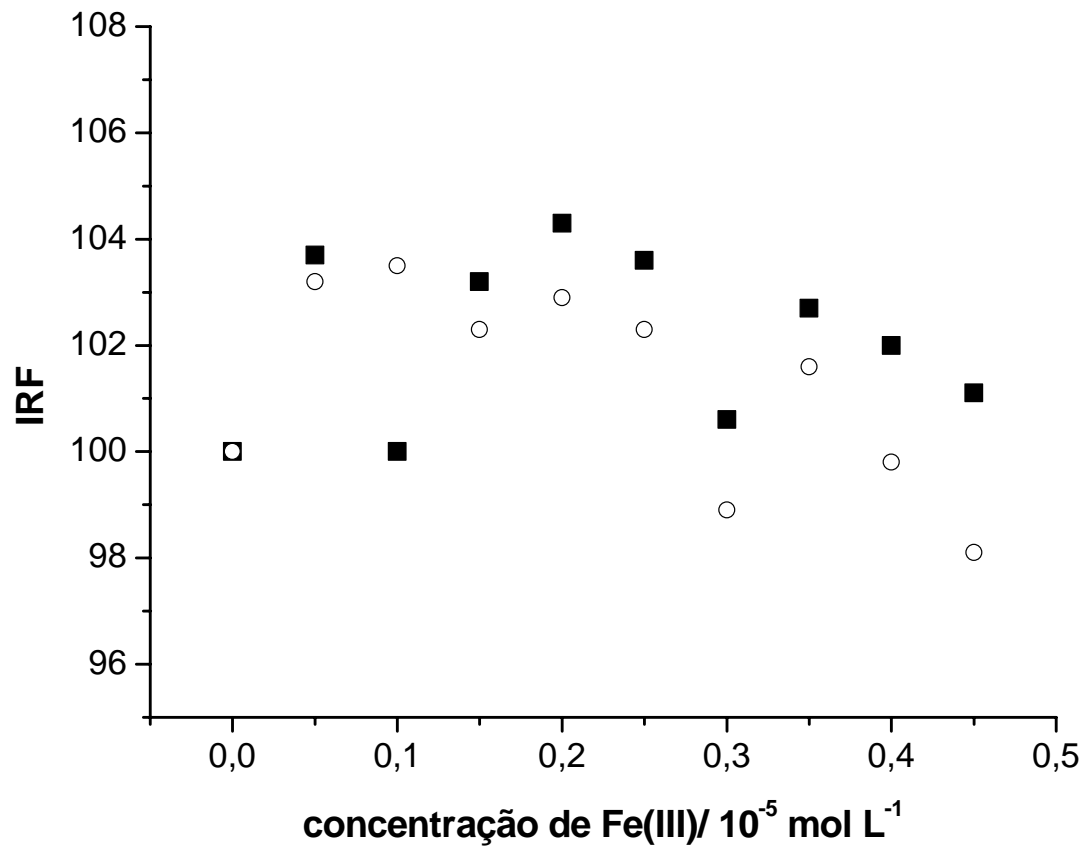


Figura 2.8: Variação da intensidade relativa de fluorescência (IRF) de uma solução de ácido húmico 10 mg L^{-1} , com a adição de uma solução de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$. Titulação realizada em duplicata.

Comparando as figuras 2.5 a 2.7, observa-se que adições de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu(II), Pb(II) e Cr(III) suprimiram o sinal de 41%, 43% e 60%, respectivamente. Os estudos com íons Fe(III) só foram possíveis na faixa de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, devido à hidrólise. Observou-se a precipitação de Fe(OH)_3 em concentrações maiores do que $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4. A adição de íons Fe(III), nesta faixa de concentração de $(0,5 \text{ a } 4,5) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ não produziu alteração significativa na intensidade relativa de fluorescência do AH, com erros relativos elevados (figura 2.8).

Conforme mencionado no capítulo 1 (p. 23), medições de tensão superficial em função da concentração de AH, apresentados por Wershaw (1992), mostraram que o AH forma agregado em solução, apresentando uma região externa hidrofílica (polar) e uma interna hidrofóbica (apolar). Os íons metálicos, então, interagem com a superfície polar desta pseudomicela. Alguns autores mostraram que a adição de íons metálicos altera essa conformação das moléculas de AH (Wandruska *et al.*, 1997).

Além disso, estudos da literatura de absorção no infravermelho mostraram que os grupos funcionais, principalmente as carboxilas, sofrem alteração após complexação com íons metálicos. (e.g. Fukushima *et al.*, 1995)

Essas alterações na estrutura da molécula de AH podem aumentar o efeito de auto-absorção da radiação emitida, diminuindo a intensidade relativa de fluorescência medida.

Os parâmetros de complexação dos íons metálicos com o AH foram obtidos pelo modelo proposto por Ryan e Weber (1982). Considerando a estequiometria 1:1, os valores de IRF são relacionados com a concentração de AH e do íon metálico segundo a equação:

$$IRF = \left(\frac{I_{ML} - 100}{2K.C_L} \right) \left[(K.C_L + K.C_M + 1) - \sqrt{(K.C_L + K.C_M + 1)^2 - 4K^2.C_L.C_M} \right] + 100 \quad (2.1)$$

onde,

IRF = intensidade relativa de fluorescência;

I_{ML} = intensidade de fluorescência quando todo AH está complexado com íon metálico;

K = constante de estabilidade condicional do complexo ML (1:1). $K = [ML]/([M] * [L])$, sendo $[L]$ a concentração de AH não complexado e $[M]$ a concentração de íon metálico livre.

C_L = concentração total de sítios de coordenação do AH;

C_M = concentração total de íon metálico.

A equação 2.1 descreve a curva de titulação do íon metálico total (C_M) em função da intensidade relativa de fluorescência (IRF), considerando que um mol de AH se coordena a um mol de íon metálico (1:1).

O software Sigmaplot® foi utilizado para efetuar a regressão não linear das curvas de titulação, obtendo-se os valores ajustados: da constante de estabilidade condicional (K), concentração total de sítios de coordenação do AH (C_L) e a intensidade de fluorescência limite (quando todo AH está complexado ao íon metálico – I_{ML}).

A capacidade complexante (C_c), em mol g⁻¹, do AH é obtida dividindo-se o valor da concentração total de sítios de coordenação do AH (C_L) pela concentração do AH estudado (10 mg L⁻¹, neste caso).

Na tabela 2.1 estão representados os valores ajustados obtidos para a constante de estabilidade condicional 1:1 (K), a concentração total de sítios de coordenação do AH (C_L) e a intensidade de fluorescência limite, na qual a adição de íon metálico não produz mais supressão (I_{ML}).

O valor de I_{ML} não foi determinado experimentalmente, mas obtido pelo ajuste da curva, pois em concentrações altas de íon metálico pode ocorrer precipitação do AH ou do hidróxido de íon metálico.

2.5. Conclusões

Nas figuras 2.5 e 2.7 (referentes às titulações com Cu(II) e Cr(III)) a curva calculada a partir dos dados da tabela 2.1, substituídos na equação 2.1, apresentam concordância boa com os valores experimentais. Entretanto, na figura 2.6 (referente ao Pb(II)) observou-se dispersão maior entre os valores experimentais e os calculados.

Comparando os valores obtidos para as capacidades complexantes (C_c) e (K) do AH com alguns dados extraídos da literatura (tabela 2.1), observa-se que os valores de C_c são da mesma ordem de grandeza, enquanto os de K apresentam grande variação.

Entretanto, muitas variáveis podem contribuir para a existência dessa diferença grande entre os resultados apresentados para os valores de constante de estabilidade condicional e capacidade complexante de ácidos húmicos e íons metálicos, como:

- origem do AH;
- método de extração e purificação do AH;

Tabela 2.1: Valores calculados para a concentração total de AH (C_L), a intensidade de fluorescência quando todo AH está complexado com íon metálico (I_{ML}), a capacidade complexante do AH (C_c) e a constante de estabilidade condicional (K).

Complexo	pH	C_L ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	I_{ML}	C_c (mol.g^{-1})	K $\times 10^3$	Figura
Cu(II)-AF ^a	5	—	40,2	22,1	48	—
Cu(II)-AH ^b	4	—	—	33 (± 1)	501 (± 16)	—
Cu(II)-AH	4	112 (± 16)	50,4 ($\pm 3,0$)	11,2 ($\pm 1,6$)	4,27 ($\pm 0,04$)	2.5
Pb(II)-AH	4	208 (± 6)	29,7 ($\pm 4,3$)	20,8 ($\pm 0,6$)	2,12 ($\pm 0,08$)	2.6
Cr(III)-AH	4	219 (± 19)	34,5 ($\pm 2,5$)	21,9 ($\pm 1,9$)	14,3 ($\pm 1,5$)	2.7

^a valores determinados por Ryan e Weber (1982) utilizando fluorescência em meio de força iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KNO_3), pH = 5, a 25°C .

^b valores determinados por Colombo (2006) e Colombo *et al.* (2007) utilizando eletrodo íon seletivo em meio de força iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KNO_3), pH = 4, a 25°C .

- força iônica da solução;
- temperatura;
- pH (que afeta tanto o AH como o íon metálico);
- método de análise do complexo e
- método de tratamento dos dados (modelo matemático aplicado).

Para a utilização da equação 2.1 (p.62) deve-se considerar que (Ryan e Weber, 1982):

- a quantidade do material fluorescente seja representativa do seio da amostra;
- o material da amostra se comporte como um tipo único de ligante, com propriedades médias representadas por K e C_L ;
- nas condições das titulações, quando há excesso de íons metálicos, sejam formados somente complexos 1:1.

Existem ainda diversas limitações para a aplicação destas suposições no tratamento dos dados, pois podem estar presentes em solução os seguintes tipos de moléculas de AH (Ryan e Weber, 1982):

- a) fluorescem e se ligam a íons metálicos com conseqüente supressão de fluorescência,
- b) fluorescem, mas não formam complexos,
- c) não fluorescem, mas formam complexos e
- d) não fluorescem ou formam complexos.

Os tipos de moléculas (a) e (b) são considerados neste tratamento teórico e o tipo (d) não é levado em consideração neste estudo. O tipo (c) não é considerado e pode causar erro nos resultados se presente em quantidades significativas. Se a constante de estabilidade para o tipo (c) for consideravelmente maior ou menor do

que o tipo (a), haverá um erro nos valores de constantes de estabilidade calculada e C_L .

Descrever todo o material na amostra de AH por um único valor de K certamente não é ideal, mas na aplicação da equação 2.1 esse valor é necessário para a obtenção da capacidade complexante de AH (C_C).

Na titulação de um ligante com íon metálico, quando o íon metálico está em excesso é possível que complexos polinucleares, com dois ou mais íons metálicos por ligante se formem. Mas não se sabe se a ligação de um segundo ou terceiro íon metálico ao AH pode afetar a fluorescência. Já que os valores de K e C_L são determinados a partir da intensidade de fluorescência, pode ser que o modelo de complexo 1:1 seja apropriado, e que os valores de K e C_L obtidos sejam aplicáveis somente para a ligação do primeiro íon metálico e não sejam afetados por ligações múltiplas.

Assim, pode-se concluir que os valores calculados das constantes permitem uma avaliação dos parâmetros de complexação, embora o modelo de cálculo apresente algumas limitações de uso. Além disso, as variações estruturais existentes entre AH de procedências variadas e as diferentes metodologias empregadas em seu estudo dificultam a comparação com os valores da literatura referentes à capacidade complexante e a constante de estabilidade condicional de AH com íons metálicos.

2.6. Referências Bibliográficas

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

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

BURSTEIN, E.A. e EMELYANENKO, V.I., *Log-normal description of fluorescence spectra of organic fluorophores*. Photochemistry and Photobiology 164, 316-320, 1996.

COLOMBO, S.M., *Isolamento, purificação e caracterização de substâncias húmicas isoladas de vermicomposto. Propriedades ácido-base e de complexação com íons Cu(II)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química –USP, 2006.

COLOMBO, S.M.; DOS SANTOS, L.B.O.; MASINI, J.C. e ABATE, G., *Propriedades ácido-base e de complexação de ácidos húmicos e fúlvicos isolados de vermicomposto*. Química Nova 30 (5), 1261-1266, 2007.

FUKUSHIMA, M.; NAKAYASU, K.; TANAKA, S. e NAKAMURA, H., *Chromium(III) binding abilities of humic acids*. Analytica Chimica Acta 317, 195-206, 1995.

LOMBARDI, A.T. e JARDIM, W.F., *The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching*. Chemical Speciation and Bioavailability 9(27), 27-34, 1997.

MIANO, T.M.; SPOSITO, G. e MARTIN, J.P., *Fluorescence spectroscopy of humic substances*. Soil Sci. Soc. Am. J. 52, 1016-1019, 1988.

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

SAAR, R.A. e WEBER, J.H., *Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry*. Environmental Science & Technology 16 (9), A510-517, 1982.

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

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. e NIEMAN, T.A., *Princípios de Análise Instrumental* (5ª ed.). Porto Alegre: Bookman, p. 322 e 327, 2002.

WANDRUSKA, R.V.; RANGLE, C. e ENGBRETSON, R., *The role of selected cations in the formation of pseudomicelles in aqueous humic acid*. Talanta 44, 805-809, 1997.

WERSHAW, R.L., *Membrane-micelle model for humus in soils and sediments and its relation to humification*. US geological Survey; Denver, open-file report 91-513, 1992.

CAPÍTULO 3. *DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO*
QUIMILUMINESCENTE PARA A DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS

3.1. Introdução

A quimiluminescência é produzida quando uma reação química fornece uma espécie excitada eletronicamente que emite luz quando retorna ao estado fundamental ou que transfere sua energia para outra espécie, que então produz emissão (Skoog *et al.*, 2002).

Dentre as vantagens da detecção quimiluminescente, destacam-se a alta sensibilidade e uma faixa linear de concentração do analito ampla, com o uso de uma instrumentação relativamente simples. A alta sensibilidade dos procedimentos é obtida principalmente pela ausência da necessidade de uma fonte de radiação, eliminando o espalhamento Raman, Rayleigh e ruídos relacionados com a fonte, permitindo que a fotomultiplicadora seja operada em potencial relativamente alto comparado ao aplicado na fluorescência convencional (Robards e Worsfold, 1992).

Do ponto de vista analítico, a intensidade de radiação emitida é o parâmetro mais significativo e pode ser usado para quantificar a espécie que determina a velocidade de reação. A intensidade pode ser medida como uma resposta transiente ou por integração com relação ao tempo de emissão (Robards e Worsfold, 1992).

A seletividade baixa é uma das principais limitações analíticas da detecção quimiluminescente. A utilização de sistemas de análise com soluções em fluxo tem a vantagem de acomodar um tratamento químico *on line* para fornecer um certo grau de seletividade à análise (Robards e Worsfold, 1992).

3.1.1. Quimiluminescência de ácidos húmicos

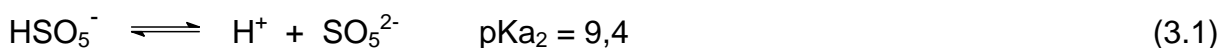
Algumas investigações têm sugerido que a oxidação dos grupos hidroxilas dos anéis aromáticos pode produzir quimiluminescência (Slawinska e Slawinski, 1967).

A determinação por quimiluminescência de ácidos húmicos (AH) a partir da oxidação utilizando-se agentes oxidantes tais como: MnO_4^- , Br_2 , ClO^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, H_2O_2 , H_2O_2 na presença de formaldeído e BrO^- já foi investigada (tabela 1.2., p. 37 - limites de detecção na faixa de 0,05 a 10 mg L^{-1}) (Marino e Ingle Jr, 1981; Kitano *et al.*, 1994; Michalowski *et al.*, 2001).

A utilização do método quimiluminescente para a determinação de ácidos húmicos é mais preciso em comparação com o método espectrofotométrico, conforme discutido no capítulo 1 (tabela 1.2, p. 37).

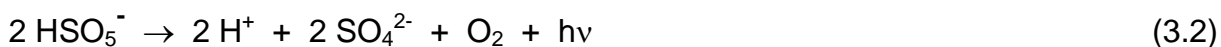
No presente estudo foi investigada a determinação por quimiluminescência de ácidos húmicos baseada na sua oxidação por peroxomonossulfato em meio alcalino. A utilização do sal triplo de peroxomonossulfato de potássio ou Oxone, $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, é vantajosa devido à sua alta estabilidade comparada aos demais oxidantes estudados anteriormente.

O ânion peroxomonossulfato (PMS) é obtido a partir do sal de peroxomonossulfato de potássio que é bastante solúvel em água. Ele também pode ser obtido a partir da dissociação do ácido peroxomonossulfúrico, também conhecido como ácido de Caro. Este é um ácido forte e a sua primeira constante de ionização é muito baixa ($\text{p}K_{a1} < 1$). Por isso em solução de pH até 9 a forma predominante é HSO_5^- (Ball e Edwards, 1956; Coichev e Eldik, 1991).



O ânion peroxomonossulfato é um agente oxidante muito forte e se decompõe cataliticamente na presença de metais de transição ou substratos orgânicos produzindo radicais e íons radicalares que também possuem potenciais de redução elevados. A decomposição catalítica do HSO_5^- , melhor discutida no próximo capítulo,

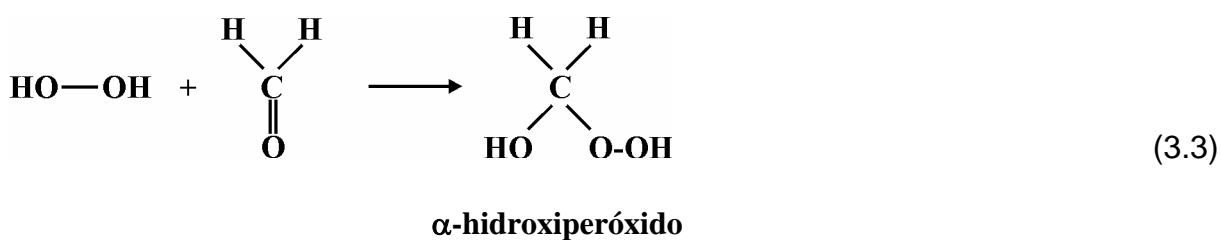
pode ser resumida como (Makita *et al.*, 1993; Lin e Yamada, 2000 e Tsukada *et al.*, 1998):



A oxidação de ácidos húmicos e fúlvicos por PMS gera um produto em estado eletronicamente excitado cujo decaimento de energia leva à emissão de radiação. No presente trabalho a intensidade de radiação emitida ($I_{\text{máx}}$) foi relacionada com a concentração de substância húmica, levando ao desenvolvimento de método analítico.

