



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO, POR TENSÃO SUPERFICIAL E
FLUORESCÊNCIA, DAS PROPRIEDADES
SURFACTANTES DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
SUA INFLUÊNCIA NA SOLUBILIDADE DE HPAs
EM MEIO AQUOSO.**

Thalita Grando Rauen

Florianópolis
Santa Catarina - Brasil
Dezembro, 2005.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO, POR TENSÃO SUPERFICIAL E
FLUORESCÊNCIA, DAS PROPRIEDADES
SURFACTANTES DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
SUA INFLUÊNCIA NA SOLUBILIDADE DE HPAs
EM MEIO AQUOSO.**

Thalita Grando Rauen

Orientadora: Dr^a Maria Marta de Souza Sierra

Tese submetida à
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do grau de Doutora em Química

Florianópolis
Santa Catarina - Brasil
Dezembro, 2005.

THALITA GRANDO RAUEN

**ESTUDO, POR TENSÃO SUPERFICIAL E
FLUORESCÊNCIA, DAS PROPRIEDADES
SURFACTANTES DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E SUA
INFLUÊNCIA NA SOLUBILIDADE DE HPAs EM MEIO
AQUOSO**

Esta Tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutora em
Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 20 de dezembro de 2005.

Prof. Dr. Faruk Nome Aguilera
Diretor do Programa de Pós-Graduação
em Química UFSC

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich
Relator
UFPR

Prof^a. Dr^a. Maria Marta de Souza Sierra
Orientadora
UFSC

Prof. Dr. Marcelo Giovanela
UCS

Prof^a. Dr^a. Vera F. Bascuñan
UFSC

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz
UFSC

Prof. Dr. Luiz Augusto dos S. Madureira
UFSC

*Ao **AMOR**,
força mágica e verdadeira
que nos liga
a Deus, aos outros e à natureza.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Maria Marta de Souza Sierra pelo incentivo, confiança, paciência, dedicação e, principalmente, por seu exemplo.

Aos Profs. Nito A. Debacher, Luiz Augusto dos S. Madureira e Vera Lúcia A. Frescura pelos materiais e aparelhos emprestados, e pelas frutíferas discussões.

Ao Prof. Antonio S. Mangrich por sua colaboração como relator, a aos membros da banca examinadora.

Aos Profs. que tive a honra de conhecer neste departamento, pelo conhecimento que me foi transmitido.

À Andreia Neves Fernandes, Rafael G. Silva e Luciano Tormen pela parceria e amizade.

Ao Jadir e à Graça por todos os favores prestados.

Aos funcionários da Central de Análises e da Biblioteca pelo apoio à pesquisa.

Aos queridos colegas dos laboratórios 214 e 216 por seu companheirismo e pelos bons momentos de descontração.

À Marina, minha filha amada, por sua presença, paciência e amor.

Àquele que amo que, com seu amor, esteve ao meu lado me incentivando a nunca desistir.

Ao meu pai e irmãs pela força e união.

À querida Tia Rose, pelo colo e por acreditar em mim, e à minha avó pelo encorajamento.

Aos *Mestres* de todas as esferas pela proteção.

Ao NEMAR pelo fornecimento das amostras.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Química.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS.	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO.	1
1.1. Origem e classificação das substâncias húmicas	1
1.2. Distribuição das substâncias húmicas na natureza	3
1.3. Extração e purificação das substâncias húmicas.	4
1.4. Importância das substâncias húmicas	5
1.5. Aspectos estruturais das substâncias húmicas.	6
1.6. Interações entre as substâncias húmicas e compostos orgânicos.	11
1.7. Tensoatividade das substâncias húmicas.	13
1.8. Espectroscopia de fluorescência	15
1.8.1. Sondas fluorescentes	17
1.9. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	18
1.10. Poluição aquática.	19
2. OBJETIVOS	21
3. AMOSTRAGEM	22
3.1. Áreas de estudo.	22
3.1.1. Lagoa do Peri.	22
3.1.2. Manguezal de Ratoles	23
3.1.3. Mar Virado	24
3.2. Coleta de sedimentos.	25
3.3. Designação das amostras	25
4. PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1. Materiais	28
4.1.1. Solventes e reagentes	28