Empregou-se, com fins comparativos, o método analítico para a determinação de AH e AF baseado na emissão de radiação na presença de peróxido de hidrogênio e formaldeído. O sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ é adequado para a determinação de AH devido à sua alta sensibilidade e baixa interferência de íons presentes em águas naturais como Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} e CO_3^{2-} , Fe(III) , Mg(II) e Cu(II) (Kitano, 1994). O procedimento analítico foi adaptado de Kitano (1994).

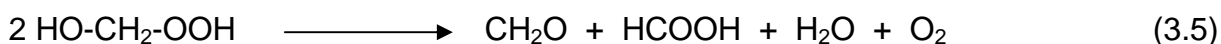
A oxidação de CH_2O por H_2O_2 em meio básico produz uma emissão de radiação extremamente fraca (Slawinska e Slawinski, 1975). O formaldeído reage com o peróxido de hidrogênio para produzir α -hidroxi-metil peróxido, também chamado de α -hidroxiperóxido, de acordo com a seguinte equação:



Entretanto, o α -hidroxiperóxido sofre decomposição em meio básico (Slawinska e Slawinski, 1975):



Um outro modo de decomposição do α -hidroxiperóxido, que envolve desproporcionamento de radicais peroxi está representado a seguir (Slawinska e Slawinski, 1975):



Uma característica importante desta reação é a formação de O_2 , pois uma parte das moléculas de oxigênio pode ser formada no estado singlete excitado (Slawinska e Slawinski, 1975). Luz visível pode resultar da transição simultânea de duas moléculas de $^1\text{O}_2$. Esta reação é capaz de gerar um fóton de luz vermelha ou de transferir esta energia para um fluoróforo (como AH e AF) (Kahn e Kasha, 1966). Por isso observou-se um aumento significativo da intensidade de radiação emitida na presença de AH.

Assim, no presente trabalho os dois métodos foram empregados na análise das mesmas amostras de ácidos húmicos, fúlvicos e substância húmica para uma comparação dos resultados.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Reagentes e materiais

Foram utilizados somente reagentes de grau analítico (Merck ou Aldrich). As soluções foram preparadas diariamente utilizando-se água deionizada purificada com o sistema Milli-Q Plus Water System (Millipore).

Prepararam-se soluções estoque e diluídas de ácidos húmico, fúlvico e substâncias húmicas provenientes da Aldrich e de amostras de solos diferentes (tabela 3.1).

Analisaram-se AH extraídos de turfas de duas procedências diferentes (Turfa A e B). Ambas foram cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Eduardo A. Neves. O solo *Turfa A* é proveniente de uma turfeira do município de Luis Antônio – SP. O AH foi extraído desta turfa com NH_4OH . A partir da *Turfa B* foram extraídos AH com NaOH e com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$.

As amostras SH1, SH2 e SH3 foram fornecidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Julio C. Rocha. Elas são de procedências diferentes, e somente a amostra SH1 foi purificada.

As amostras VA1, VA2, VA3 e VA4 foram fornecidas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende. O mesmo vermicomposto (VA) foi submetido a diferentes tratamentos para a extração de AH: uma fração foi extraída com NaOH e outra com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Após extração com NaOH , uma parte foi purificada por diálise (VA1) e outra parte não foi purificada (VA2). A partir do mesmo vermicomposto, envelhecido de 6 meses, foi extraído o AH com NaOH e purificado (VA3).

Todas as amostras foram liofilizadas.

As amostras VBH e VHF foram fornecidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jorge C. Masini. A partir da amostra de vermicomposto foram extraídas as soluções de ácidos húmico e fúlvico. Em meio fortemente ácido foi extraído o AH. Após extração, elas foram eluídas através de colunas contendo resinas trocadoras de íons para purificação. As amostras não foram liofilizadas.

Tabela 3.1: Características das amostras de ácidos húmicos, fúlvicos e substâncias húmicas.

Amostra	Origem	Extração	Procedimento de purificação	C (%)	H (%)	Cl ^b (%)
AH -ALD	Aldrich	-----	-----	51,5	4,7	0,6
AH - TA	Turfa A	NH ₄ OH 0,5 mol L ⁻¹	Troca iônica	52,2	4,0	0,8
AH - TB1	Turfa B	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Diálise	53,7	3,9	1,2
AH - TB2	Turfa B	Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1 mol L ⁻¹	Diálise	54,6	4,2	0,8
AH - VA1	Vermicomposto A	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Diálise	50,5	5,5	0,4
AH - VA2	Vermicomposto A	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	nenhum	43,9	5,7	0,8
AH - VA3 ^a	Vermicomposto A	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Diálise	44,1	5,9	3,2
AH - VA4	Vermicomposto A	Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1 mol L ⁻¹	Diálise	47,2	5,1	2,0
AH - VBH	Vermicomposto B	NaOH 0,5 mol L ⁻¹	Troca iônica	57,7	4,4	0,2
AF - VBF	Vermicomposto B	NaOH 0,5 mol L ⁻¹	Troca iônica	46,8	4,0	0,2
SH1	Substância húmica	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	Diálise	36,9	3,4	1,0
SH2	Substância húmica	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	nenhum	28,5	2,8	12,4
SH3	Substância húmica	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	nenhum	24,4	2,2	14,9

^a extraído após 6 meses^b Cl pode ser usado como indicativo do grau de pureza da amostra.

Os teores de C, H e Cl de todas as amostras da tabela 3.1 foram determinados por análise elementar na Central Analítica do Instituto de Química – USP, São Paulo.

A solução de SO_5^{2-} $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diariamente pela dissolução de 9,22 g do sal $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, em 50,0 mL.

Uma solução de H_2O_2 $0,58 \text{ mol L}^{-1}$ e CH_2O $0,44 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela mistura das soluções estoque recentes de H_2O_2 $1,16 \text{ mol L}^{-1}$ (peridrol 30%, Merck) e CH_2O $0,88 \text{ mol L}^{-1}$ (37%, Merck).

Foram preparadas soluções de NaOH $0,16$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Soluções estoque de 5000 mg L^{-1} de Mn(II)EDTA, Co(II)EDTA, Fe(III)EDTA, Cu(II)EDTA, Cr(III)EDTA e Ca(II)EDTA foram preparadas pela dissolução dos sais de nitrato e Na_2EDTA , numa proporção de 1:1. Soluções de CoCl_2 e MnCl_2 100 mg L^{-1} e soluções de Na_2EDTA , NaCl, NaNO_3 , Na_2CO_3 e Na_3PO_4 $10\,000 \text{ mg L}^{-1}$ também foram preparadas a fim de investigar o efeito da adição de alguns ânions.

A amostra de água do Rio Miranda, Mato Grosso do Sul – Brasil, foi coletada em frascos limpos de polietileno e estocadas à $-15 \text{ }^\circ\text{C}$. A amostra foi filtrada à vácuo utilizando-se a membrana Millipore HA (poro de diâmetro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$).

As medições de quimiluminescência foram realizadas em um luminômetro da marca Berthold, modelo Lumat LB 9507, que possui 2 injetores de volumes variáveis de solução. As reações foram realizadas em tubos transparentes de poliestireno com capacidade para 5 mL, posicionados em frente a uma fotomultiplicadora.

O luminômetro utilizado não permite um arranjo alternativo do sistema em fluxo. Por outro lado ele possui uma câmara otimizada para captação de luz e injeção automática de pequenos volumes de reagentes com alta precisão e exatidão para a mistura vigorosa e imediata com baixo consumo de reagentes.

3.2.2. Procedimento: método analítico empregando-se PMS

Para o método utilizando o peroxomonossulfato como oxidante, a seqüência de adição de reagentes foi a seguinte: 100 μL de água (branco) ou de solução de SH foram introduzidos no tubo, no qual foram injetados seqüencialmente 100 μL de solução de peroxomonossulfato de potássio 0,6 mol L^{-1} e logo após 0,7 s, 100 μL da solução NaOH 1,0 mol L^{-1} .

Também foi estudada a influência de alguns cátions e ânions - Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , Co(II), Mn(II), Fe(III), Cu(II), Cr(III) e Ca(II) – na reação de AH com PMS. A seqüência de adição de reagentes neste caso foi a seguinte: 50 μL de água ou de solução de SH + 50 μL de espécie interferente foram introduzidos no tubo e foram injetados, primeiramente, 100 μL de solução de peroxomonossulfato de potássio 0,6 mol L^{-1} e logo após 0,7 s, 100 μL da solução NaOH 1,0 mol L^{-1} .

3.2.3. Procedimento: método analítico empregando-se H_2O_2 / CH_2O

Para o método utilizando H_2O_2 / CH_2O como oxidante, a seqüência de adição de reagentes foi a seguinte: 200 μL de água (branco) ou de solução de AH foram introduzidos no tubo, no qual foram injetados seqüencialmente 100 μL de solução de peróxido de hidrogênio 0,58 mol L^{-1} + formaldeído 0,44 mol L^{-1} e logo após 0,7 s, 100 μL da solução NaOH 0,16 mol L^{-1} .

Os resultados foram obtidos em triplicata.

3.3. Resultados e Discussões

Com o objetivo de desenvolvimento do método analítico foram observadas as variações de intensidade de radiação emitida após a adição de AH, AF ou SH a uma solução básica de PMS. O perfil de intensidade de radiação quimiluminescente emitida em função do tempo está representado na figura 3.1.

O melhor sinal foi observado com a seguinte ordem de mistura dos reagentes: solução de AH, AF ou SH seguida da adição das soluções de PMS e NaOH. Somente após a adição da solução de NaOH a intensidade de radiação emitida em função do tempo foi registrada. O tempo total de reação foi de cerca de 2 segundos.

O máximo de intensidade de radiação emitida ($I_{m\acute{a}x}$) e a área do pico foram relacionados com as concentrações de AH, AF e SH. Em todas as amostras empregadas neste estudo, os valores de $I_{m\acute{a}x}$ e área aumentaram com a concentração de AH, AF e SH.

A área integrada sob as curvas de intensidade vs. tempo dá indícios da eficiência relativa da quimiluminescência, enquanto a altura do pico ($I_{m\acute{a}x}$) geralmente está relacionada à velocidade da reação QL – quanto maior $I_{m\acute{a}x}$, maior a velocidade da reação.

A variação do sinal em função da concentração de PMS está representada na figura 3.2.

Os melhores valores de $I_{m\acute{a}x}$ e área foram obtidos quando a concentração de PMS era $0,6 \text{ mol L}^{-1}$. O sal peroxomonossulfato não é solúvel em concentrações maiores do que $0,8 \text{ mol L}^{-1}$, por isso não foram testadas concentrações superiores.

A reação ocorreu somente em meio básico. Em experimentos realizados adicionando-se água ao invés de solução de NaOH não foi observado sinal

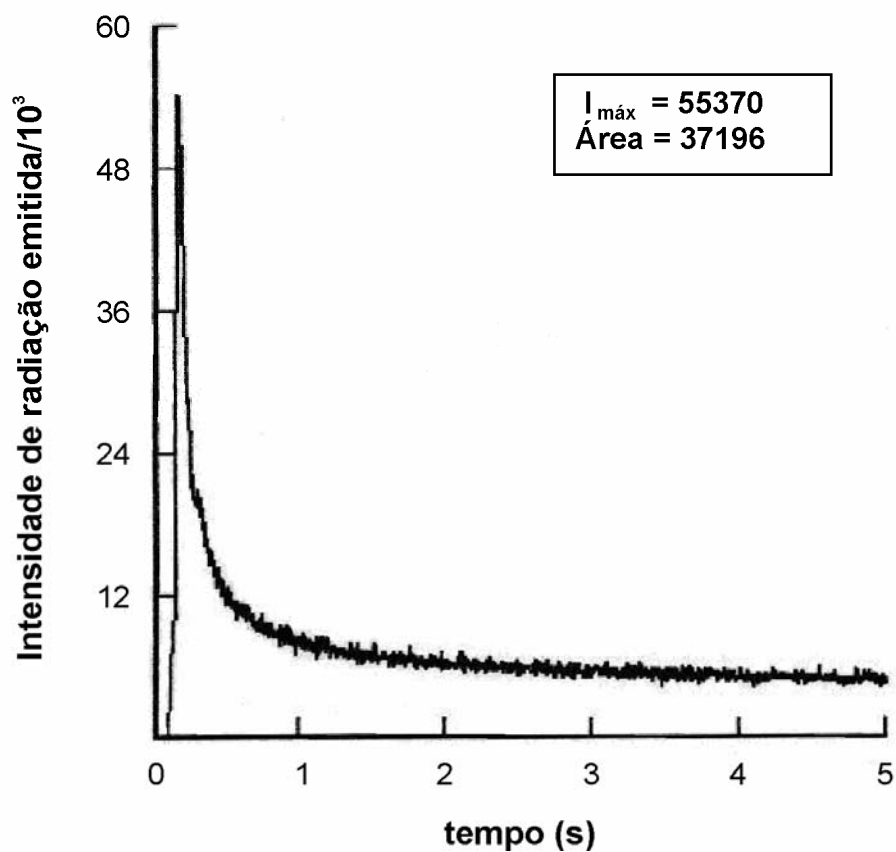


Figura 3.1: Perfil da intensidade de radiação emitida em função do tempo da reação de oxidação de AH Aldrich com PMS. No tubo contendo 100 μL de AH 10 mg L^{-1} foram adicionados seqüencialmente 100 μL de solução PMS 0,6 mol L^{-1} e 100 μL de solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} .

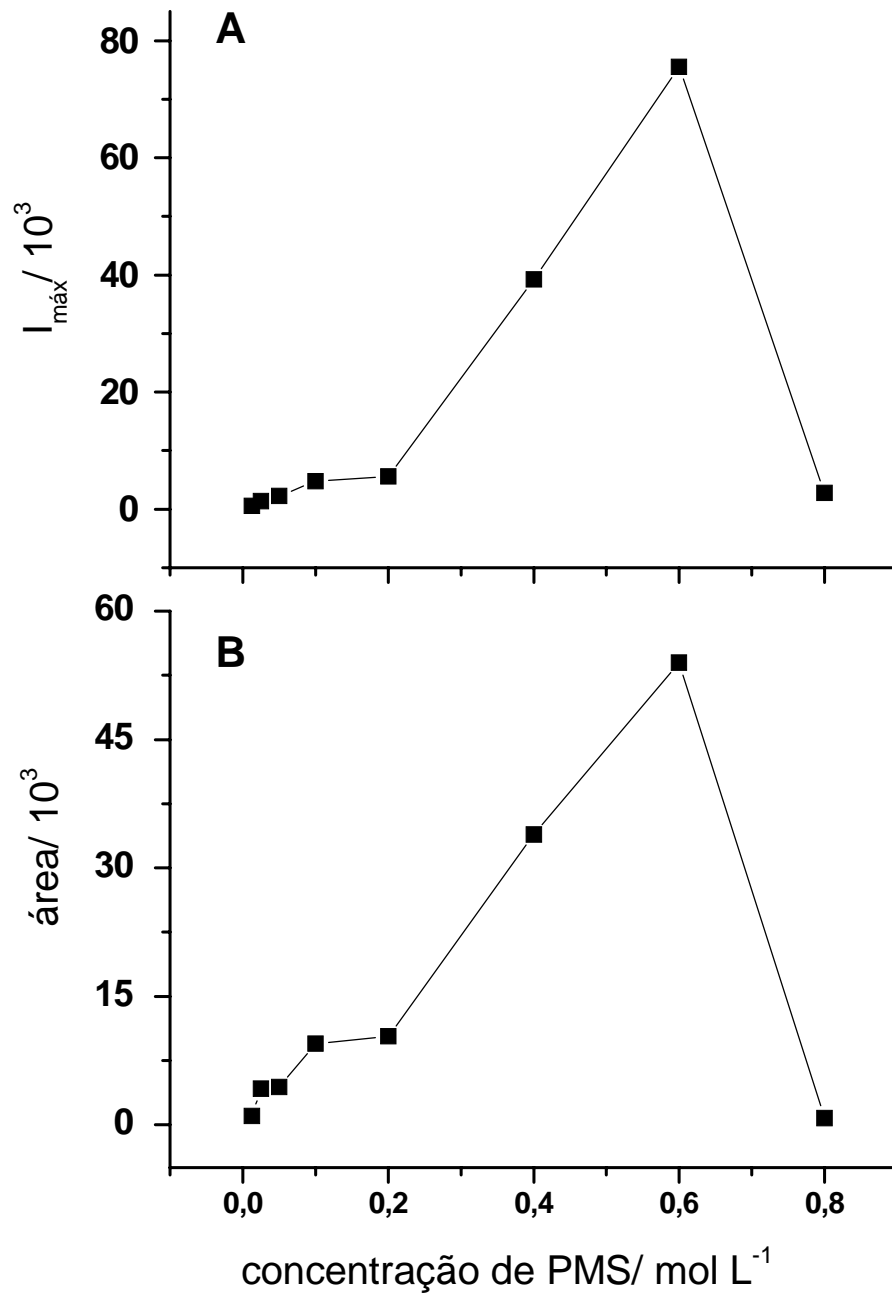


Figura 3.2: Efeito da concentração de PMS. Valores de $I_{\text{máx}}$ (A) e área (B) obtidos pela mistura de 100 μL de água ou AH Aldrich 10 mg L^{-1} + 100 μl de PMS ($2,5 \times 10^{-2}$ – 0,8) mol L^{-1} + 100 μL de NaOH 1,0 mol L^{-1} .

quimiluminescente. Adicionou-se solução de NaOH na faixa de 0,90 a 1,20 mol L⁻¹, sendo que os valores de $I_{\text{máx}}$ e área não foram significativamente afetados.

É importante ressaltar que a concentração de hidróxido adicionada deveria ser suficiente para neutralizar os íons H⁺ provenientes do sal PMS e manter o meio básico.

Adicionou-se a solução de NaOH após os demais reagentes porque o PMS não é muito estável em meio básico (Kennedy e Stock, 1960).

O outro método analítico utilizado comparativamente, baseado na oxidação de AH, AF e SH por H₂O₂/ CH₂O, foi adaptado de Kitano (1994).

Na figura 3.3 observa-se um gráfico de intensidade de radiação emitida em função do tempo de reação de uma solução 5 mg L⁻¹ de AH oxidado por H₂O₂ (0,58 mol L⁻¹) e CH₂O (0,44 mol L⁻¹) em meio alcalino (NaOH 0,16 mol L⁻¹).

3.3.1. Curvas de calibração

As curvas analíticas de ambos os métodos estão representadas nas figuras 3.4 e 3.5 e os correspondentes parâmetros das regressões lineares na tabela 3.2.

Os valores de $I_{\text{máx}}$ e área são funções lineares da concentração de AH Aldrich para ambos os métodos (PMS e H₂O₂/ CH₂O), numa faixa de concentração de 0,5 – 20 mg L⁻¹, curvando em direção à abscissa na faixa de 40-200 mg L⁻¹ (figuras 3.6 e 3.7).

O limite de detecção (LD) foi definido como três vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo valor do coeficiente angular. A sensibilidade de calibração (**M**) foi estabelecida como o coeficiente angular da curva de calibração.

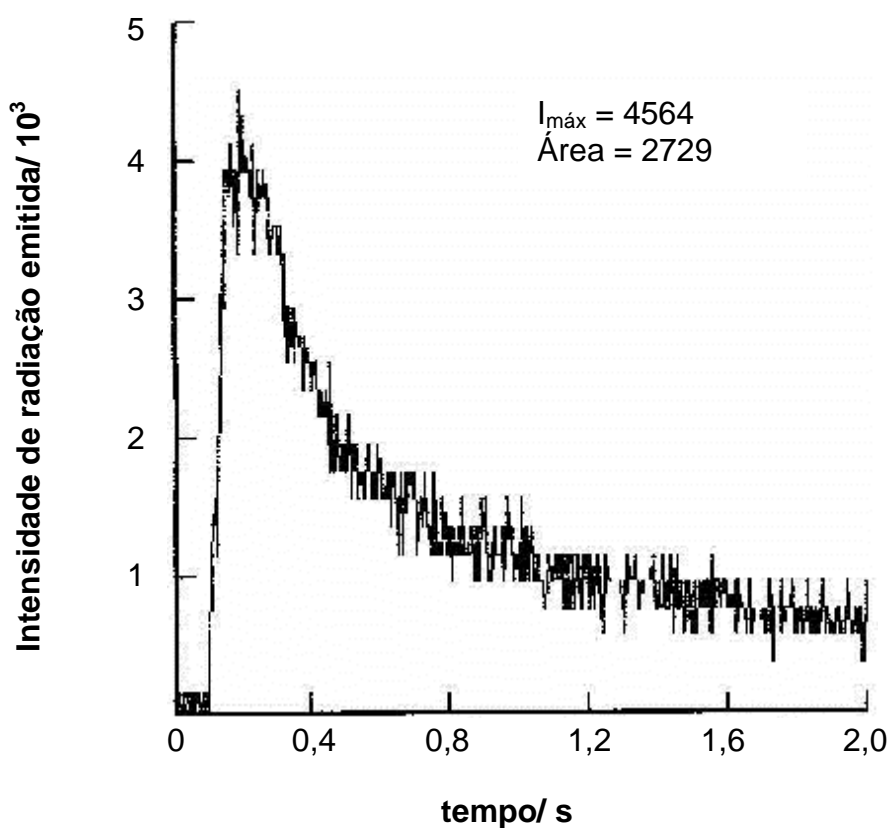


Figura 3.3: Perfil da Intensidade de Radiação Emitida em função do tempo da reação de oxidação de AH Aldrich com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$. No tubo contendo $200\ \mu\text{L}$ de AH $5\ \text{mg L}^{-1}$ foi adicionado inicialmente $100\ \mu\text{L}$ de solução ($\text{CH}_2\text{O}\ 0,44\ \text{mol L}^{-1}$ + $\text{H}_2\text{O}_2\ 0,58\ \text{mol L}^{-1}$) e em seguida $100\ \mu\text{L}$ de solução de NaOH $0,16\ \text{mol L}^{-1}$.

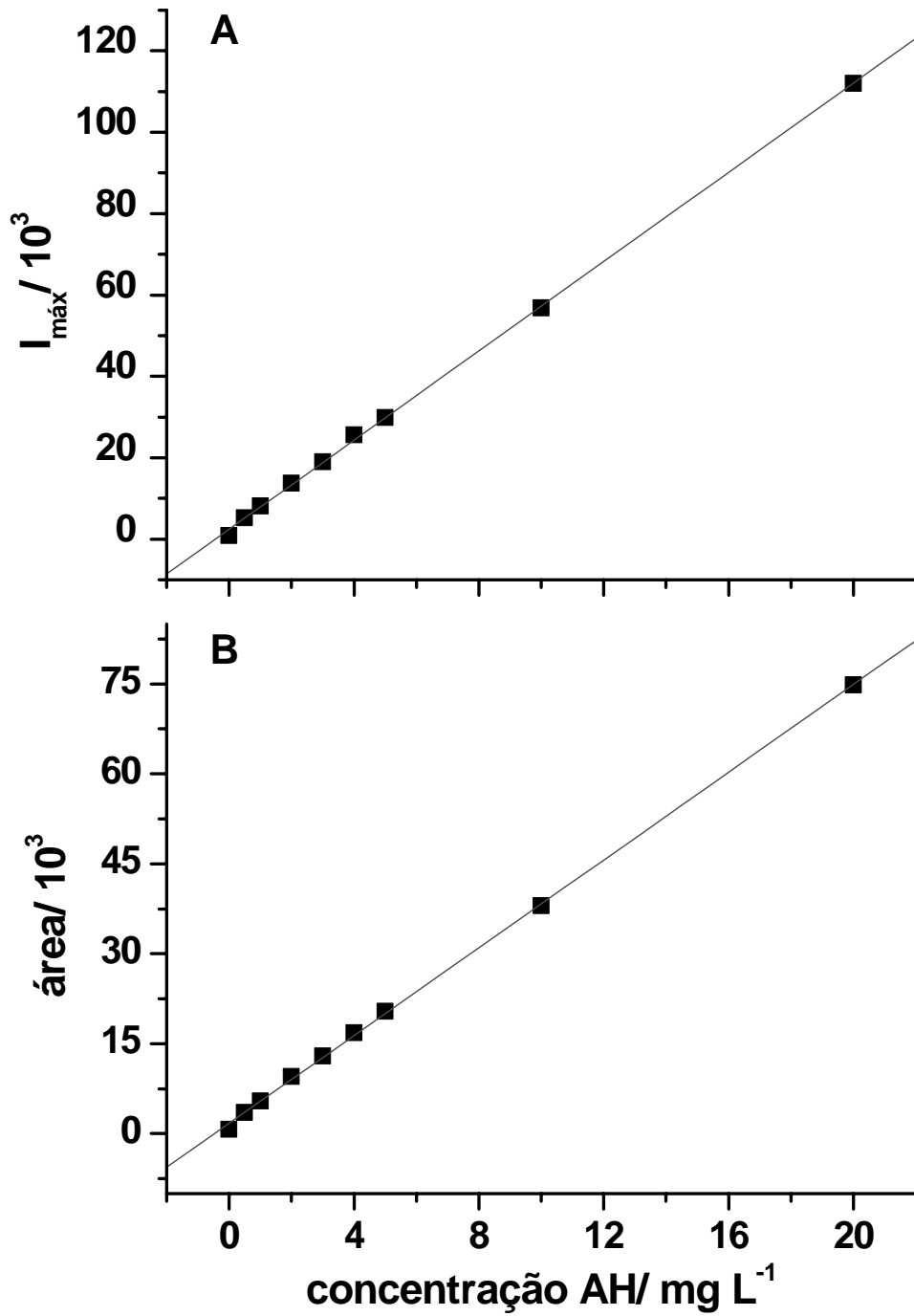


Figura 3.4: Curvas analíticas utilizando-se os valores de $I_{\text{máx}}$ (A) e área (B) em função da concentração de AH Aldrich com o método PMS.

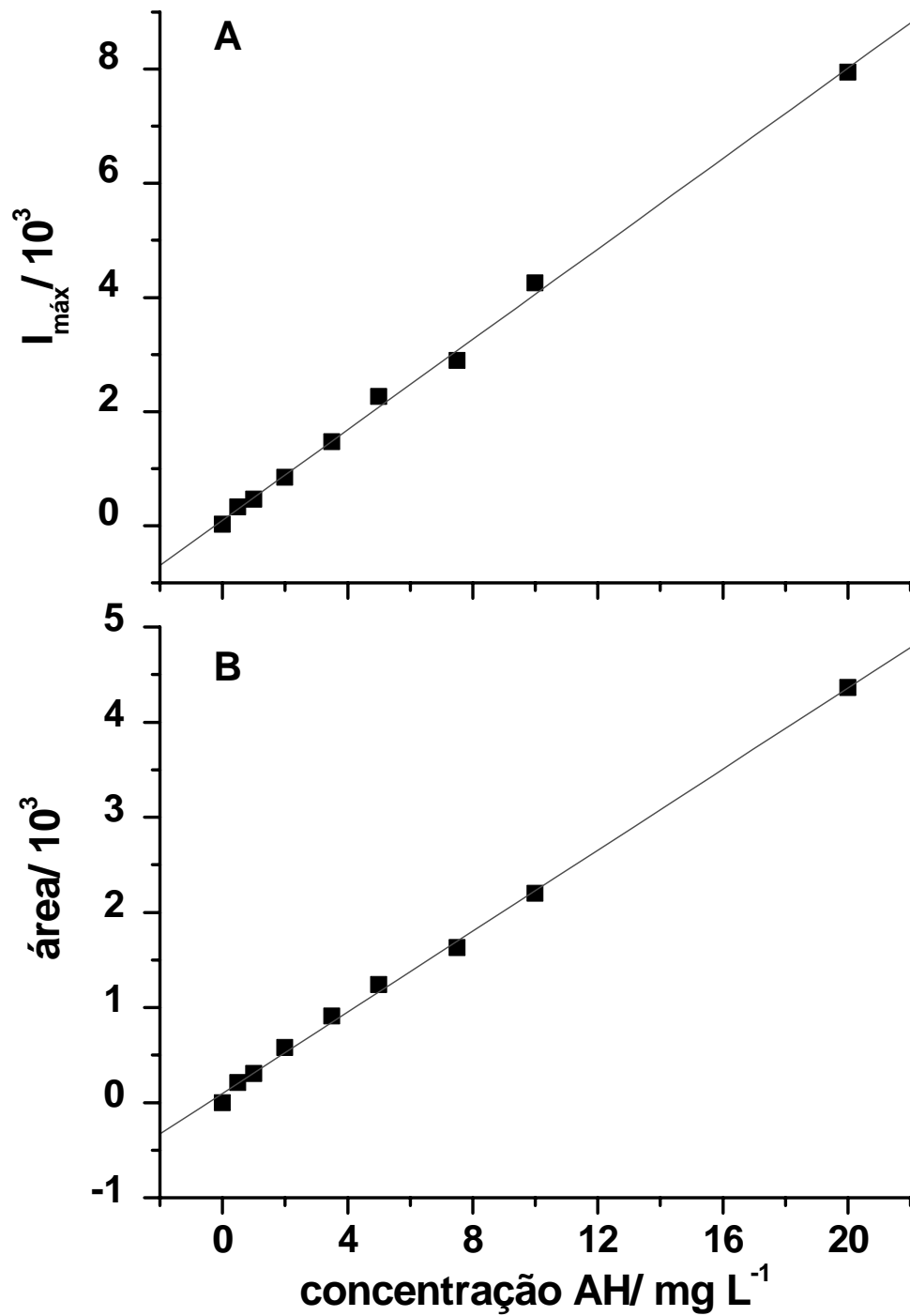


Figura 3.5: Curvas analíticas utilizando-se os valores de $I_{\text{máx}}$ (A) e área (B) em função da concentração de AH Aldrich com o método $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$.

Tabela 3.2: Parâmetros das regressões lineares das curvas analíticas (I_{\max} ou área = $A + M \times [\text{AH Aldrich}]$).

Método		Faixa [AH] /mg L ⁻¹	A/ 10 ³	M/ 10 ³	N	r ²	LD /mg L ⁻¹	DPR
H ₂ O ₂ / CH ₂ O	I_{\max}	0,5 – 20	0,10 ± 0,06	0,40 ± 0,01	9	0,999	0,44	6,4
	área	0,5 – 20	0,10 ± 0,03	0,21 ± 0,01	9	0,999	0,43	8,1
PMS	I_{\max}	0,5 – 20	2,4 ± 0,4	5,5 ± 0,2	9	0,993	0,24	3,9
	área	0,5 – 20	1,8 ± 0,3	3,7 ± 0,1	9	0,998	0,24	1,2

N = número de pontos;

r² = coeficiente de correlação;

LD = limite de detecção;

DPR = desvio padrão relativo para solução de AH 10 mg L⁻¹ (n=5);

M = coeficiente angular;

A = coeficiente linear.

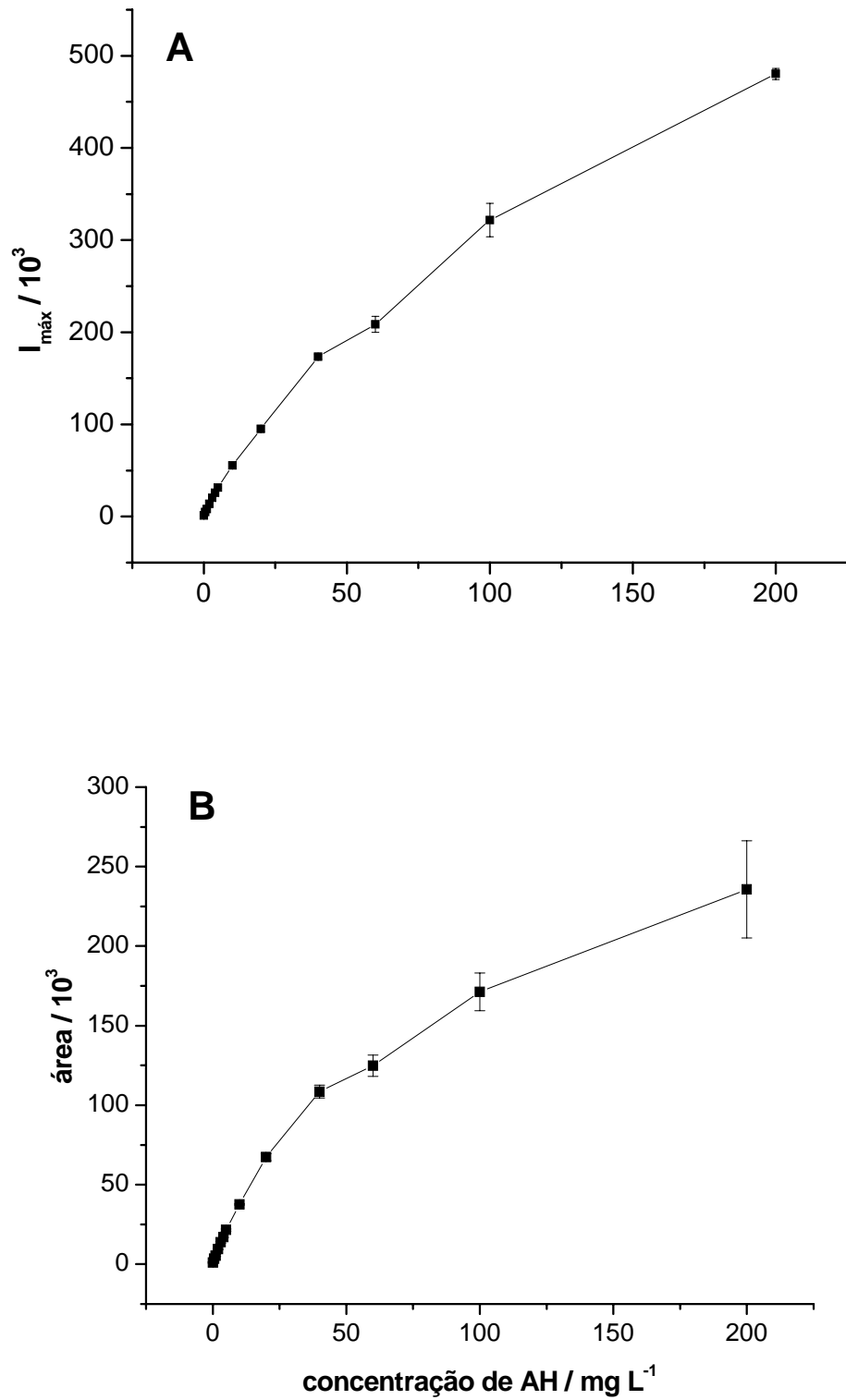


Figura 3.6: Curvas analíticas utilizando-se PMS para avaliar a linearidade de $I_{\text{máx}}$ (A) e área (B) em função da concentração de AH Aldrich.