4.1.2. Resinas	28
4.2. Extração das substâncias húmicas	28
4.3. Caracterização química e espectroscópica das amostras	31
4.4. Preparo das soluções.	31
4.5. Medidas de tensão superficial	32
4.6. Medidas de fluorescência	33
4.7. Influência das substâncias húmicas na solubilidade de HPAs em água.	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Análise elementar	36
5.2. Espectroscopia de infravermelho	38
5.3. Fatores que afetam a tensão superficial das soluções de substâncias húmicas.	42
5.3.1. Tensão superficial vs. concentração de ácidos húmicos	42
5.3.2. Variação da tensão superficial com pH	45
5.3.3. Efeito da força iônica sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos em diferentes valores de pH	48
5.3.4. Efeito da adição de compostos orgânicos apolares sobre a tensão superficial das soluções de substâncias húmicas	50
5.4. Fatores que afetam a fluorescência do pireno em soluções de ácidos húmicos	57
5.4.1. Estudo da interação pireno-substância húmica através da análise da razão I_1/I_3	57
5.4.2. Características espectrais de fluorescência do pireno em diferentes condições de estudo.	60
5.4.2.1. Em presença de substância húmica.	60
5.4.2.2. Em presença de substância húmica e sal.	66
5.5. Influência da presença de substância húmica na disponibilidade do pireno em soluções aquosas.	69
6. CONCLUSÕES.	74
7. BIBLIOGRAFIA	76
8. ARTIGOS E TRABALHOS EM EVENTOS	85

RESUMO

As substâncias húmicas (SH) são os principais constituintes da fração orgânica em águas naturais, sedimentos e solos. As interações físicas e químicas entre SH e outros componentes, naturais ou não, podem afetar o pH e o potencial redox de solos, sedimentos e águas, controlar a concentração, a biodisponibilidade e o transporte de metais traço e compostos orgânicos em ecossistemas.

No presente trabalho a tensão superficial (TS) de soluções de SH de origem estuarina (manguezal de Ratoles), lacustre (Lagoa do Peri), marinha (Mar Virado) e isento de influência aquática (AH Aldrich), foi observada sob variadas condições de concentração, pH e força iônica, assim como na presença e ausência de pireno e naftaleno. Em geral, a TS das soluções diminui com o aumento da concentração de AH. Para a maior parte das amostras, em uma concentração de AH de, aproximadamente, 1200 mg L⁻¹ ocorre uma redução na taxa de migração do soluto para a superfície da solução. Este valor é reduzido para 750 mg L⁻¹ quando NaCl ($I = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$) é adicionado. Neste caso, a diminuição na taxa de migração para a superfície também se torna mais evidente do que na ausência de sal, caracterizando um fenômeno típico de agregação das estruturas. A TS também diminui com o aumento da acidez, com um mínimo sendo atingido entre pH 3 e 5 para a maioria das amostras. A adição de pireno (0,1 μmol L⁻¹) modifica drasticamente os perfis de TS vs. concentração e vs. pH, sendo que neste caso, não ocorre migração das SH para a superfície em nenhum valor de pH. Nas soluções de AF, perfis de pH não são modificados com adição de pireno. Os efeitos observados são explicados em termos de arranjos conformacionais dos AH os quais, em solução aquosa, sob condições específicas de pH e força iônica, parecem aglomerar-se em domínios similares a micelas.

Através da análise por fluorescência, observou-se uma diminuição da razão entre a primeira (I₁) e a terceira (I₃) bandas do pireno em soluções de AH, mostrando que em valores de pH abaixo de 9 as moléculas sentem um ambiente mais hidrofóbico, sendo este efeito mais pronunciado em torno de pH 6 e 7. Estes dados acompanham um significativo aumento da fluorescência dos excímeros de pireno ($\lambda_{exc}/\lambda_{emi}=334 \text{ nm}/450 \text{ nm}$), caracterizando a aproximação das moléculas de pireno dentro dos domínios hidrofóbicos gerados pelas moléculas húmicas. Para os AF, o decréscimo da razão I₁/I₃ é menos significativo e não se observa formação de excímeros.