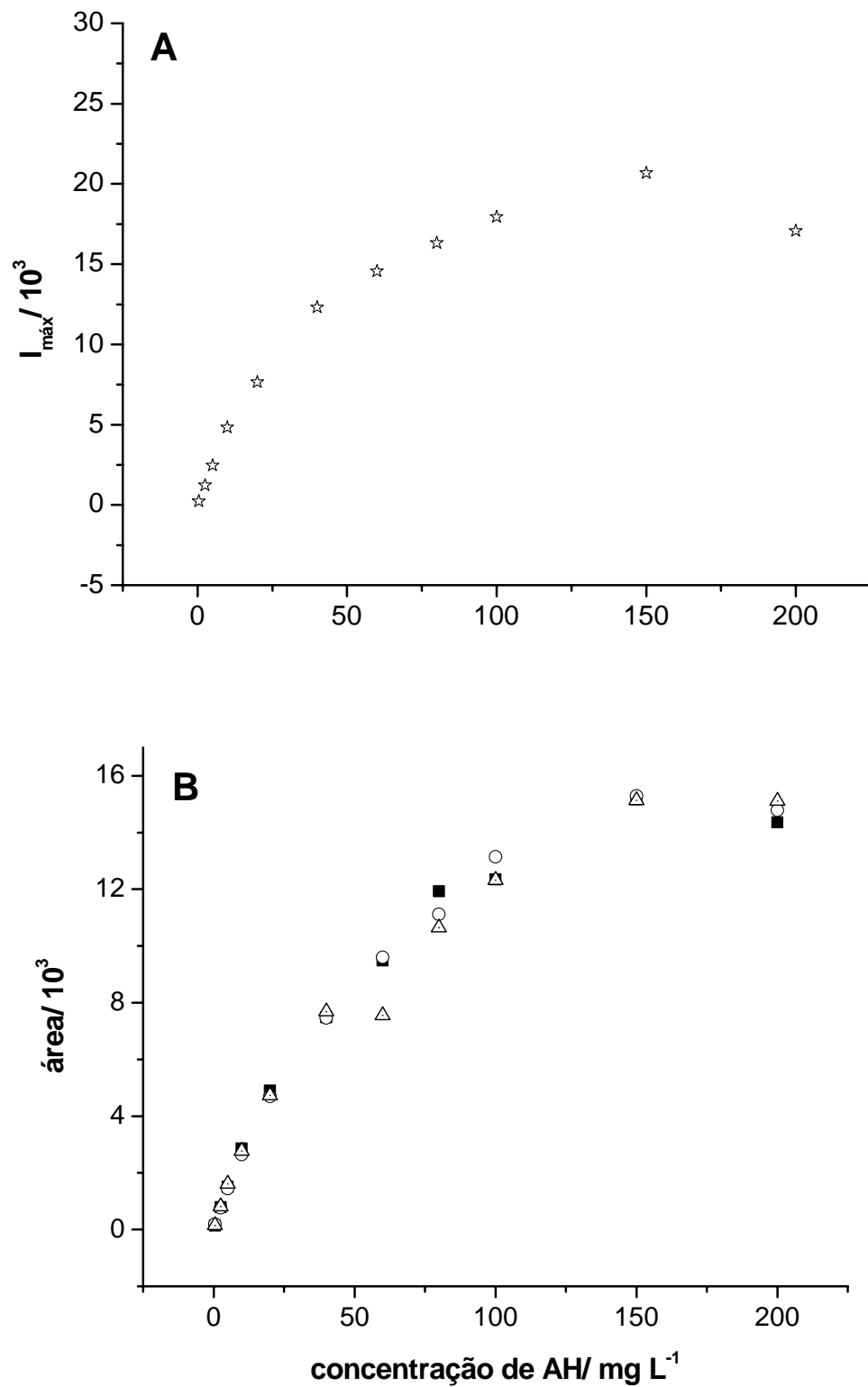


Figura 3.7: Curvas analíticas utilizando-se H₂O₂/ CH₂O para avaliar a linearidade de $I_{\text{máx}}$ (A) e área (B) em função da concentração de AH Aldrich.

O método do PMS apresentou valores melhores de LD e valores maiores de **M** do que o método $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$. Para ambos os métodos as curvas de calibração de $I_{\text{máx}}$ em função da concentração de SH apresentaram maior sensibilidade (valores de **M** maiores) do que as curvas de área (tabela 3.2).

O método $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ apresentou maior desvio padrão relativo (DPR) para uma solução de 10 mg L^{-1} de AH do que o método PMS.

3.3.2. Influência de alguns ânions e cátions no método PMS

A influência de alguns ânions (Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} e CO_3^{2-}) e cátions (Co(II) , Mn(II) , Fe(III) , Cu(II) , Cr(III) e Ca(II)) está apresentada na tabela 3.3. Os cátions foram adicionados como complexos de EDTA para evitar a precipitação de seus hidróxidos. Esses íons foram adicionados a soluções de AH (Aldrich) 1 e 10 mg L^{-1} .

Co(II) e Mn(II) mesmo em concentrações pequenas como $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ aumentaram o sinal de $I_{\text{máx}}$. Os outros íons metálicos e ânions não apresentaram efeito significativo nos valores de $I_{\text{máx}}$ e área em concentrações menores ou iguais às aquelas apresentadas na tabela 3.3 (primeiras linhas).

A maioria destas espécies não deve estar normalmente presente em águas naturais em concentração suficiente para interferir significativamente na determinação de SH, considerando-se o limite de detecção e o desvio padrão. Por outro lado, os íons Fe(III) e Cl^- podem estar presentes em concentrações maiores do que 10 e 50 mg L^{-1} , respectivamente, em algumas amostras de água natural, caracterizando-se, nestes casos, como interferentes na análise de AH, AF e SH.

Tabela 3.3: Efeito de alguns cátions (complexados com EDTA) e ânions (sais de sódio) adicionados à solução de AH Aldrich 1 ou 10 mg L⁻¹.

Espécie adicionada	[cátion ou ânion]/ mg L ⁻¹		Intensidade relativa ^a	
	AH 1 mg L ⁻¹	AH 10 mg L ⁻¹	AH 1 mg L ⁻¹	AH 10 mg L ⁻¹
Co(II)	0,1	0,1	1,0	1,0
	1,0	1,0	2,8	2,2
Mn(II)	0,1	0,01	1,0	1,0
	1,0	1,0	1,6	1,3
Fe(III)	10	10	1,0	1,0
	50	50	1,4	1,3
Cu(II)	200	200	1,0	1,0
	500	500	0,9	0,9
Cr(III)	500	50	1,0	1,0
Ca(II)	200	100	1,0	1,0
EDTA ²⁻	1000	5000	1,0	1,0
Cl ⁻	50	50	1,0	1,0
	5000	5000	1,2	1,3
NO ₃ ⁻	500	5000	1,0	1,0
PO ₄ ³⁻	9000	9000	1,0	1,0
CO ₃ ²⁻	5000	7500	1,0	1,0
	9000	9000	0,7	0,9

^a a intensidade relativa ($I_{máx}$) para soluções de AH 1 ou 10 mg L⁻¹ na ausência de cátions e ânions foi normalizada para 1,0.

OBS: Para cada espécie adicionada, a primeira linha representa a concentração máxima deste cátion ou ânion que não produz alteração no valor de intensidade relativa do AH Aldrich.

3.3.3. Influências do solo de origem e dos procedimentos de extração e purificação na análise de amostras de AH, AF e SH

Foram utilizadas soluções de AH, AF e SH provenientes de solos tipo turfa ou vermicomposto, extraídos e purificados por diferentes processos (tabela 3.1) a fim de avaliar a variação na intensidade de radiação emitida pela reação quimiluminescente estudada, já que esses tratamentos podem levar a substâncias com características estruturais diferentes.

A figura 3.8 mostra que as amostras de ácido húmico TA e Aldrich, de procedências distintas, apresentaram diferentes curvas de calibração. Além disso, as curvas analíticas obtidas utilizando-se as amostras de ácido húmico TB1 e TB2 extraídas com NaOH e Na₄P₂O₇ apresentaram sensibilidades diferentes, que podem ser avaliadas pelos coeficientes angulares das curvas analíticas. Observa-se que as amostras extraídas com Na₄P₂O₇ produziram maior sinal do que as amostras extraídas com NaOH. Provavelmente a extração com Na₄P₂O₇ produziu menor degradação na molécula original do ácido húmico.

Na figura 3.9 confirmaram-se as diferenças no sinal $I_{m\acute{a}x}$ em função do tratamento das amostras de AH provenientes de vermicomposto. A amostra extraída com Na₄P₂O₇ (VA4) também apresentou valores maiores de $I_{m\acute{a}x}$, comparada com a amostra extraída com NaOH (VA1). Além disso, a amostra de ácido húmico não purificada (VA2) apresentou sinal ($I_{m\acute{a}x}$ e área) maior do que a purificada (VA1). A amostra não purificada deve possuir alguns íons (como Co(II), Mn(II), Fe(III) ou Cl⁻) em quantidade suficiente para produzir aumento no sinal obtido. A amostra envelhecida de ácido húmico (VA3) apresentou sinal $I_{m\acute{a}x}$ menor do que as demais, provavelmente devido à decomposição do vermicomposto com o tempo.

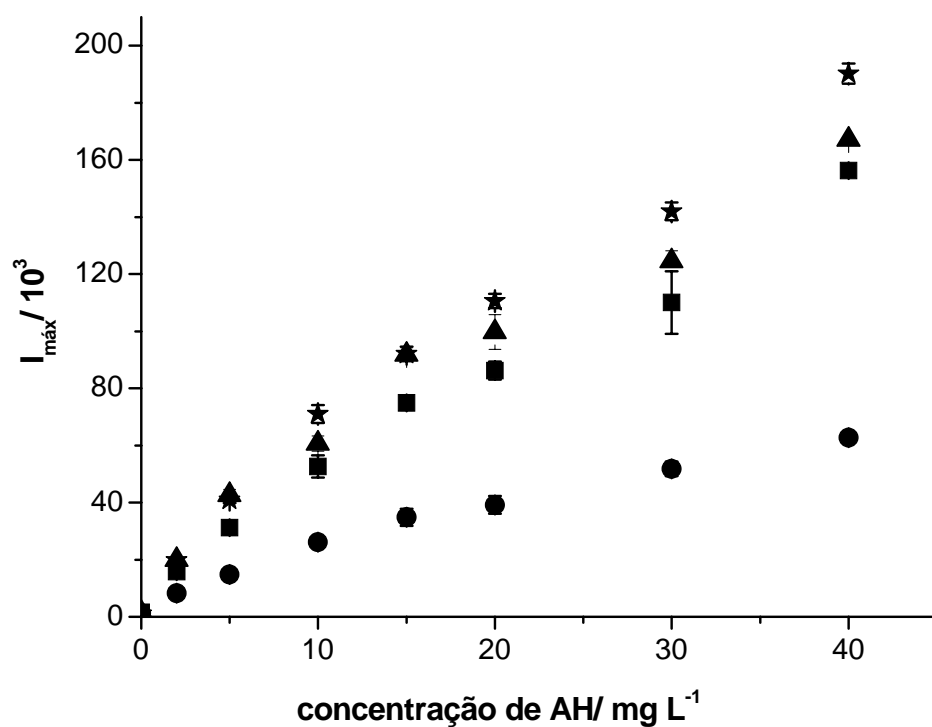


Figura 3.8: Valores de $I_{\text{máx}}$ utilizando-se o método PMS para amostras de AH extraídas de diferentes solos tipo turfa: **TA** com NH_4OH (*); **TB1** com NaOH (●); **TB2** com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (▲) e Aldrich (■).

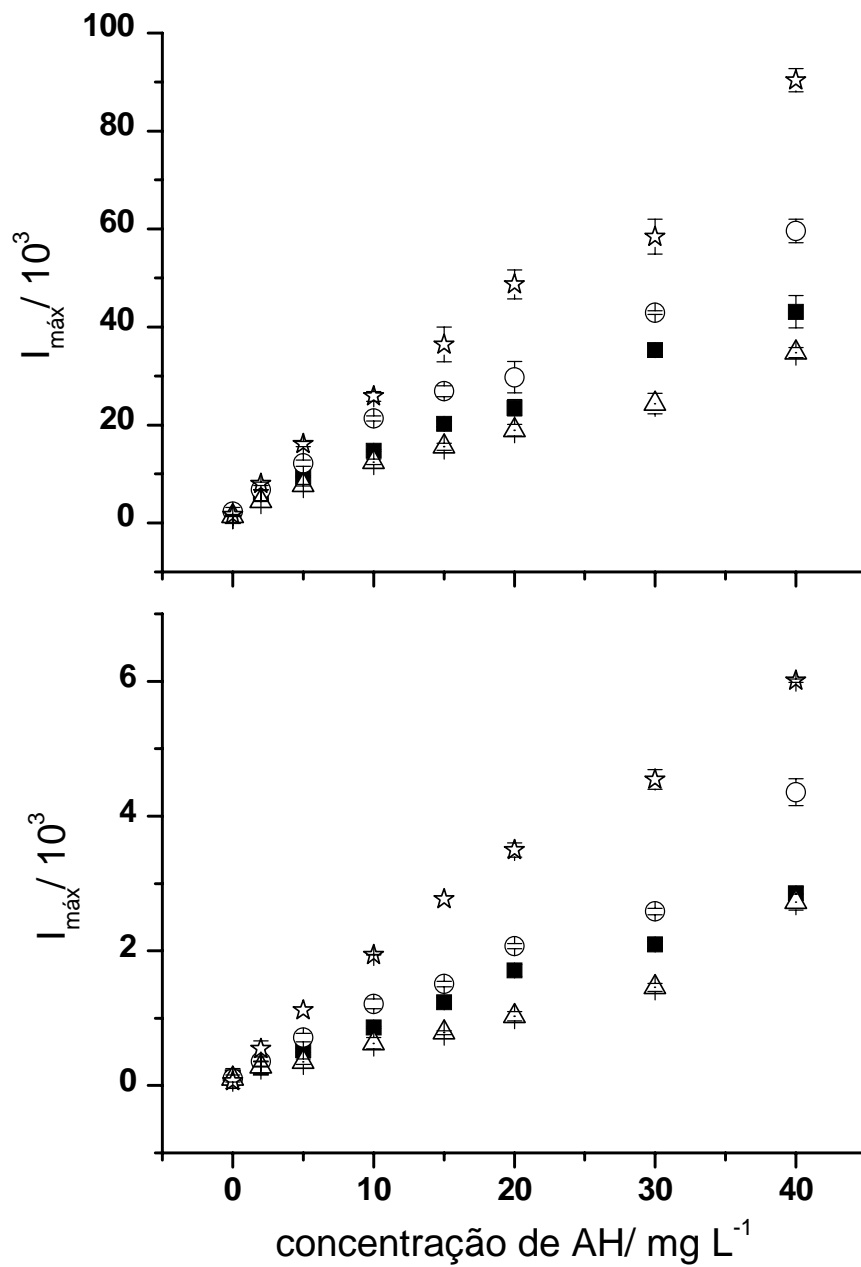


Figura 3.9: Valores de $I_{\text{máx}}$ utilizando-se os métodos PMS (A) e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ (B) para amostras de AH extraídas de mesmo vermicomposto: extraída com NaOH e purificada **VA1** (■); extraída com NaOH sem purificação **VA2** (○); extraída com NaOH após envelhecimento **VA3** (△) e extraída com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ **VA4** (*).

Para uma melhor comparação dos dois métodos, a tabela 3.4 apresenta os valores de $I_{m\acute{a}x}$ e área obtidos para uma mesma concentração de AH, AF e SH (10 mg L^{-1}) utilizando-se as amostras listadas na tabela 3.1 (p.75). Os valores de $I_{m\acute{a}x}$ e área para essas amostras podem diferir significativamente para os métodos PMS e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$.

As amostras de ácido húmico extraídas de solo tipo turfa (TA, TB1 e TB2) apresentam alto teor de carbono (tabela 3.1) e valores de $I_{m\acute{a}x}$ e área elevados (tabela 3.4). Entretanto, a quantidade de carbono das amostras não pode ser diretamente relacionada com os valores de $I_{m\acute{a}x}$ e área, pois algumas amostras com alto teor orgânico apresentaram sinais de $I_{m\acute{a}x}$ e área baixos, como a amostra de ácido húmico VA1.

Soluções de AH e AF extraídos de uma mesma amostra de vermicomposto foram analisadas pelos métodos PMS e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ (figura 3.10 e tabela 3.4). É interessante notar a sensibilidade baixa obtida na análise do ácido fúlvico (VBF) pelo método $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$. Entretanto, com o método PMS, a sensibilidade foi maior na análise de ácido fúlvico (VBF) do que de ácido húmico (figura 3.10A e tabela 3.4). Para a mesma amostra de ácido húmico (VBH) valores maiores de $I_{m\acute{a}x}$ foram obtidos com o método $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ (tabela 3.4 e figura 3.10), enquanto que valores maiores de área foram obtidos para o método PMS (tabela 3.4).

Para o método PMS, o sinal obtido para amostras SH1, SH2 e SH3 foi alto, embora a quantidade de carbono fosse pequena. Provavelmente essas amostras contêm AF em maior quantidade do que AH. Além disso, as amostras não purificadas SH2 e SH3 possuem elevado teor de Cl (tabela 3.1, p. 75), que na forma de cloreto em solução pode produzir aumento no sinal obtido, conforme discutido anteriormente (tabela 3.3, p.89).

Tabela 3.4: Valores de $I_{\text{máx}}$ e área para soluções de AH, AF e SH 10 mg L⁻¹ obtidos pelos métodos PMS e H₂O₂/ CH₂O. Comparação de amostras extraídas de diferentes solos e com tratamentos diversos.

Amostra	PMS		H ₂ O ₂ / CH ₂ O	
	$I_{\text{máx}}/ 10^3$	área/ 10 ³	$I_{\text{máx}}/ 10^3$	área/10 ³
AH - ALD	53 ± 4	61 ± 2	6,0 ± 0,2	3,7 ± 0,1
AH - TA	71 ± 3	60 ± 2	12,6 ± 0,3	7,5 ± 0,3
AH - TB1	26,2 ± 0,5	35,2 ± 0,9	5,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1
AH - TB2	61 ± 3	62 ± 3	9,4 ± 0,1	6,1 ± 0,1
AH - VA1	14,8 ± 0,2	20,8 ± 0,4	0,86 ± 0,01	0,55 ± 0,03
AH - VA2	21,3 ± 0,5	26 ± 1	1,2 ± 0,1	0,86 ± 0,02
AH - VA3 ^a	12,5 ± 0,6	19,0 ± 0,8	0,6 ± 0,1	0,44 ± 0,04
AH - VA4	25,8 ± 0,9	33 ± 2	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1
AH - VBH	73 ± 3	59,4 ± 0,7	92 ± 2	27,0 ± 0,8
AF - VBF	118 ± 3	101 ± 3	6,3 ± 0,2	2,80 ± 0,04
SH1	65 ± 4	55 ± 2	5,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1
SH2	57 ± 5	52 ± 3	12,6 ± 0,2	6,9 ± 0,1
SH3	45 ± 3	37 ± 2	9,2 ± 0,3	5,2 ± 0,1

^a amostra extraída após 6 meses.