A influência das SH na solubilidade do pireno, em meio aquoso, foi igualmente testada através de um sistema que permite o transporte do pireno não solubilizado nas soluções de AH, por fluxo de N₂, para uma solução hidroalcoólica, avaliada por

fluorescência. Os resultados mostraram que a solubilidade do hidrocarboneto é aumentada pela presença de AH, e que esta depende de fatores como o pH e a concentração de AH. Os dados mostram que em meio alcalino, as moléculas de pireno estão mais disponíveis e são facilmente transportadas da solução de AH para a solução hidroalcoólica, enquanto em valores de pH mais baixos, a interação com as moléculas de AH é mais forte. O aumento da concentração de AH também aumenta a interação com o pireno, contribuindo para a diminuição da disponibilidade deste no meio.

O conjunto de informações, ao ser analisado juntamente com parâmetros bióticos e abióticos dos sistemas considerados, pode ajudar a estimar o papel das SH no destino de poluentes orgânicos apolares em águas naturais.

ABSTRACT

Humic substances (HS) are the main constituents of the organic fraction in natural waters, sediments and soils. Physical and chemical interactions between HS and other components in the environment may affect the pH and redox potential of soils, sediments and water, control the concentration, the bioavailability and the transport of trace metals and organic compounds as well as modify the chemical characteristics of HS themselves.

In the present work the surface tension (ST) of solutions of humic substances (HS) samples from estuarine (Ratones Mangroves), lacustrine (Peri Lagoon), marine (Mar Virado) and terrestrial (Aldrich humic acid) sources was observed under varied conditions of pH, concentration and ionic strength as well as in the presence and absence of pyrene and naphthalene. In general, the ST decreases systematically with increasing HA concentration. At an HA concentration of approximately 1200 mg L⁻¹ a reduction in the rate of the solute migration to the solution surface is observed for all samples. This value is reduced to approximately 750 mg L⁻¹ when NaCl ($I = 0.3 \text{ mol L}^{-1}$) is added to the solutions. Surface tension also decreases with increasing acidity, a minimum being reached between pH 3 and 5, for most samples. Addition of pyrene (0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) modifies drastically both the concentration and the pH profiles to the HA solutions. In this last case a maximum in ST is observed between pH 6 and 7. FA profiles are not modified in presence of pyrene at that concentration. Observed effects are explained through the conformational arrangements of HA which tend to agglomerate in micelle-like domains in aqueous solution under specific conditions of pH and ionic strength. A decrease in the pyrene I_1/I_3 fluorescence peaks ratio in HS solutions shows that below pH 9 pyrene molecules react progressively to the change to a more hydrophobic environment, the greatest effect being observed at around pH 6 to 7. These signals are followed by a significant increase in the pyrene excimer fluorescence ($\lambda_{exc}/\lambda_{emi}=334 \text{ nm}/450 \text{ nm}$), which is a consequence of the proximity of pyrene molecules. For FA, the I_1/I_3 ratio decrease is less significant and no excimer develops.

The influence of HS in the pyrene aqueous solubility was equally tested with a gas purging experiment where nitrogen gas was bubbled through aqueous HS/pyrene solutions. The exit gas trapped with a hydroalcoholic solution and evaluated by fluorescence.

The results showed that the presence of HS in solution, can have a significant retarding effect on pyrene evaporation, such effect being related to parameters like pH and HS concentration.

Such data analysed together with biotic and abiotic parameters of the cited environments will help in the evaluation of the role of humic material in the quality of these ecosystems.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	ácido fúlvico
AFMR2	ácido fúlvico Manguezal de Ratonos 2
AFMR7	ácido fúlvico Manguezal de Ratonos 7
AFMR8	ácido fúlvico Manguezal de Ratonos 8
AFMR11	ácido fúlvico Manguezal de Ratonos 11
AFMV1	ácido fúlvico Mar Virado 1
AFP4	ácido fúlvico Lagoa do Peri 4
AH	ácido húmico
AHMR1	ácido húmico Manguezal de Ratonos 1
AHMR2	ácido húmico Manguezal de Ratonos 2
AHMR7	ácido húmico Manguezal de Ratonos 7
AHMR8	ácido húmico Manguezal de Ratonos 8
AHMR11	ácido húmico Manguezal de Ratonos 11
AHMV1	ácido húmico Mar Virado 1
AHP1	ácido húmico Lagoa do Peri 1
AHP7	ácido húmico Lagoa do Peri 7
CO	compostos orgânicos
COA	compostos orgânicos apolares
COD	carbono orgânico dissolvido
COP	carbono orgânico particulado
CMC	concentração micelar crítica
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
<i>I</i>	força iônica
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
IV	infravermelho
K_{doc}	coeficiente de partição
MO	matéria orgânica
MOA	matéria orgânica aquática
MOD	matéria orgânica dissolvida
MON	material orgânica natural
PCBs	policlorados bifenílicos
SH	substâncias húmicas
SOR	substância orgânica refratária
<i>t</i>	toneladas
TS e γ	tensão superficial
λ_{exc}	comprimento de onda de excitação

LISTA DE TABELAS

1.1. Estimativas das reservas de carbono orgânico na Atmosfera, Terra e Água	4
1.2. Exemplos de produtos identificados após a degradação oxidativa de misturas húmicas.	7
5.1. Composição elementar das substâncias húmicas estudadas	36
5.2. Atribuições das principais bandas no IV das substâncias húmicas estudadas	38

LISTA DE FIGURAS

1.1	Processos que levam à formação das substâncias húmicas	2
1.2	Estruturas aromáticas identificadas por métodos oxidativos	7
1.3	Modelo bidimensional para estrutura dos ácidos húmicos	8
1.4	Modelo tridimensional para estrutura de ácidos húmicos	9
1.5	Modelos estruturais de “building blocks” para os ácidos húmicos.	10
1.6	Principais componentes de um espectrofluorímetro.	16
3.1.	Vista parcial da Lagoa do Peri	22
3.2.	Vista parcial do Manguezal de Ratores	23
3.3.	Vista parcial da Ilha do Mar Virado.	24
3.4.	Pontos de coleta na Lagoa do Peri	26
3.5.	Pontos de coleta no Manguezal de Ratores	27
3.6.	Ponto de coleta na Ilha do Mar Virado	27
4.1.	Representação esquemática das etapas envolvidas no processo de extração e purificação das substâncias húmicas	30
4.2.	Ilustração do transferidor de pireno por fluxo de N ₂	35
5.1.	Espectros de absorção no IV das substâncias húmicas estudadas	40
5.2.	Efeito da concentração de substâncias húmicas sobre a tensão superficial das soluções.	43
5.3.	Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos e fúlvicos	46
5.4.	Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos em presença de NaCl e MgCl ₂	48
5.5.	Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de substâncias húmicas em presença de pireno (0,1 µmol L ⁻¹)	51
5.6.	Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de substâncias húmicas em presença de pireno (1,0 µmol L ⁻¹)	52
5.7.	Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos em presença de sal e pireno (0,1 µmol L ⁻¹)	54
5.8.	Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos em presença de naftaleno.	55
5.9.	Estruturas moleculares do naftaleno e do pireno	56
5.10.	Espectros de fluorescência do pireno em água e em solução de AH Aldrich	57
5.11.	Variação da razão I ₁ /I ₃ do pireno em soluções de substâncias húmicas.	58
5.12.	Espectros de fluorescência do pireno em solução de AH Aldrich e MON	61
5.13.	Espectros de fluorescência do pireno em soluções de AHMR8 e AFMR8	62
5.14.	Espectros de fluorescência do pireno em soluções de AHP7 e AFP4	63
5.15.	Espectros de fluorescência do pireno em soluções de AHMV1 e AFMV1	64
5.16.	Comparação entre razão I ₁ /I ₃ do pireno em soluções de ácidos húmicos (I = 0,3)	67

5.17. Espectros de fluorescência do pireno em soluções de ácidos húmicos ($I = 0,3$).	68
5.18. Efeito da concentração de ácidos húmicos na solubilidade do pireno em solução aquosa (CG).	69
5.19. Espectros de fluorescência do pireno nas soluções hidroalcoólicas provenientes de soluções com diferentes concentrações de ácidos húmicos.	71
5.20. Espectros de fluorescência do pireno nas soluções hidroalcoólicas provenientes de soluções de ácidos húmicos em diferentes valores de pH.	73

I. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e classificação das substâncias húmicas

A matéria orgânica (MO) existente nos solos, sedimentos e águas naturais, apresenta-se como um sistema complexo de substâncias, cuja dinâmica é governada pela adição de resíduos orgânicos de diversas naturezas e por uma transformação contínua, sob a ação de fatores biológicos, químicos e físicos (Manzatto, 1990; Ver *et al.*, 1999).