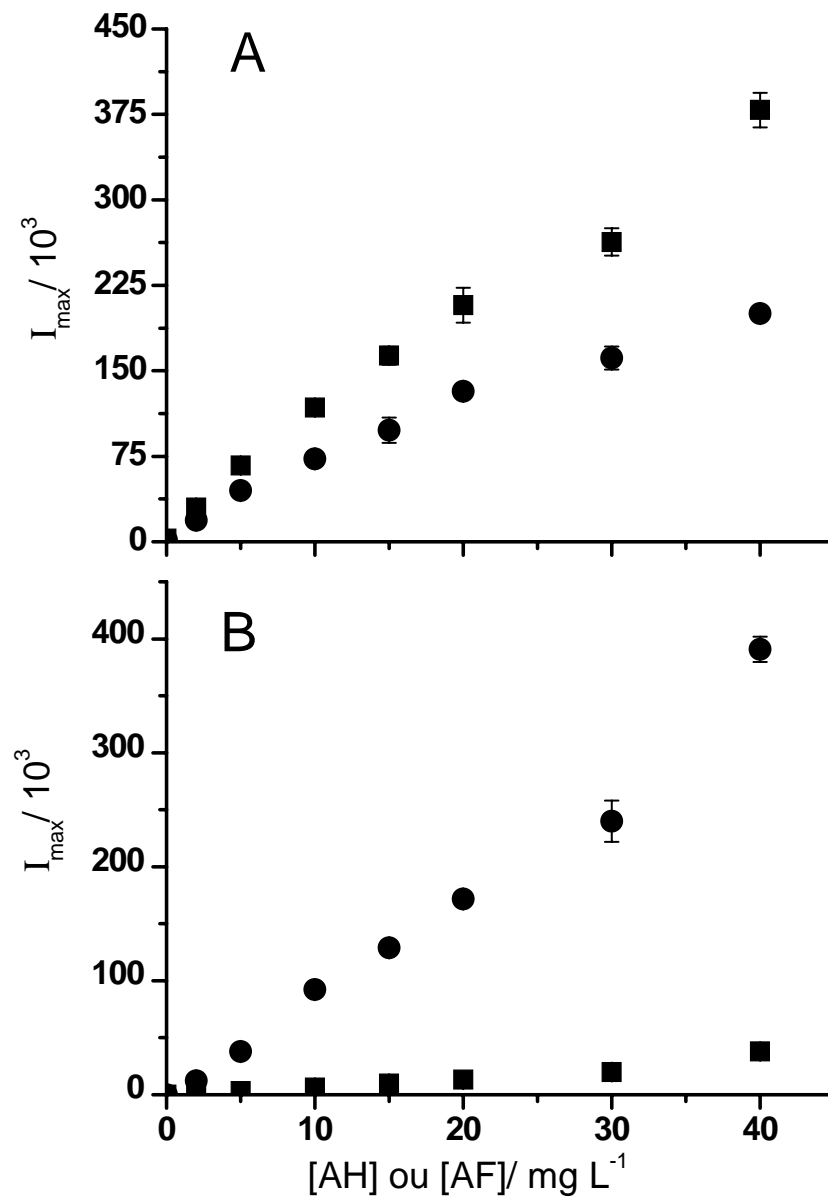


Figura 3.10: Valores de I_{\max} vs. concentrações de AH – VBH (●) e AF – VBF (■). Métodos PMS (A) e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ (B). Amostras de AH e AF extraídas de um mesmo vermicomposto.

3.3.4. Determinação da concentração de AH em amostra de água natural

A determinação da concentração de AH na água do rio Miranda – MS foi realizada pelos dois métodos analíticos estudados, utilizando-se curva analítica obtida com e sem adição de padrão. As curvas de adição de padrão ($I_{\text{máx}}$ ou área em função da concentração de AH) foram obtidas adicionando-se seis incrementos de uma solução padrão (de AH Aldrich) a uma alíquota de mesmo volume da amostra. Cada solução foi então diluída a um volume fixo antes da medição. Os dados apresentados na tabela 3.5 representam a média de três experimentos.

Os valores encontrados com e sem adição de padrão para um mesmo método analítico (PMS ou $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$) foram diferentes. O método PMS deu origem a valores maiores de concentração de AH porque tanto a oxidação de AH como de AF presentes na amostra produziram emissão de radiação. A adição de padrão produziu valores maiores de concentração, indicando a existência de um efeito de matriz.

Ainda que não seja possível confirmar a exatidão do método PMS, concentrações baixas de AH em águas naturais puderam ser detectadas.

3.4. Conclusões

O método analítico desenvolvido empregando PMS apresentou boa sensibilidade, dada pelos valores baixos de limite de detecção obtidos para a amostra de AH Aldrich ($0,24 \text{ mg L}^{-1}$) e os valores relativamente altos de coeficiente angular. Entretanto, a faixa dinâmica do método não foi muito ampla ($0,5$ a 20 mg L^{-1}) e os valores de coeficiente linear obtidos foram elevados, indicando a ocorrência

Tabela 3.5: Determinação da concentração de ácido húmico na amostra do Rio Miranda - MS. Comparação dos resultados obtidos por dois métodos quimiluminescentes.

Curvas analíticas		[AH] encontrado /mg L ⁻¹	
		H ₂ O ₂ / CH ₂ O	PMS
Com adição de padrão	I _{máx}	9,1 ± 0,7	12,3 ± 0,6
	área	9,0 ± 0,5	12,0 ± 0,4
Curva de calibração	I _{máx}	5,6 ± 0,3	6,6 ± 0,1
	área	6,2 ± 0,2	8,05 ± 0,04

de emissão de radiação na ausência de AH devido à decomposição do PMS (equação 3.2).

Comparativamente, o método $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ foi menos sensível, apresentando valores de limite de detecção maiores (aproximadamente $0,40 \text{ mg L}^{-1}$) e menores valores de coeficiente angular. Entretanto, os valores de coeficiente linear foram baixos, indicando que a emissão de radiação na ausência de AH foi bem pequena.

Com o método PMS obteve-se sensibilidade maior na análise de AF do que de AH, enquanto o método $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_2\text{O}$ foi muito mais sensível ao AH.

A sensibilidade dos métodos para AH, AF e SH depende da natureza e dos procedimentos de extração e purificação das amostras, sendo que amostras extraídas com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e/ ou não purificadas apresentaram sinais maiores.

Além disso, a quantidade de carbono das amostras não pode ser diretamente relacionada com os valores de $I_{\text{máx}}$ e área, pois algumas amostras com alto teor orgânico apresentaram sinais de $I_{\text{máx}}$ e área baixos.

Os radicais sulfato e hidroxila podem oxidar os íons cloreto presentes em solução formando OCl^- , HOCl ou Cl_2 . A formação dessas espécies também leva a um aumento da intensidade de radiação emitida conforme verificado nos estudos de efeito de ânions nessa reação. Na tabela 3.3 (p. 89) está representado que $I_{\text{máx}}$ aumenta de 20% quando o ânion cloreto é da ordem de 5000 mg L^{-1} em uma solução de AH (Aldrich) 10 mg L^{-1} .

As determinações da concentração de AH na água do rio Miranda com e sem adição de padrão não apresentaram sensibilidades idênticas neste estudo porque o AH do padrão (Aldrich) e da amostra não devem possuir as mesmas características estruturais. Embora alguns autores (Marino e Ingle Jr, 1981; Kitano *et al.*, 1994 e Michalowski *et al.*, 2001) tenham mostrado valores praticamente idênticos obtidos

por quimiluminescência com curva de calibração e adição de padrão, isso não deve ocorrer sempre, pois o efeito de matriz pode interferir na determinação. A curva de calibração deve ser construída com padrão de AH preparado com características muito similares as da amostra. Assim, Michalowski *et al.* (2001) propuseram a calibração utilizando-se AH extraído da água do rio a ser analisado.

Dos íons estudados, as adições de Co(II) e Mn(II) produziram as alterações mais significativas nos valores de $I_{\text{máx}}$ e área do AH Aldrich. Os aumentos produzidos nos valores de $I_{\text{máx}}$ e área com a adição de Co(II) e Mn(II) foram melhor investigados no capítulo 4, com a finalidade de aprimorar o método analítico proposto.

3.5. Referências Bibliográficas

BALL, D.L. e EDWARDS, J.O., *The kinetics and mechanism of the decomposition of Caro's acid (1)*. Journal of American Chemical Society 78(6), 1125-1129, 1956.

COICHEV, N. e ELDIK, R.V., *Kinetics and mechanism of the sulfite-induced autoxidation of cobalt (II) in aqueous azide medium*. Inorganic Chemistry 30, 2375-2380, 1991.

KAHN, A.U. e KASHA, M., *Physical theory of chemiluminescence in systems evolving molecular oxygen*. Journal of American Chemical Society 88(7), 1574-1576, 1966.

KENNEDY, R.J. e STOCK, A.M., *The oxidation of organic substances by potassium peroxymonosulfate*. Journal of Organic Chemistry 25, 1901-1906, 1960.

KITANO, M.; OGASAWARA, Y.; XINCHENG, H.; TAKENAKA, N.; BANDOW, H. e MAEDA, Y., *Continuous determination of trace amounts of humic acid in natural waters by chemiluminescent method*. Microchemical Journal 49, 265-274, 1994.

LIN, J.M. e YAMADA, M., *Chemiluminescent reaction of fluorescent organic compounds with $KHSO_5$ using cobalt(II) as catalyst and its first application to molecular imprinting*. Analytical Chemistry 72, 1148-1155, 2000.

MAKITA, Y.; UMEBAYASHI, H.; SUZUKI, T.; MASUDA, A.; YAMADA, M. e HOBBO, T., *New analytical chemiluminescence system using peroxymonosulfate as oxidant*. Chemistry Letters 9, 1575-1578, 1993.

MARINO, D.F. e INGLE JR., J.D., *Determination of humic acid by chemiluminescence*. Analytica Chimica Acta 124, 23-30, 1981.

MICHALOWSKI, J.; HALABURDA, P. e KOJLO, A., *Determination of humic acid in natural waters by flow injection analysis with chemiluminescence detection*. Analytica Chimica Acta 438, 143-148, 2001.

ROBARDS, K. e WORSFOLD, P.J., *Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence*. *Analytica Chimica Acta* 266, 147-173, 1992.

SLAWINSKA, D. e SLAWINSKI, J., *Chemiluminescence of humic acids*. *Nature* 213, 902-903, 1967.

SLAWINSKA, D. e SLAWINSKI, J., *Chemiluminescent flow method for determination of formaldehyde*. *Analytical Chemistry* 47 (13), 2101-2109, 1975.

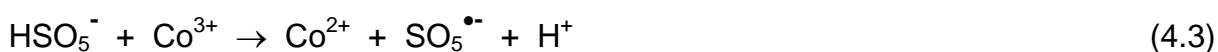
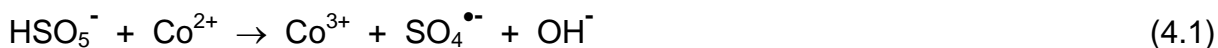
SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. e NIEMAN, T.A., *Princípios de Análise Instrumental* (5ª ed.). Porto Alegre: Bookman, p. 322 e 327, 2002.

TSUKADA, S.; MIKI, H.; LIN, J.M.; SUZUKI, T. e YAMADA, M., *Chemiluminescence from fluorescent organic compounds induced by cobalt (II) catalyzed decomposition of peroxymonosulfate*. *Analytica Chimica Acta* 371, 163-170, 1998.

**CAPÍTULO 4. EFEITO DA ADIÇÃO DE Co(II) E Mn(II) NA REAÇÃO
QUIMILUMINESCENTE DE PEROXOMONOSULFATO COM ÁCIDOS
HÚMICOS E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS**

4.1. Introdução

Conforme mencionado anteriormente, o ânion peroxomonossulfato é um agente oxidante muito forte e se decompõe cataliticamente na presença de metais de transição ou substratos orgânicos produzindo radicais e íons radicalares que também possuem elevados potenciais de redução. A formação destes radicais tem sido identificada por radiólise de pulso óptico com evolução de oxigênio (Lin e Yamada, 2000 e Maruthamuthu e Neta, 1977). Esta decomposição é seguida por emissão de radiação (equação 4.8) devido à formação de O₂, oxigênio singlete (¹O₂), gerado pela decomposição do peroxomonossulfato produzida pelo íon metálico (Makita *et al.*, 1993 e Tsukada *et al.*, 1998). De acordo com a literatura, em meio contendo íons Co(II), as seguintes reações podem acontecer (Anipsitakis e Dionysiou, 2003; Coichev e Eldik, 1991; Lin e Yamada, 2000; Mariano, 1968; Maruthamuthu e Neta, 1977; Stauff *et al.*, 1963; Thompson, 1981; Tsukada *et al.*, 1998; Zhang e Edwards, 1992):





Alguns valores de potenciais de redução do ânion peroxomonossulfato (PMS) e dos radicais $\text{SO}_5^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ e HO^{\bullet} estão apresentados na tabela 4.1.

Neste trabalho a oxidação das substâncias e ácidos húmicos por PMS na presença de íons metálicos Co(II) e Mn(II) foram estudados a fim de avaliar o efeito destes íons metálicos no método analítico para a determinação da concentração de SH e AH.

4.2. Parte Experimental

Detalhes experimentais foram descritos no capítulo 3, p. 73.

A intensidade de radiação emitida foi medida utilizando-se um luminômetro da marca Berthold (modelo Lumat LB 9507). As reações foram realizadas em tubos transparentes de poliestireno com capacidade para 5 mL.

A seqüência de adição de reagentes foi a seguinte: 50 μL de água (branco) ou de solução de AH/ SH + 50 μL de solução de íon metálico 100 mg L^{-1} foram introduzidos no tubo e em seguida foram injetados, 100 μL de solução de peroxomonossulfato de potássio 0,6 mol L^{-1} e logo após 0,7 s, 100 μL da solução NaOH 1,0 mol L^{-1} .

Tabela 4.1: Valores de potenciais de redução(V) vs ENH de algumas espécies.

Espécie	Potencial de redução vs ENH	pH	Referências
$\text{HSO}_5^- / \text{HSO}_4^-$	1,81 – 1,85	-	Spiro, 1979; Steele e Appelman, 1982; Price <i>et al.</i> , 1986; O'Hare <i>et al.</i> , 1985.
$\text{HSO}_5^- / \text{SO}_4^{2-}$	1,75	3-9	Spiro, 1979.
$\text{SO}_5^{2-} / \text{SO}_4^{2-}$	1,22	> 10	Spiro, 1979.
$\text{HSO}_5^- / \text{HSO}_4^-$	1,44	-	Kennedy e Stock, 1960.
$\text{SO}_5^{\bullet-} / \text{HSO}_5^-$	1,1	7	Huie e Neta, 1984.
$\text{SO}_5^{\bullet-} / \text{SO}_5^{2-}$	0,81	-	Anast e Margerum, 1981.
$\text{SO}_3^- / \text{HSO}_3^-$	0,84	3,6	Huie e Neta, 1984.
$\text{SO}_3^{\bullet-} / \text{SO}_3^{2-}$	0,63 – 0,89	> 7	Das <i>et al.</i> , 2001; Huie e Neta, 1984; Anast e Margerum, 1981; Sarala <i>et al.</i> , 1990; Merényi <i>et al.</i> , 1988.
$\text{SO}_4^{\bullet-} / \text{SO}_4^{2-}$	2,43-3,08	-	Stanbury, 1989; Furholz e Haim, 1987
$\text{HO}\bullet / \text{H}_2\text{O}$	2,72	0	Sawyer, 1988
	2,31	7	Sawyer, 1988
	1,77	14	Sawyer, 1988

4.3. Resultados e Discussões

Em alguns testes preliminares (tabela 3.3, p. 89) verificou-se que a presença dos íons Co(II) e Mn(II) na reação de oxidação de AH por PMS aumentaram significativamente a emissão de radiação. Assim, investigações adicionais, descritas a seguir, foram realizadas com a finalidade de melhorar o método analítico proposto.

A figura 4.1 mostra o perfil da intensidade de radiação emitida por uma solução de AH Aldrich com e sem adição dos íons metálicos Co(II) e Mn(II) em função do tempo.

4.3.1. Influência de Co(II) e Mn(II) no método PMS

O aumento nos sinais de área e I_{max} , devido à adição de Co(II) e Mn(II) na forma de complexos de EDTA, foi eficiente quando a concentração de íon metálico é maior do que 1 mg L^{-1} (figura 4.2).

Quando Mn(II) foi adicionado (como EDTA ou sal de cloreto) à solução de AH seguido da adição de PMS e NaOH, observou-se que a solução apresentou coloração rosa intenso após a reação quimiluminescente.

É interessante ressaltar que a adição de Mn(II)EDTA produziu aumento somente nos valores de I_{max} , enquanto os valores de área permaneceram praticamente constantes (figura 4.2).

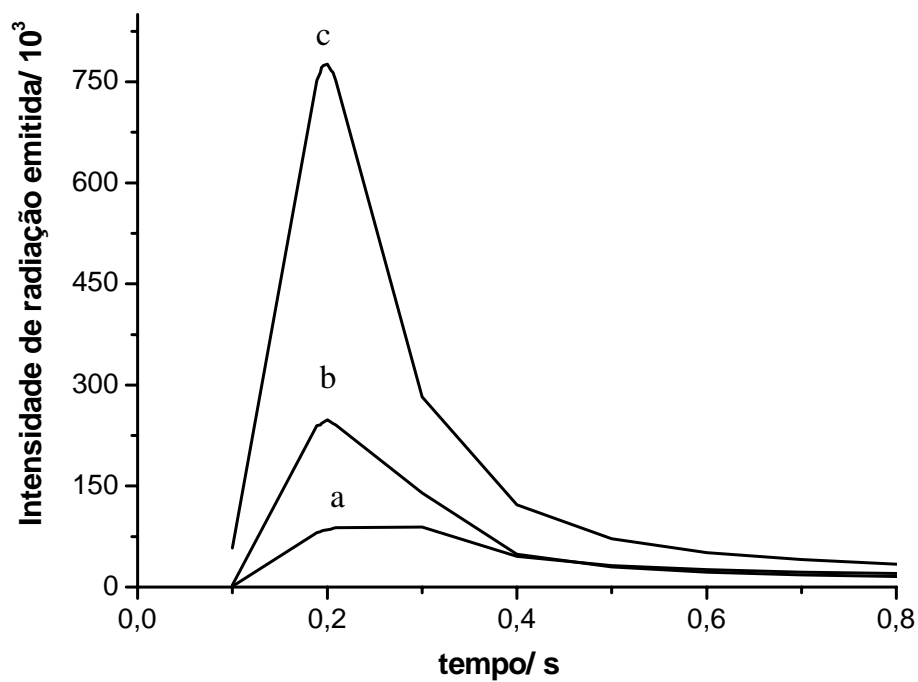


Figura 4.1: Intensidade de radiação emitida após mistura de: 100 μl de AH Aldrich 10 mg L^{-1} (com e sem Mn(II) ou Co(II)/ EDTA)+ 100 μl de PMS $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ + 100 μl de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. a) sem íon metálico, b) com Mn(II)EDTA 50 mg L^{-1} e c) com Co(II)EDTA 50 mg L^{-1} .