Este material pode ser dividido basicamente em dois grupos. O primeiro grupo é constituído por produtos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano, tais como proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos e outros. Estas substâncias constituem, aproximadamente, 10 a 15 % da reserva total do carbono orgânico (CO) e são geralmente denominadas substâncias não húmicas. O segundo grupo é representado pelas substâncias húmicas (SH), as quais constituem 85 a 90 % da reserva total de CO (Santos e Camargo, 1999 e referências citadas).

As SH são produtos da degradação oxidativa e subsequente polimerização da matéria orgânica (MO) animal e vegetal (**Figura 1.1**). Elas são constituídas por uma mistura de compostos de elevada massa molar com uma grande variedade de grupos funcionais. Com base nas suas características de solubilidade elas são usualmente classificadas em:

- *Ácidos Húmicos* (AH): consistem na fração das SH que precipita de soluções aquosas quando há uma diminuição do pH até valores próximos a 2,0 (Aiken *et al.*, 1985). Portanto, podem estar presentes nas águas naturais. A razão da solubilidade limitada dos AH em água está no fato de eles terem uma estrutura rica em carbono e relativamente pobre em grupos ácidos (Rashid, 1985). Os AH podem ainda ser separados em dois grupos, de acordo com a solubilidade na presença de um eletrólito em meio alcalino. No primeiro grupo, estão aqueles em que não ocorre a precipitação pelo eletrólito, sendo denominados ácidos húmicos castanhos; no segundo grupo, aqueles em que a precipitação ocorre facilmente, sendo denominados ácidos húmicos cinzentos (Stevenson, 1994).

- *Ácidos Fúlvicos* (AF): são considerados, tanto pelos cientistas do solo como de águas, como a fração das SH que é solúvel em água sob todas as condições de pH. Eles possuem maior solubilidade, pois diferentemente dos AH, têm uma estrutura molecular menor,

contendo um número maior de grupamentos ácidos. Por esta razão, representam a fração predominante nas águas naturais.

- *Humina*: é a fração das SH insolúvel em água em qualquer condição de pH. Comparado aos AH e AF, existem relativamente poucos estudos sobre esta fração.

É importante salientar que estes termos não designam compostos puros, sendo apenas uma classificação operacional, já que as SH consistem de uma complicada e heterogênea mistura de substâncias orgânicas.