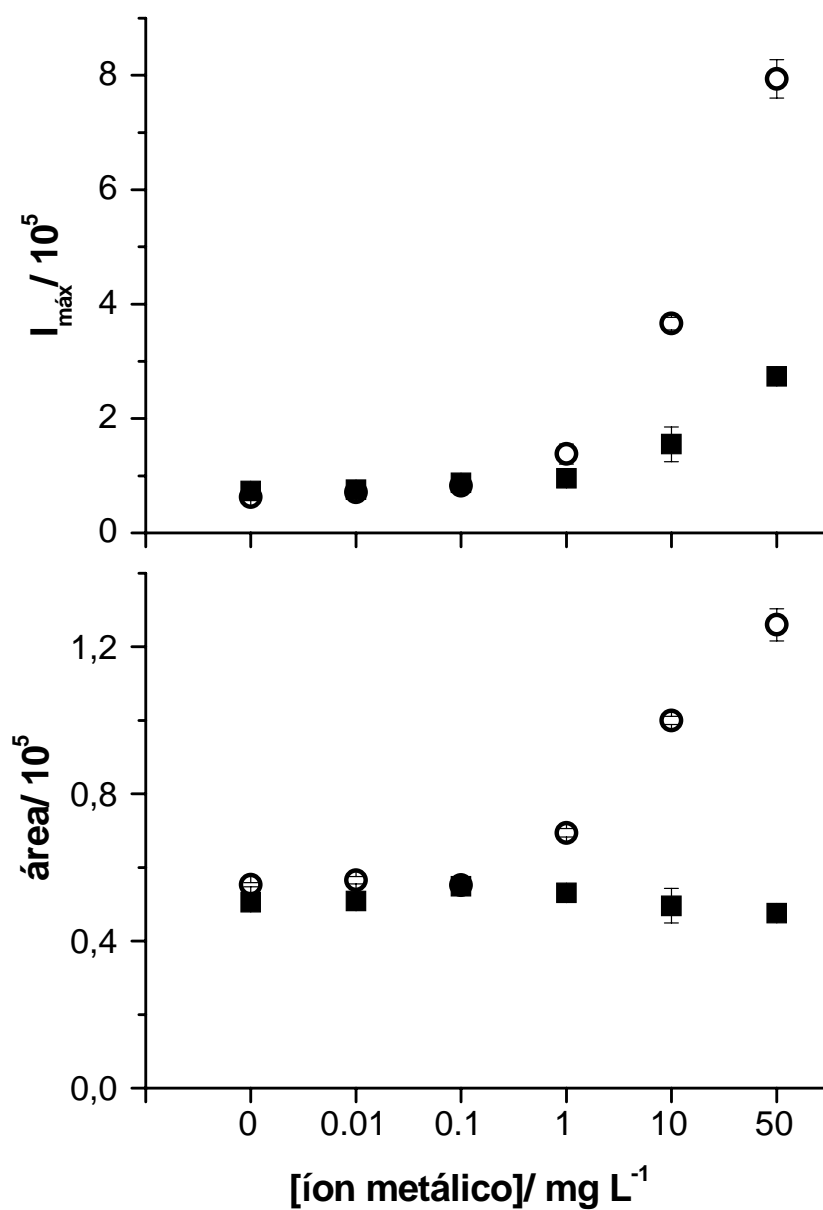


Figura 4.2: Efeito do Co(II) e Mn(II). Sinais obtidos após mistura de: 100 μ L de (AH Aldrich 10 mg L⁻¹ + íon metálico/EDTA) + 100 μ L de PMS 0,6 mol L⁻¹ + 100 μ L de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Co(II) (o) e Mn(II) (■).

Como será amplamente discutido a seguir, Co(II)EDTA é cataliticamente mais ativo do que Mn(II)EDTA, aumentando os valores de $I_{\text{máx}}$ e área.

Os parâmetros das regressões lineares das curvas analíticas de $I_{\text{máx}}$ ou área em função da concentração de AH (ou SH) estão apresentados na tabela 4.2. Os valores de $I_{\text{máx}}$ e área são funções lineares com a concentração de ácido húmico (Aldrich) até 20 mg L^{-1} , curvando em direção à abscissa na faixa de $20\text{-}200 \text{ mg L}^{-1}$.

Para melhor avaliar o aumento de sensibilidade devido à adição de Co(II) e Mn(II) calculou-se m , que foi obtido pela razão dos coeficientes angulares (M) das curvas de calibração na presença e na ausência de Co(II) e Mn(II). Assim, valores de m maiores do que 1 indicam que houve aumento de $I_{\text{máx}}$ e área na presença desses íons metálicos.

Foram realizados experimentos adicionando-se Co(II) ou Mn(II) como complexos de EDTA ou sais de cloreto (tabela 4.2). Estes íons metálicos foram adicionados como complexos para verificar se o EDTA poderia produzir alguma inibição com possível interação desses íons metálicos com AH. Além disso, para evitar a precipitação dos respectivos hidróxidos, já que a reação ocorre somente em meio alcalino.

Os sinais de $I_{\text{máx}}$ e área na ausência de AH (dado pelo coeficiente linear, A , das curvas analíticas) aumentaram com a adição de Co(II) ou Mn(II) (tabela 4.2), mostrando o efeito catalítico destes íons metálicos na decomposição do PMS. No caso da adição de Co(II), a emissão de radiação ocorre devido à formação de oxigênio singlete (equação 4.8).

A adição dos complexos de EDTA produziram valores de $I_{\text{máx}}$ e área maiores do que os respectivos sais de cloreto.

Tabela 4.2: Parâmetros das regressões lineares das curvas analíticas (I_{\max} ou área = $A + M \times [\text{AH Aldrich}]$). Soluções de 50 mg L^{-1} de Co(II) e Mn(II).

Íon metálico		faixa [AH]/ mg L^{-1}	$A/ 10^3$	$M/ 10^3$	m	N	r^2	LD/ mg L^{-1}	DPR
nenhum	I_{\max}	0,5 – 20	$2,4 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,2$	1,0	9	0,993	0,24	3,9
	área	0,5 – 20	$1,8 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,1$	1,0	9	0,998	0,24	1,2
Co(II)EDTA	I_{\max}	2 – 20	114 ± 23	65 ± 2	11,8	6	0,998	1,1	3,5
	área	2 – 20	12 ± 2	$11,2 \pm 0,2$	3,0	6	0,999	0,59	2,4
CoCl ₂	I_{\max}	2 – 20	35 ± 15	54 ± 1	9,8	6	0,999	0,83	1,8
	área	2 – 20	5 ± 2	$9,8 \pm 0,2$	2,6	6	0,999	0,74	2,0
Mn(II)EDTA	I_{\max}	2 – 20	26 ± 9	$21,7 \pm 0,8$	3,9	6	0,998	1,2	3,6
	área	2 – 20	4 ± 2	$3,9 \pm 0,2$	1,1	6	0,997	1,3	2,2
MnCl ₂	I_{\max}	2 – 20	15 ± 10	16 ± 1	2,9	6	0,994	1,9	4,6
	área	2 – 20	3 ± 2	$3,7 \pm 0,2$	1,0	6	0,996	1,5	1,6

m = razão dos valores de coeficientes angulares na presença e na ausência de Co(II) ou Mn(II);

N = número de pontos;

r^2 = coeficiente de correlação;

LD = limite de detecção;

DPR = desvio padrão relativo para solução de AH 10 mg L^{-1} (n=5);

M = coeficiente angular;

A = coeficiente linear.

Observou-se uma grande dispersão nos valores de **A**, principalmente na presença dos íons metálicos e, portanto os valores dos limites de detecção calculados foram maiores, já que o limite de detecção (LD) foi definido como três vezes o desvio padrão do coeficiente linear (A) dividido pelo valor do coeficiente angular (M).

Outro aspecto importante é a variação dos valores de I_{\max} e área como indício da alteração da velocidade e eficiência da reação de oxidação de AH por PMS. Comparando-se os valores dos coeficientes angulares **M** das regressões lineares das curvas analíticas de área e I_{\max} em função da concentração de AH, na ausência e presença de Co(II) e Mn(II), pode-se concluir que a reação é mais rápida (maiores valores de I_{\max}) e mais eficiente (maiores valores de área) na presença de Co(II) do que de Mn(II) (figura 4.1 e 4.2), mesmo porque a adição de Mn(II) não produziu alteração nos valores de área.

4.3.2. Experimentos com substâncias e ácidos húmicos extraídos de solos diferentes

Soluções preparadas com amostras de substâncias e ácidos húmicos extraídos de solos diferentes foram utilizadas neste trabalho a fim de avaliar a influência do Co(II) e Mn(II) na intensidade de radiação emitida. As curvas analíticas foram obtidas empregando-se as amostras de ácidos húmicos VA1, VA2 e de substância húmica SH3 (tabela 3.1, p. 75).

A tabela 4.3 apresenta os parâmetros das regressões lineares das curvas analíticas. Com a adição dos complexos de Co(II) e Mn(II) EDTA, os sinais (I_{\max} e área) foram maiores.

Tabela 4.3: Parâmetros das regressões lineares das curvas analíticas (I_{\max} ou área = $A + x [AH]$). Soluções de 50 mg L^{-1} de Co(II) e Mn(II) adicionadas como complexos de EDTA.

Amostra	Íon metálico		$A/ 10^3$	$M/ 10^3$	m	r^2	LD/ mg L^{-1}	DPR	
AH -VA1	nenhum	I_{\max}	4 ± 2	$1,5 \pm 0,1$	1,0	0,986	4,0	15	
		área	4 ± 2	$1,3 \pm 0,2$	1,0	0,974	4,6	4,8	
	Co(II)	I_{\max}	94 ± 7	$24,1 \pm 0,7$	16,1	0,999	0,87	1,1	
		área	$10 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,1$	3,3	0,999	0,70	4,9	
	Mn(II)	I_{\max}	17 ± 3	$4,9 \pm 0,3$	3,3	0,993	1,8	2,4	
		área	$2,3 \pm 0,3$	$1,45 \pm 0,02$	1,1	0,999	0,62	2,9	
	AH -VA2	nenhum	I_{\max}	4 ± 1	$1,6 \pm 0,1$	1,0	0,990	1,9	6,7
			área	2 ± 1	$1,4 \pm 0,1$	1,0	0,992	2,1	2,3
Co(II)		I_{\max}	89 ± 3	$22,6 \pm 0,3$	14,1	1,00	0,40	7,5	
		área	$8,7 \pm 0,3$	$4,10 \pm 0,03$	2,9	1,00	0,22	2,9	
Mn(II)		I_{\max}	17 ± 2	$4,0 \pm 0,2$	2,5	0,996	1,5	5,2	
		área	$2,1 \pm 0,2$	$1,10 \pm 0,02$	0,8	0,999	0,55	5,0	
SH3		nenhum	I_{\max}	6 ± 3	$3,2 \pm 0,3$	1,0	0,990	2,8	8,5
			área	4 ± 2	$2,5 \pm 0,2$	1,0	0,993	2,4	4,4
	Co(II)	I_{\max}	115 ± 17	49 ± 2	15,3	0,998	1,0	4,3	
		área	$10,4 \pm 0,9$	$7,7 \pm 0,1$	3,1	1,00	0,35	3,1	
	Mn(II)	I_{\max}	15 ± 5	$9,3 \pm 0,4$	2,9	0,997	1,6	2,4	
		área	$1,6 \pm 0,5$	$2,54 \pm 0,05$	1,0	0,999	0,59	0,9	

Faixa [AH] = $2 - 20 \text{ mg L}^{-1}$; número de pontos = 5;

m = razão dos valores de coeficientes angulares na presença e na ausência de Co(II) ou Mn(II);

r^2 = coeficiente de correlação;

LD = limite de detecção;

DPR = desvio padrão relativo para solução de AH 10 mg L^{-1} (n=5);

M = coeficiente angular;

A = coeficiente linear.

Observou-se novamente que a curva analítica depende da natureza da amostra (AH ou SH) da procedência e método de extração e purificação.

Ácidos húmicos provenientes de uma mesma amostra de vermicomposto (chamados de VA1 e VA2) foram extraídos com um mesmo procedimento, mas somente a amostra VA1 foi purificada. Essas amostras produziram curvas analíticas similares, sendo que algumas impurezas presentes na amostra VA2 (não purificada) podem ter interferido no sinal obtido.

A amostra SH3 pode conter ácidos fúlvico e húmico, e conforme descrito no capítulo 3, este método é mais sensível a ácidos fúlvicos do que a ácidos húmicos. Por isso o sinal obtido para SH3 foi alto. Provavelmente essa amostra contém AF em maior quantidade do que AH. E, além disso, como SH3 não foi purificada e apresenta elevado teor de Cl (14,9%, tabela 3.1, p. 75), íons cloreto (e outros íons) em solução podem produzir aumento no sinal obtido.

4.3.3. Determinação da concentração de AH em amostra de água natural

A determinação da concentração de AH na água do rio Miranda – MS foi realizada utilizando-se a curva analítica obtida com AH Aldrich com e sem adição dos complexos de Co(II) ou Mn(II) EDTA. O conteúdo total de AH foi determinado utilizando-se as curvas de I_{\max} ou área em função da concentração de AH. Os dados da tabela 4.4 representam a média de três medições.

Um experimento de recuperação foi realizado adicionando-se à amostra uma quantidade conhecida de AH Aldrich (1 mg L^{-1}). Valores de recuperação de 91 a

Tabela 4.4: Determinação de ácido húmico na amostra do Rio Miranda - MS. Comparação dos resultados obtidos para AH determinado com e sem Co(II)EDTA ou Mn(II)EDTA 50 mg L⁻¹.

Íon metálico	Curva analítica	Valor sem adição de padrão (mg L ⁻¹)	Valor com adição de padrão ^a (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
nenhum	I _{max}	5,0 ± 0,5	6,6 ± 0,4	110
	área	3,8 ± 0,3	5,0 ± 0,3	104
Co(II)	I _{max}	4,3 ± 0,1	4,8 ± 0,1	91
	área	2,9 ± 0,2	3,6 ± 0,1	92
Mn(II)	I _{max}	4,01 ± 0,03	4,9 ± 0,3	98
	área	3,3 ± 0,1	4,6 ± 0,1	107

^a adição de 1 mg L⁻¹ do padrão de AH Aldrich.

110% foram obtidos, enquanto que a concentração de AH obtida para a mesma amostra variou de 2,9 a 6,6 mg L⁻¹. Isto mostra que existe uma diferença significativa nas curvas analíticas obtidas com e sem Mn(II) ou Co(II).

4.4. Conclusões

Destes resultados pode-se concluir que na presença destes íons metálicos a oxidação do AH e a decomposição catalítica do PMS ocorrem simultaneamente, e o ligante do íon metálico (EDTA ou AH) influenciará na eficiência da reação. Na ausência de EDTA estes íons metálicos podem complexar com AH.

O aumento dos valores de $I_{máx}$ e área na presença de Co(II) e Mn(II) pode ser explicado pelas equações 4.1 a 4.12, nas quais o efeito catalítico destes íons metálicos gera espécies fortemente oxidantes ($SO_5^{\bullet-}$, $SO_4^{\bullet-}$, HO^{\bullet}). Essas espécies são responsáveis pela maior oxidação das SH, com subsequente aumento na intensidade de radiação emitida.

O potencial de redução (vs ENH) do peroxomonosulfato depende da acidez do meio (tabela 4.1). Em meio ácido, o potencial de redução do par HSO_5^-/SO_4^{2-} ($E_{HSO_5^-/SO_4^{2-}} = 1,75V$) é um pouco menor do que do Co^{3+}/Co^{2+} ($E_{Co^{3+}/Co^{2+}} = 1,802 V$). Desta forma, alguns estudos da literatura mostraram que HSO_5^- pode oxidar ou reduzir o Co(II) e Co(III), respectivamente (equações 4.2 e 4.3). Lin e Yamada (2000) mostraram que quando Co(III) é usado como catalisador, a redução (equação 4.3) pode ocorrer aumentando a concentração dos radicais $SO_4^{\bullet-}$ ou HSO_5^{\bullet} . Esses radicais formados, por sua vez, podem oxidar o Co(II). Um aspecto importante que deve ser considerado é que o ligante coordenado ao íon cobalto influenciará no seu potencial de redução. Isto pode explicar porque a adição dos complexos de EDTA

com Mn(II) e Co(II) produziram valores maiores de m , ou seja, apresentaram retas com maior coeficiente angular do que os respectivos sais de cloreto.

Outra possibilidade que também deve ser considerada é a oxidação dos íons cloreto formando OCl^- , HOCl ou Cl_2 . A formação dessas espécies também leva a um aumento da intensidade de radiação emitida conforme verificado nos estudos de efeito de ânions nessa reação. Na tabela 3.3 (p. 89) está representado que $I_{\text{máx}}$ aumenta de 20% quando o ânion cloreto é da ordem de 5000 mg L^{-1} em uma solução de AH (Aldrich) 10 mg L^{-1} .

Em todos os experimentos realizados com amostras diferentes de AH ou SH, a adição de Co(II)EDTA ou Mn(II) EDTA produziu um efeito significativo nos valores de $I_{\text{máx}}$ e área, os quais ainda dependem da procedência da amostra. Assim, os parâmetros da curva analítica vão depender da natureza da substância húmica já que ela pode representar amostras com diferentes características. Além disso, nenhuma correlação com a quantidade de carbono da amostra foi possível.