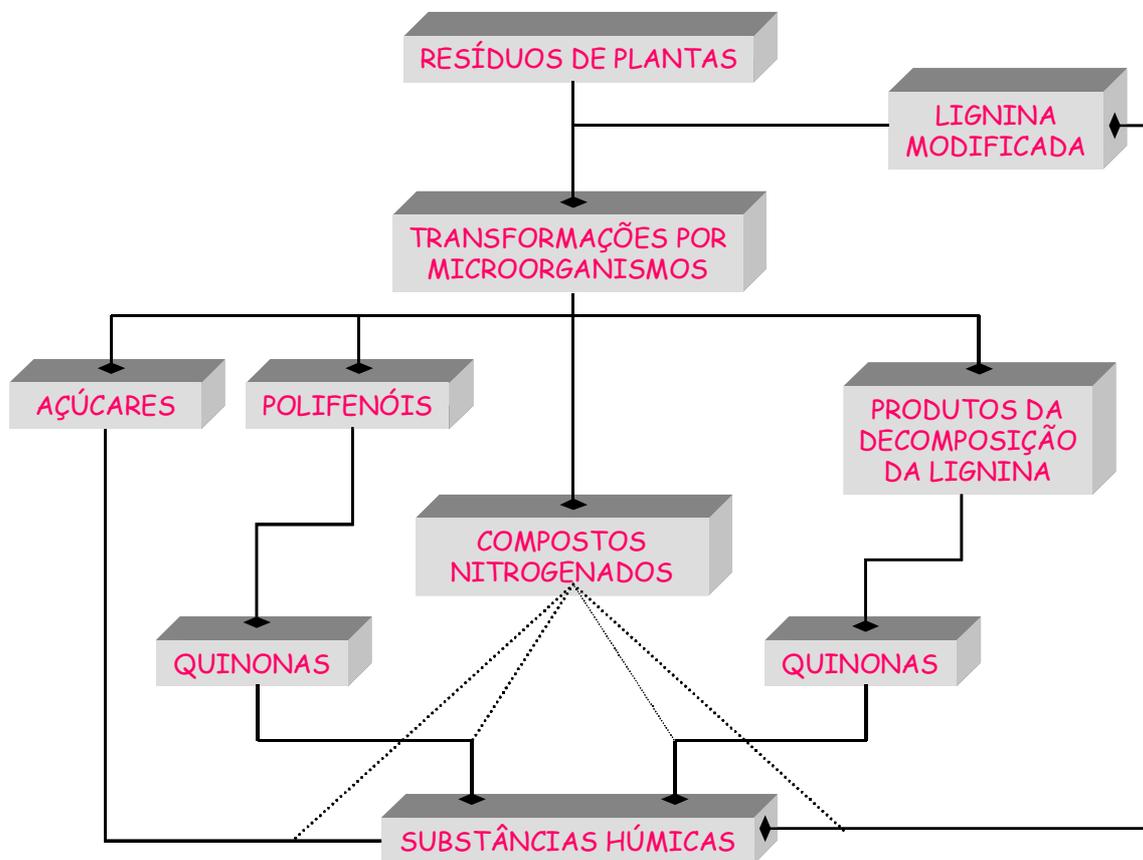


Figura 1.1. Processos que levam à formação das substâncias húmicas.

1.2. Distribuição das substâncias húmicas na natureza

As SH são os principais constituintes da fração orgânica em águas naturais, sedimentos e solos e podem ser encontradas em qualquer lugar onde haja processos de decomposição de MO.

O conteúdo de carbono orgânico dissolvido (COD) nas águas oceânicas situa-se entre 0,3 a 3,0 mg L⁻¹. Em águas de subsolo, pode-se medir concentrações de 20 µg L⁻¹, chegando a 30 mg L⁻¹ em águas de superfície (Rashid, 1985 e referências citadas; Suffet e MacCarthy, 1988). As SH, propriamente ditas, são os representantes da maior parte (entre 80 e 90 %) desta MO solúvel. Grande parte do COD em sistemas aquáticos tropicais com coloração escura apresenta-se como SH (Rocha *et al.*, 1998 e 2000). Ao extrapolar os valores mencionados anteriormente para uma escala global pode-se imaginar a repercussão dos eventuais efeitos que esse material passa a ter nos processos físico-químicos destes ambientes. A produção anual de húmus aquático de origem fitoplanctônica nos oceanos, por exemplo, está avaliada em torno de 11,5 x 10⁸ t de carbono. Estima-se ainda, que os rios contribuam com uma quantidade adicional de 1,8 x 10⁸ t de carbono em húmus de origem terrestre (Rashid, 1985 e referências citadas).

Devido a sua alta estabilidade e resistência à degradação microbiana, as SH podem permanecer na coluna d'água por longos períodos de tempo. Assim, torna-se evidente que um conhecimento mais preciso dos mecanismos das interações SH-poluentes beneficiaria todas as áreas das ciências ambientais, levando eventualmente a aplicações práticas, tais como a minimização do efeito de poluentes em ecossistemas.

A **Tabela 1.1** apresenta uma estimativa da reserva de CO proveniente do ar, biota, águas naturais e oceanos, solos, sedimentos e combustíveis fósseis.

Tabela 1.1 Estimativas das reservas de carbono orgânico na Atmosfera, Terra, e água. (Hayes *et al.*, 1989)

Locais		C (x P; t)
Atmosfera		692
Terra		
	Biota	592-827
	Matéria orgânica do solo	2000-3000
	Ácidos húmicos de solo ^a	1000-1500
	Sedimentos	>1 x 10 ⁷
	Combustíveis fósseis	>5000
Água		
	Oceanos	1000
	C orgânico dissolvido (COD)	30
	C orgânico particulado (COP)	3
	Plâncton	
Águas Naturais		
Lagos e rios ^b		
	COD	0,738
	COP	0,396

^a Assumindo que o conteúdo de C em AH de solo ~50%

^b Assumindo que 0,225 x 10¹⁵ toneladas de água contém 3,28 e 1,76 ppm de COD e COP, respectivamente

1.3. Extração e purificação das substâncias húmicas

Os principais métodos de extração das SH levam em consideração três propriedades principais: o tamanho, a carga e a hidrofobicidade.

Stevenson (1994) descreveu o método de extração ideal como sendo aquele que permite o isolamento de SH inalteradas e livres de contaminantes inorgânicos, e que pode ser aplicado a qualquer tipo de matriz. É desnecessário dizer que tal método ainda não foi desenvolvido e que, talvez, nunca se possa fazê-lo, dada a complexidade do material. Atualmente, o método mais utilizado e também mais citado pelos diferentes autores tem sido

aquele sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) (<http://www.ihss.gatech.edu>). A IHSS foi fundada em 1985, na cidade de Denver, por um grupo de pesquisadores americanos que pretendiam difundir e estabelecer uma metodologia de extração e purificação “padrão”, de modo que os resultados obtidos por outros grupos de pesquisa pudessem ser comparados entre si.

Uma abordagem mais detalhada sobre esta metodologia será apresentada na seção experimental deste trabalho (**item 4.2**).

Esta metodologia, no entanto, ainda é bastante discutida. Muitos pesquisadores têm tentado desenvolver novas opções para a extração e purificação das SH sem agredir sua constituição molecular original.

No que se refere às SH aquáticas, devido a sua baixa concentração em águas naturais, a extração/separação da matéria orgânica aquática (MOA) é a primeira e fundamental etapa dos estudos associados à caracterização de suas propriedades. Neste sentido, Rocha *et al.* (2003), desenvolveram uma metodologia baseada apenas no abaixamento da temperatura minimizando, assim, alterações nas características originais da amostra.

1.4. Importância das substâncias húmicas

As SH desempenham um papel importante no meio ambiente por diversas razões. Nos solos, considerando-se apenas os aspectos físicos, por exemplo, elas contribuem para a retenção de calor (estimulando assim a germinação de sementes); atuam contra a erosão e cimentam as partículas em agregados, aumentando a permeabilidade do meio (Lobartini *et al.*, 1992; Kordel *et al.*, 1997). No que concerne aos aspectos químicos, a presença de grupos funcionais, tais como carboxilas e hidroxilas fenólicas, faz com que as SH assumam um comportamento polieletrólítico e atuem como agentes tamponantes de íons metálicos (Saar e Weber, 1982; Alloway, 1990). Metais como cobre e cádmio, por exemplo, quando complexados com SH são menos tóxicos aos organismos do que em suas formas livres (Morrison *et al.*, 1989; Bruland *et al.*, 1991).

Nos ambientes aquáticos, as SH podem ainda alterar a partição dos metais passíveis de complexação, seqüestrando ou liberando estes íons para a coluna d'água. Além da

complexação com metais, as SH podem ainda interagir com xenobióticos orgânicos, tais como o DDT (2,2-di(4-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano), PCBs (bifenilas policloradas) e outros (Chiou *et al.*, 1986; Manahan, 1989; Ragle *et al.*, 1997). Algumas pesquisas recentes têm demonstrado que os AH dissolvidos podem facilitar a remoção de contaminantes orgânicos da água por processos de complexação e floculação (Rebhun *et al.*, 1996 e 1998).

Em águas costeiras, as SH governam a produtividade primária, estimulando o crescimento do fitoplâncton e, em certas situações, suas características estruturais e funcionais têm, elas mesmas, sido utilizadas como indicadores do grau de poluição em diferentes ambientes (Kerndorff e Schnitzer, 1979).

As SH podem, no entanto, também representar problemas em águas potáveis. Entretanto, as substâncias *per se* não são consideradas prejudiciais à saúde. Muitos compostos orgânicos mutagênicos têm sido identificados nos extratos concentrados de águas naturais cloradas, e as SH presentes nestas águas são consideradas as precursoras destes. Embora a luz do sol e o oxigênio diminuam a intensidade da coloração e da fluorescência em águas naturais, não influenciam na quantidade de COD total (Zepp, 1988). Assim, em geral, recomenda-se remover as SH antes dos tratamentos por cloração das águas potáveis.

1.5. Aspectos estruturais das substâncias húmicas

Devido à sua origem biológica os principais componentes envolvidos na gênese das SH são essencialmente os mesmos que constituem a biomassa, ou seja, proteínas, aminoácidos, carboidratos, açúcares, polissacarídeos, ligninas e seus derivados, tanino, fenóis, polifenóis e outros compostos aromáticos, ácidos graxos, álcoois, ésteres e aldeídos (Rashid, 1985). Além destas substâncias e de seus sub-produtos, a biomassa em decomposição pode conter ainda outros componentes derivados das sínteses e transformações microbianas. Todos estes compostos interagem em numerosas combinações para formar as SH.