Como foi apresentado no capítulo 3, as determinações da concentração de AH na água do rio Miranda com e sem adição de padrão não apresentaram resultados idênticos. Os valores de concentração de AH na amostra obtidos com e sem adição de Co(II) e Mn(II) também foram diferentes, já que estes íons metálicos podem interagir com AH e PMS mudando os mecanismos da reação com emissão de radiação do AH e a decomposição catalítica do PMS.

4.5. Referências Bibliográficas

ANAST, J.M. e MARGERUM, D.W., *Trivalent copper catalysis of the autoxidation of sulfite. Kinetics and mechanism of the copper(III/II) tetraglycine reactions with sulfite.* Inorganic Chemistry 20, 2319-2326, 1981.

ANIPSITAKIS, G.P. e DIONYSIOU, D.D., *Degradation of organic contaminants in water with sulfate radicals generated by the conjunction of peroxymonosulfate with cobalt.* Environmental Science & Technology 37, 4790-4797, 2003.

COICHEV, N. e ELDIK, R.V., *Kinetics and mechanism of the sulfite-induced autoxidation of cobalt (II) in aqueous azide medium.* Inorganic Chemistry 30, 2375-2380, 1991.

DAS, T.N.; HUIE, R.E. e NETA, P., *Reduction potentials of $SO_3^{\bullet-}$, $SO_5^{\bullet-}$, and $S_2O_6^{\bullet-3}$ radicals in aqueous solution.* Journal of Physical Chemistry A 103, 3581-3588, 1999.

FURHOLZ, U. e HAIM, A., *Kinetics and mechanisms of the reactions of mononuclear and binuclear ruthenium(II) ammine complexes with peroxydisulfate.* Inorganic Chemistry 26, 3243-3248, 1987.

HUIE, R.E. e NETA, P., *Chemical behavior of sulfur trioxide(1-) (SO_3^-) and sulfur pentoxide(1-) (SO_5^-) radicals in aqueous solutions.* Journal of Physical Chemistry 88, 5665-5669, 1984.

KENNEDY, R.J. e STOCK, A.M., *The oxidation of organic substances by potassium peroxymonosulfate.* Journal of Organic Chemistry 25, 1901-1906, 1960.

LIN, J.M. e YAMADA, M., *Chemiluminescent reaction of fluorescent organic compounds with $KHSO_5$ using cobalt(II) as catalyst and its first application to molecular imprinting.* Analytical Chemistry 72, 1148-1155, 2000.

MAKITA, Y.; UMEBAYASHI, H.; SUZUKI, T.; MASUDA, A.; YAMADA, M. e HOBBO, T., *New analytical chemiluminescence system using peroxymonosulfate as oxidant*. Chemistry Letters 9, 1575-1578, 1993.

MARIANO, M.H., *Spectrophotometric analysis of sulfuric solutions of hydrogen peroxide, peroxymonosulfuric acid and peroxydisulfuric acid*. Analytical Chemistry 40, 1662-1667, 1968.

MARUTHAMUTHU, P. e NETA, P., *Radiolytic chain decomposition of peroxomonophosphoric and peroxomonosulfuric acids*. Journal of Physical Chemistry 81, 937- 940, 1977.

MERÉNYI, G.; LIND, J. e SHEN, X., *Electron transfer from indoles, phenol, and sulfite (SO_3^{2-}) to chlorine dioxide (ClO_2)*. Journal of Physical Chemistry 92, 134-137, 1988.

O'HARE, P.A.G.; BASILE, L. e APPELMAN, E.H., *Thermochemistry of inorganic sulfur compounds. V. Peroxymonosulfate revisited: standard molar enthalpies of formation of $\text{KHSO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}(\text{cr})$, $\text{KHSO}_5(\text{cr})$, and $\text{HSO}_5^-(\text{aq})$* . Journal of Chemical Thermodynamics 17, 473-480, 1985.

PRICE, J.S.; TASKER, I.R.; APPELMAN, E.H. e O'HARE, P.A.G., *Thermochemistry of inorganic sulfur compounds IX. Molar heat capacity of $\text{KHSO}_5(\text{cr})$ from 5 to 300 K, and partial molar entropy of $\text{HSO}_5^-(\text{aq})$* . Journal of Chemical Thermodynamics 18, 923-930, 1986.

SARALA, R.; ASHRAFUL I.M.; RABIN, S.B. e STANBURY, D.M., *Aromatic sulfonation by sulfite and the reduction potential of the sulfite radical: oxidation of sulfite by the tetraammine(phenanthroline)ruthenium(II) cation*. Inorganic Chemistry 29, 1133-1142, 1990.

- SAWYER, D.T.**, IN: Oxygen complexes and oxygen activation by transition metals, Martell, A.E., Sawyer, D.T., Eds.; Plenum Press: New York; pp. 131-148, 1988.
- SPIRO, M.**, *The standard potential of the peroxosulphate/ sulphate couple*. *Electrochimica Acta* 24, 313-314, 1979.
- STANBURY, D.M.**, IN: Advances in inorganic chemistry; Strickland, A.G.; Academic Press, Inc.: San Diego; v. 33, pp. 69-138, 1989.
- STAUFF, J.; SCHMIDKUNZ, H. e HARTMANN, G.**, *Weak chemiluminescence of oxidation reactions*. *Nature* 198, 281-282, 1963.
- STEELE, W.Y. e APPELMAN, E.H.**, *The standard enthalpy of formation of peroxymonosulfate (HSO_5^-) and the standard electrode potential of the peroxymonosulfate – bisulfate couple*. *Journal of Chemical Thermodynamics* 14, 337-344, 1982.
- THOMPSON, R.C.**, *Catalytic decomposition of peroxymonosulfate in aqueous perchloric acid by the dual catalysts silver(I) and peroxydisulfate(2-) and by cobalt(II)*. *Inorganic Chemistry* 20, 1005-1010, 1981.
- TSUKADA, S.; MIKI, H.; LIN, J.M.; SUZUKI, T. e YAMADA, M.**, *Chemiluminescence from fluorescent organic compounds induced by cobalt (II) catalyzed decomposition of peroxymonosulfate*. *Analytica Chimica Acta* 371, 163-170, 1998.
- ZHANG, Z. e EDWARDS, J.O.**, *Chain lengths in the decomposition of peroxomonosulfate catalyzed by cobalt and vanadium. Rate law for catalysis by vanadium*. *Inorganic Chemistry* 31, 3514-3517, 1992.

**CAPÍTULO 5. REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DE
PEROXOMONOSULFATO COM ALGUNS COMPOSTOS
ORGÂNICOS**

5.1. Introdução

O ânion peroxomonossulfato pode ser utilizado como agente oxidante de alguns compostos orgânicos como cetonas e fenóis, produzindo uma emissão quimiluminescente (Slawinska e Slawinski, 1967 e Makita et al., 1993).

Os principais grupos orgânicos presentes na estrutura de uma molécula de ácidos húmico e fúlvico são fenóis, polifenóis, ácidos carboxílicos, carbonilas e ácido salicílico. Assim, alguns compostos orgânicos modelo foram oxidados por PMS em meio alcalino na presença e ausência de Co(II), produzindo emissão de luz.

Desta forma pretende-se investigar se essas porções das moléculas de AH e AF podem ser as responsáveis pela produção de quimiluminescência na reação de substâncias húmicas com peroxomonossulfato em meio básico.

5.2. Parte Experimental

Foram utilizados somente reagentes de grau analítico. As soluções foram preparadas diariamente utilizando-se água deionizada purificada com o sistema Milli-Q Plus Water System (Millipore).

A tabela 5.1 apresenta os compostos orgânicos estudados e suas principais características.

A seqüência de adição de reagentes foi a seguinte: 100 μL de água (branco) ou de solução do composto orgânico (com ou sem 50 mg L^{-1} de Co(II)EDTA) foram introduzidos no tubo e foram injetados, primeiramente, 100 μL de solução de peroxomonossulfato de potássio 0,6 mol L^{-1} e logo após 0,7 s, 100 μL da solução NaOH 1,0 mol L^{-1} .

Tabela 5.1: Principais características físico-químicas dos compostos orgânicos estudados.

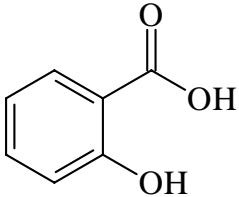
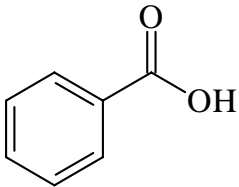
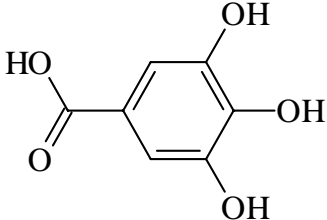
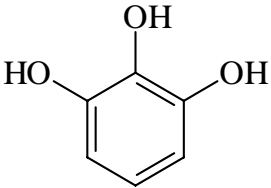
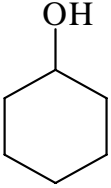
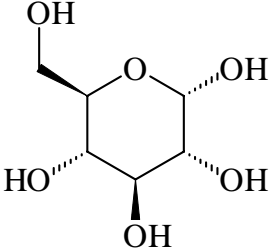
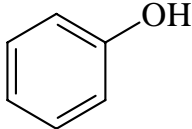
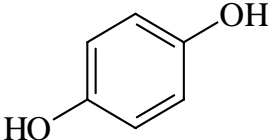
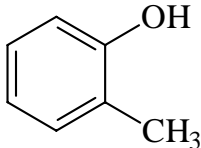
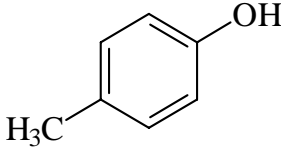
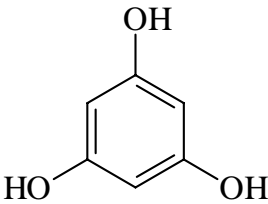
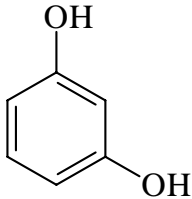
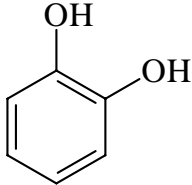
Nomenclatura	Fórmula Estrutural	Massa molecular (g/mol)	d (g/cm ³)	Solubilidade (g/ 100ml de H ₂ O)
Ácido salicílico		138,12	1,44	-
Ácido benzóico		122,12	1,08	0,34
Ácido gálico ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico		170,12	1,69	Parcialmente solúvel
Ácido pirogálico ou 1,2,3- benzenotriol		126,11	1,453	65
Ciclohexanol ou 1-ciclohexanol		100,16	0,962	3,6
d-glucose ou dextrose		180,16	1,54	-

Tabela 5.1: Continuação.

Nomenclatura	Fórmula Estrutural	Massa molecular (g/mol)	d (g/cm ³)	Solubilidade (g/ 100ml de H ₂ O)
Fenol ou hidroxibenzeno		94,11	1,07	8,28
Hidrazina ou diamina	$\text{H}_2\text{N}—\text{NH}_2$	32,04	-	miscível
Hidroquinona ou 1,4-dihidroxibenzeno		110,11	1,332	7
o-cresol ou 1-hidroxi, 2-metilbenzeno		108,14	1,048	< 0,1
p-cresol ou 1-hidroxi, 4-metilbenzeno		108,14	1,034	< 0,1
Floroglucinol ou 1,3,5-benzenotriol		126,11	-	-
Resorcinol ou 1,3-dihidroxibenzeno		110,11	1,27	110
Catecol ou Pirocatecol ou 1,2-dihidroxibenzeno		110,11	-	solúvel

5.3. Resultados e Discussões

Foram realizados experimentos com alguns compostos orgânicos modelo (tabela 5.2) sob as mesmas condições utilizadas para os ácidos húmicos. Os resultados foram expressos como a área integrada sob a curva de intensidade vs. tempo (tabela 5.2 e figuras 5.1 e 5.2) em função da concentração do orgânico em mg L^{-1} . Dentro da faixa de concentração estudada para cada composto, escolheu-se um valor de concentração para o qual representou-se o tempo de reação e a área obtida.

Nos experimentos em que a área apresentou uma relação linear com a concentração do composto orgânico, os valores de limite de detecção foram calculados. Especialmente na presença de Co(II)EDTA , os valores de LD obtidos foram maiores devido aos valores elevados do desvio padrão dos coeficientes lineares e dos coeficientes angulares. Mesmo assim, concentrações baixas de compostos orgânicos puderam ser detectadas.

Como as concentrações das AH e AF foram expressas em mg L^{-1} , também nestes experimentos esta unidade de concentração foi escolhida ao invés de mol L^{-1} .

Na tabela 5.2 também estão apresentados os dados obtidos com amostras de ácido húmico (Aldrich-ALD e VBH) e de ácido fúlvico (VBF), sendo que VBH e VBF são AH e AF extraídos de um mesmo vermicomposto (tabela 3.1, p.75). Lembrando que para uma mesma concentração (10 mg L^{-1}) o valor de área obtido para a amostra VBF de ácido fúlvico foi maior do que a do ácido húmico (VBH), o que significa que este método é mais sensível a AF do que a AH, como apresentado nos capítulos 3 e 4.

Tabela 5.2: Parâmetros das reações quimiluminescentes de alguns compostos orgânicos com PMS.

Espécie	faixa /mg L ⁻¹	Conc. /mg L ⁻¹	sem Co(II)EDTA			com Co(II)EDTA			m
			tempo reação /s	área /10 ⁴	LD/mg L ⁻¹	tempo reação /s	área /10 ⁴	LD/ mg L ⁻¹	
AH Aldrich	0,5-20	10	0,6	6,1	0,24	0,2	12,8	0,59	3,0
AH - VBH *	2,0-40	10	0,5	6,0	6,0	-	-	-	-
AF - VBF *	2,0-40	10	0,7	10,1	0,53	-	-	-	-
Fenol	100-1000	250	150	13,5	66	2,8	0,16	292	0,011
Catecol	1,6-50	12,5	50	1,0	4	0,2	0,61	-	-
Resorcinol	1,6-50	25	120	5,1	5,4	0,33	1,4	3,3	0,10
Hidroquinona	10-100	20	17,5	1,2	6,5	0,2	5,2	-	-
Ácido pirogálico	1,6-50	12,5	0,2	3,1	3,8	0,2	6,2	4,1	1,7
Floroglucinol	1,6-50	12,5	16	140	2,3	0,2	7,6	4,7	0,034
p-cresol	1,6-50	12,5	50	4,2	4,1	0,2	1,3	10	0,082
o-cresol	1,6-100	50	60	20,6	3	2,0	12,6	3,5	0,34
Ciclohexanol	6,3-100	25	0,6	0,56	46	0,2	11,3	46	53
Ácido benzóico	125-1000	500	3	0,54	137	0,5	1,5	211	2,0
Ácido salicílico	6,3-100	12,5	30	2,0	18	0,2	0,87	7,4	0,5
Ácido gálico	12,5-100	50	30	2,2	12,5	0,2	3,8	18,8	1,5
D-glucose	156-5000	1000	9	0,55	115	0,2	7,0	-	-
Hidrazina	250-2500	750	6	1,3	-	0,2	1,1	-	-

* ácidos húmico e fúlvico extraídos de um mesmo vermicomposto.

Conc. = concentração do composto orgânico na qual foram obtidos os valores de tempo de reação e área.

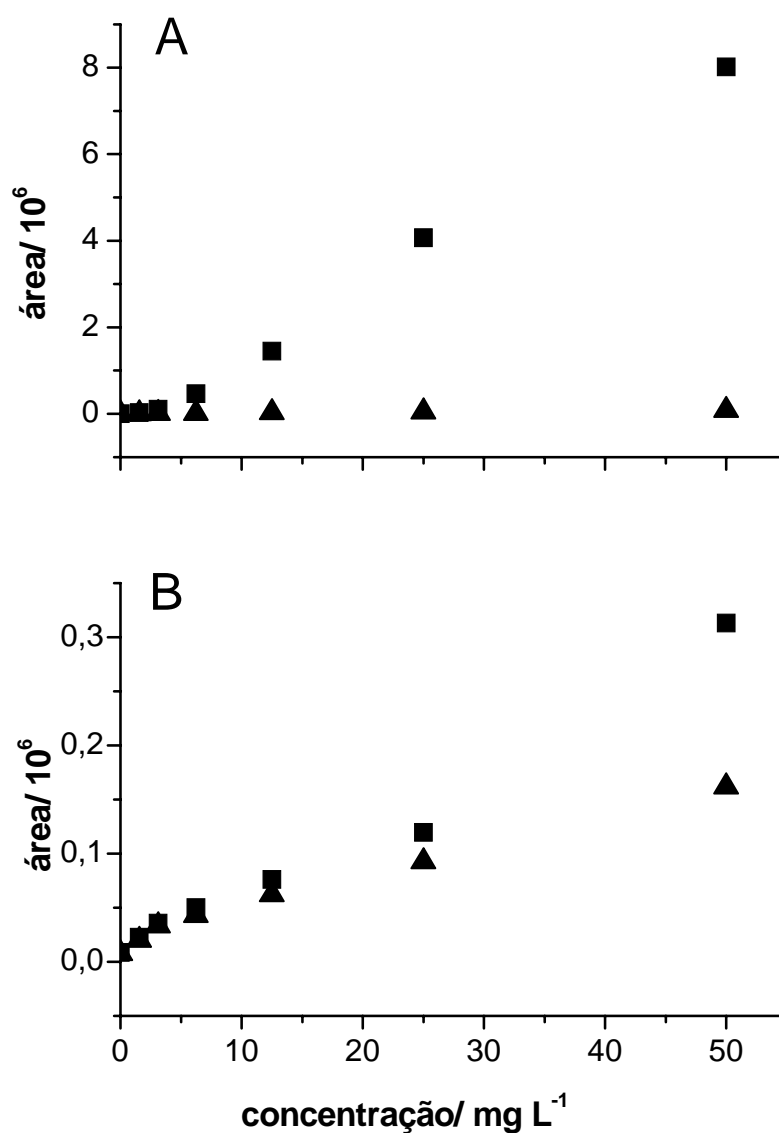


Figura 5.1: Área em função da concentração de alguns compostos orgânicos modelo (A) sem e (B) com Co(II)/EDTA. Sinais obtidos após mistura de: 100 μL de composto orgânico (sem ou com Co(II)/EDTA 50 mg L^{-1}) + 100 μL de PMS 0,6 mol L^{-1} + 100 μL de NaOH 1,0 mol L^{-1} . Floroglucinol(■) e ácido pirogálico (▲).

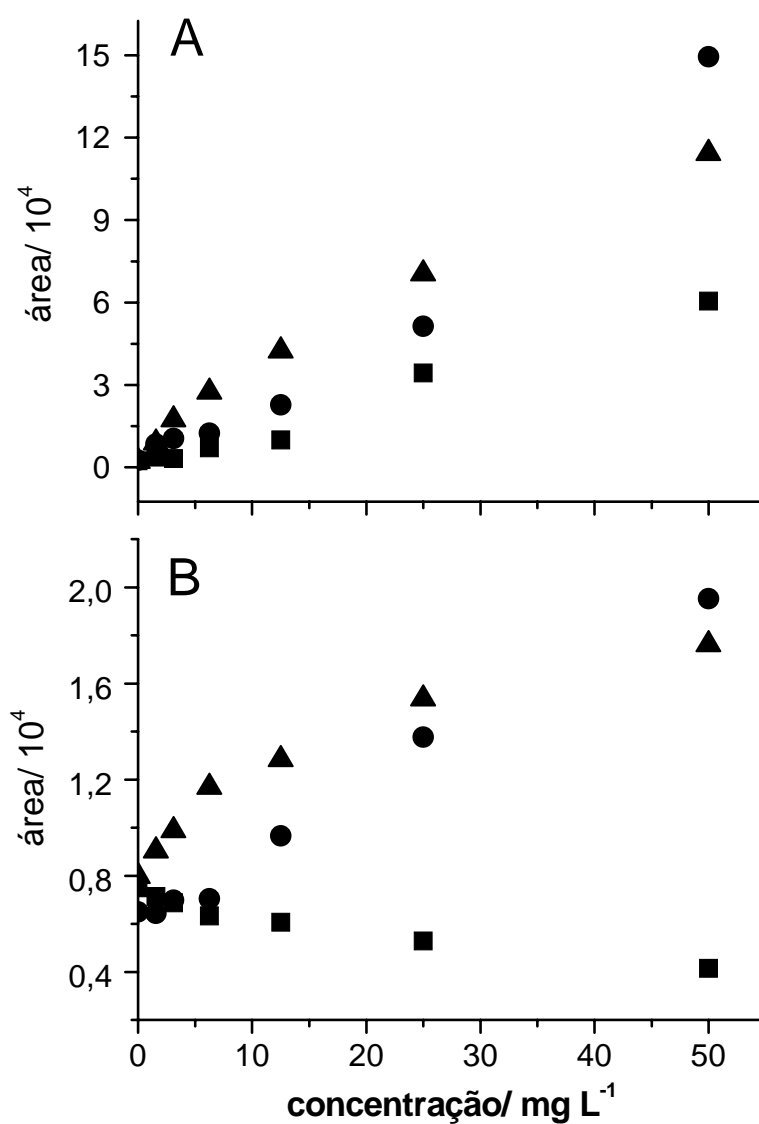


Figura 5.2: Área em função da concentração de alguns compostos orgânicos modelo (A) sem e (B) com Co(II)/EDTA. Sinais obtidos após mistura de: 100 μ L de composto orgânico (sem ou com Co(II)/EDTA 50 mg L⁻¹) + 100 μ L de PMS 0,6 mol L⁻¹ + 100 μ L de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Catecol(■), resorcinol (●) e p-cresol (▲).

5.3.1. Ausência de complexos de Co(II)EDTA

Na ausência de complexos de Co(II), os valores de área obtidos com soluções aquosas de fenol, ácido benzóico, D-glucose e hidrazina, em concentrações menores que 100 mg L^{-1} , foram muito pequenos (tabela 5.2). Entretanto os polifenóis, em concentrações mais baixas ($1 - 100 \text{ mg L}^{-1}$) produziram sinais significativos e os valores de área seguiram aproximadamente a ordem: floroglucinol >> ácido fúlvico > ácido húmico > resorcinol > ácido pirogálico > catecol > hidroquinona (figuras 5.1A e 5.2A), apesar das concentrações estarem representadas em mg L^{-1} e não mol L^{-1} .

A substituição em meta do grupo hidroxila (resorcinol) apresentou maiores sinais de área e tempo de reação do que a substituição em orto (catecol), possivelmente devido às propriedades eletrofílicas do grupo hidroxila (Marino e Ingle Jr, 1981; Kitano *et al.*, 1994). Considerando os fenóis trissubstituídos, o floroglucinol originou um sinal de área muito maior do que o ácido pirogálico (figura 5.1), sendo que para uma concentração de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$, o tempo de reação para o floroglucinol (16s) foi maior do que para o ácido pirogálico (0,2s) (tabela 5.2).

Comparando com o fenol, a adição de grupos metila (um doador de elétrons) aumentou a reatividade. Por exemplo, p e o- cresol em concentrações baixas ($1,6 - 100 \text{ mg L}^{-1}$) apresentaram sinais muito maiores do que o fenol ($100 - 1000 \text{ mg L}^{-1}$). Para e orto cresol também apresentaram reatividades aproximadamente iguais as do resorcinol e catecol (figura 5.1). Considerando as faixas de concentrações estudadas, a adição de um grupo carboxílico (sacador de elétrons) ao fenol também produziu aumento da reatividade (ácido salicílico > ácido gálico >> fenol), enquanto o ácido benzóico foi menos reativo que o fenol (tabela 5.2). A área obtida para o ciclohexanol foi significativa em concentrações baixas (6 a 100 mg L^{-1}).

5.3.2. Presença de complexos de Co(II)EDTA

A tabela 5.2 e as figuras 5.1 e 5.2 também apresentam os resultados obtidos utilizando-se PMS na presença de Co(II)EDTA. Em geral, para uma mesma concentração de composto orgânico, o tempo de reação foi muito pequeno, cerca de 0,2 s, pois a decomposição do PMS catalisada por íons Co(II) é muito rápida, conforme equações 4.1 a 4.12 (p. 101 e 102). De fato mesmo na ausência do composto orgânico, o PMS na presença de Co(II) produz uma emissão de radiação de duração de 0,2 s, devido à formação do oxigênio singlete (equação 4.8, p. 101).

Para melhor avaliar o aumento de sensibilidade devido à adição de Co(II) calculou-se m , que é dado pela razão dos coeficientes angulares (M) das curvas de calibração obtidas na presença e na ausência de Co(II). Os valores de área aumentaram ($m > 1$) na presença de Co(II) somente para ciclohexanol, AH, ácido benzóico, ácido gálico e ácido pirogálico. Os valores de m seguiram a seguinte ordem: ciclohexanol > AH > ácido benzóico > ácido gálico > ácido pirogálico.

Comparando-se a área do ciclohexanol em concentrações baixas (6 – 100 mg L⁻¹) na presença e na ausência de Co(II)EDTA, o efeito da adição do íon metálico é muito mais evidente ($m = 53$).

5.4. Conclusões

A sensibilidade do método foi boa para a determinação de polifenóis, dado pelos valores limites de detecção obtidos com e sem Co(II). Esta reação quimiluminescente poderia ser utilizada no desenvolvimento de método analítico para a determinação da concentração de polifenóis.

Como polifenóis e fenóis associados a grupos carboxílicos existem na estrutura de substâncias húmicas, essas porções da molécula devem ser as responsáveis pela produção de quimiluminescência na reação com peroxomonossulfato em meio básico.

A literatura apresenta alguns estudos da reação quimiluminescente de compostos orgânicos modelo, embora menos abrangentes que o presente trabalho. Alguns resultados similares foram obtidos, especialmente para polifenóis, utilizando-se os oxidantes: permanganato (Marino e Ingle Jr, 1981), peróxido de hidrogênio na presença de formaldeído (Kitano *et al.*, 1994) e N-bromosuccinamida (Michalowski *et al.*, 2001).

Como na decomposição do PMS catalisada por Co(II) há a formação de radicais ($\text{SO}_5^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ e HO^\bullet), a diminuição nos valores de área que ocorreu com alguns compostos orgânicos poderia ser interpretada como uma reação de supressão desses radicais, característica de alguns álcoois.

5.5. Referências Bibliográficas

KITANO, M.; OGASAWARA, Y.; XINCHENG, H.; TAKENAKA, N.; BANDOW, H. e MAEDA, Y., *Continuous determination of trace amounts of humic acid in natural waters by chemiluminescent method*. Microchemical Journal 49, 265-274, 1994.

MAKITA, Y.; UMEBAYASHI, H.; SUZUKI, T.; MASUDA, A.; YAMADA, M. e HOBBO, T., *New analytical chemiluminescence system using peroxymonosulfate as oxidant*. Chemistry Letters 9, 1575-1578, 1993.

MARINO, D.F. e INGLE JR., J.D., *Determination of humic acid by chemiluminescence*. Analytica Chimica Acta 124, 23-30, 1981.

MICHALOWSKI, J.; HALABURDA, P. e KOJLO, A., *Determination of humic acid in natural waters by flow injection analysis with chemiluminescence detection*. Analytica Chimica Acta 438, 143-148, 2001.

SLAWINSKA, D. e SLAWINSKI, J., *Chemiluminescence of humic acids*. Nature 213, 902-903, 1967.

**CAPÍTULO 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS
E CONCLUSÕES**

6.1. Considerações finais

O ânion PMS (HSO_5^-) apresenta muitas qualidades, as quais tem levado à sua aplicação em diversos processos industriais, na formulação de produtos comerciais, no desenvolvimento de métodos analíticos e no tratamento de efluentes industriais. Entre essas vantagens, podemos citar: elevado poder oxidante, estabilidade do seu sal de origem em solução, existência em solução em uma ampla faixa de pH (1-9), o seu uso produz menos danos ao meio ambiente (do que Cl_2 ou ClO^-), é inodoro e dissolve-se facilmente em água.

A decomposição de PMS na presença de íons metálicos leva à formação de radicais como $\text{SO}_5^{\bullet-}$, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ e HO^\bullet . Anipsitakis e Dionysiou (2004) mostraram que o Co(II) é o melhor catalisador para essa decomposição, comparado com Ag(I) , Ce(III) , Fe(III) , Fe(II) , Mn(II) , Ni(II) , Ru(III) e V(III) . No processo catalisado pelo íon Co(II) , observaram que o radical sulfato livre é a espécie preferencialmente formada, enquanto que na presença dos íons Mn(II) o radical sulfato se coordena ao íon metálico, reduzindo a sua reatividade.

Alguns autores sugeriram que o radical sulfato é mais seletivo na oxidação de substratos orgânicos do que o radical hidroxila, sendo que $\text{SO}_4^{\bullet-}$ reage preferencialmente por transferência de elétrons (Neta *et al.*, 1988). Parece que a estrutura do substrato a ser oxidado afeta mais a reatividade do radical sulfato do que do hidroxila (Anipsitakis e Dionysiou, 2004).

No presente estudo não foi verificada a extensão da oxidação de substâncias húmicas ou compostos orgânicos (descritos no capítulo 5) pelo PMS. No entanto, de acordo com estudos de Anipsitakis e Dionysiou (2003), o 2,4-diclorofenol na presença de PMS e Co(II) em pH 7 foi 98% transformado em vários produtos, dos quais 90% resultou em CO_2 e H_2O . Estudos adicionais desse grupo de pesquisa

(Anipsitakis *et al.*, 2006) mostraram que os principais produtos da oxidação do fenol por PMS, foram quinona, catecol, hidroquinona e enxofre molecular (S_8). Verificaram também que os íons cloreto presentes em solução reagiram com os radicais sulfato formando radical cloro, o qual pode reagir diretamente com o composto orgânico ou formar espécies cloradas que também participam nas reações de transformação do substrato.

6.2. Conclusões finais

Ambas as técnicas luminescentes estudadas, fluorimetria e quimiluminescência, são sensíveis na detecção de AH e SH, sendo a fluorimetria menos sensível, até porque parte da radiação emitida pela molécula de ácido húmico é perdida devido à existência de um monocromador antes da detecção na fotomultiplicadora.

O método apresentado para a determinação dos valores das constantes de estabilidade condicional (K) e capacidade complexante (Cc) de SH com íons metálicos empregando titulação fluorimétrica é simples e rápido (já que não necessita da utilização de outra técnica complementar) e sensível na detecção de AH, embora o modelo de cálculo apresente algumas limitações de uso (p.63).

Neste trabalho apresentou-se um novo método analítico baseado na oxidação quimiluminescente de substâncias húmicas por peroxomonosulfato em meio básico. O método proporciona uma boa alternativa na determinação da concentração de AH, pois é simples, a reação é rápida e apresenta boa sensibilidade, dada pelos valores de limite de detecção baixos, considerando a curva analítica obtida com AH Aldrich ($0,24 \text{ mg L}^{-1}$).

Em todos os experimentos realizados com AH ou SH, a adição de Co(II)EDTA ou Mn(II)EDTA aumentou significativamente os valores de $I_{\text{máx}}$ e área, sem produzir melhoria no método analítico, já que os limites de detecção calculados na ausência (LD $0,24 \text{ mg L}^{-1}$) foram maiores do que na presença destes íons metálicos ($0,59$ e $1,3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente).

Conforme descrito nos capítulos 3 e 4, p. 96 e 115, o método analítico proposto apresenta problemas no que se refere à natureza da amostra de AH, AF e SH. A sensibilidade do método depende da natureza e dos procedimentos de extração e purificação das amostras, sendo que amostras extraídas com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e/ ou não purificadas apresentaram sinais maiores.

Nas reações de oxidação quimiluminescente de alguns polifenóis com PMS obtiveram-se as intensidades de radiação mais significativas, ou seja, maiores valores de área. Entretanto, os limites de detecção obtidos para o floroglucinol e ácido pirogálico foram maiores do que os do AH e AF. Isto pode ser explicado pelo elevado desvio padrão dos valores de coeficientes lineares (A) das curvas analíticas destes polifenóis (dado não apresentado).

Polifenóis e fenóis associados a grupos carboxílicos existentes na estrutura de substâncias húmicas devem ser as porções da molécula responsáveis pela produção de quimiluminescência na reação com peroxomonosulfato em meio básico.

A reação quimiluminescente de PMS com substratos orgânicos, com ou sem adição de Co(II), tem possível aplicação no desenvolvimento de outros métodos analíticos (como na determinação da concentração de polifenóis ou tanino) e no tratamento de efluentes industriais.

6.3. Referências Bibliográficas

ANIPSITAKIS, G.P. e DIONYSIOU, D.D., *Degradation of organic contaminants in water with sulfate radicals generated by the conjunction of peroxymonosulfate with cobalt*. Environmental Science & Technology 37, 4790-4797, 2003.

ANIPSITAKIS, G.P. e DIONYSIOU, D.D., *Radical generation by the interaction of transition metals with common oxidants*. Environmental Science & Technology 38, 3705-3712, 2004.

ANIPSITAKIS, G.P.; DIONYSIOU, D.D. e GONZALEZ, M.A., *Cobalt-mediated activation of peroxymonosulfate and sulfate radical attack on phenolic compounds. Implications of chloride ions*. Environmental Science & Technology 40, 1000-1007, 2006.

NETA, P.; HUIE, R.E. e ROSS, A.B., *Rate constants for reactions of inorganic radicals in aqueous-solution*. Journal of Physical and Chemical Reference Data 17(3), 1027-1284, 1988.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome Giselle Baratti Magdaleno
Nascimento 28/05/1979 - São Paulo/SP - Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/ TITULAÇÃO

1994 - 1997 Curso técnico em Química.
Colégio Técnico Oswaldo Cruz, São Paulo, Brasil

1999 - 2002 Graduação em Química Bacharel.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

1999 - 2003 Graduação em Química Licenciatura.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2003 - atual Doutorado em Química (Química Analítica) [SP-Capital].
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Alguns estudos da fluorescência e quimiluminescência de substâncias húmicas
Orientadora: Nina Coichev
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2003-2005) – processo: 04/14609-8

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2001 - 2002 Iniciação Científica.
Instituto de Química - Universidade de São Paulo, São Paulo.
Título: Medições de luminescência em rocha (espeleotemas) e em amostras de água em cavernas.
Orientadora: Nina Coichev

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Processo: 00/14697-3

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2006 - Atual Especialista em Laboratório, Centro de Pesquisas de Águas Subterrâneas
Instituto de Geociências – Universidade de São Paulo

PUBLICAÇÕES

Artigos completos publicados em periódicos

1. MAGDALENO, Giselle Baratti, COICHEV, Nina
Effect of cobalt (II) and manganese (II) on the chemiluminescent reaction of peroxymonosulfate with humic acid and some organic compounds. Analytical Applications. Analytical Letters, v.40, p.585 - 600, 2007.
2. MAGDALENO, Giselle Baratti, COICHEV, Nina
Chemiluminescent determination of humic substances based on the oxidation by peroxymonosulfate. Analytica Chimica Acta. , v.552, p.141 - 146, 2005.
3. CRUZ JR, Francisco Willian da, KARMANN, Ivo, MAGDALENO, Giselle Baratti, COICHEV, Nina, VIANNA JR, Oduvaldo
Influence of hydrological and climatic parameters on spatial-temporal variability of fluorescence intensity and DOC of karst percolation waters in the Santana Cave System, Southeastern Brazil. Journal of Hydrology, v.302, p.1 - 12, 2005.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

1. MAGDALENO, Giselle Baratti, COICHEV, Nina.
Reação quimiluminescente de substâncias húmicas com KHSO₅. Aplicações analíticas In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói.
Anais do 13º Encontro Nacional de Química Analítica. , 2005.

2. MAGDALENO, Giselle Baratti, COICHEV, Nina.
Influência de alguns íons metálicos na fluorescência de soluções de ácidos húmicos In: 12º Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, São Luís.
Anais do 12º Encontro Nacional de Química Analítica. , 2003. p.EM-016

3. MAGDALENO, Giselle Baratti, COICHEV, Nina, CRUZ JR, Francisco Willian da, KARMANN, Ivo, VIANNA JR, Oduvaldo
Medições de luminescência em rocha (espeleotemas) e em amostras de água em cavernas In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas.
Anais da 25ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. , 2002.