Estudos feitos por métodos oxidativos, seguidos de análise por cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (EM) têm mostrado uma enorme variedade de compostos com distintas funções como fazendo parte das misturas húmicas (**Figura 1.2** e **Tabela 1.2**).

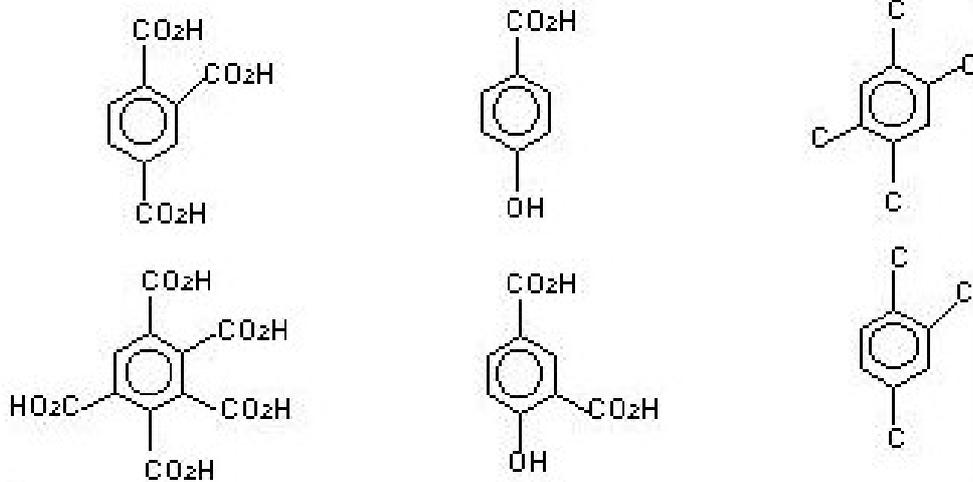


Figura 1.2. Estruturas aromáticas identificadas por métodos oxidativos.

Tabela 1.2 Exemplos de produtos identificados após a degradação oxidativa de misturas húmicas.

<i>Composto</i>	<i>Origem</i>	<i>Referência</i>
Ácidos benzenocarboxílicos	Aquática (lago)	Liao <i>et al.</i> (1982)
Ácidos furanocarboxílicos	Aquática (lago)	Idem
Mono, di e tri-ácidos alifáticos	Aquática (lago)	Idem
Ácidos benzeno (poli) carboxílicos	Solo	Ortiz Serra e Schnitzer (1973)
N-metil-benzilsulfonamidas	Solo	Idem
Ácido hidroxibenzenopenta-carboxílico	Solo	Idem
Anidridos	Solo	Idem
Derivados da lignina	Solo	Ertel e Hedges (1984)
Acetamida	Marinha	Wilson <i>et al.</i> (1983)
Fenol	Marinha	Idem
Ácidos graxos saturados (C-14)	Marinha	Idem
Ácidos graxos insaturados (C-16)	Marinha	Idem
Alcanos (C-14 a C-36)	Solo	Khan e Schnitzer (1971)
Di-alkilftalatos	Solo	Idem
Benzeno e alquilbenzenos	Solo	Schulten <i>et al.</i> (1991)
Naftaleno e alquilnaftalenos	Solo	Idem
Estireno e alquilestirenos	Solo	Idem
Fenantreno e alquilfenantrenos	Solo	Idem

Torna-se assim, evidente que as relações estrutura/reatividade são difíceis de serem estabelecidas para estas substâncias devido à sua complexidade química. Assim, as propostas para um modelo básico de estrutura têm sido bastante discutidas. Há alguns anos, estruturas predominantemente aromáticas eram as mais aceitas (Schnitzer, 1978; Kononova, 1982; Stevenson, 1994). Contudo, graças ao constante avanço das técnicas analíticas (C^{13} , NMR), verificou-se que o grau de aromaticidade era muito menor que o esperado e Schulten e Schnitzer (1993) propuseram um modelo para a estrutura de ácidos húmicos, incorporando importantes porções alifáticas, mostrando os diversos grupos funcionais (**Figura 1.3**).

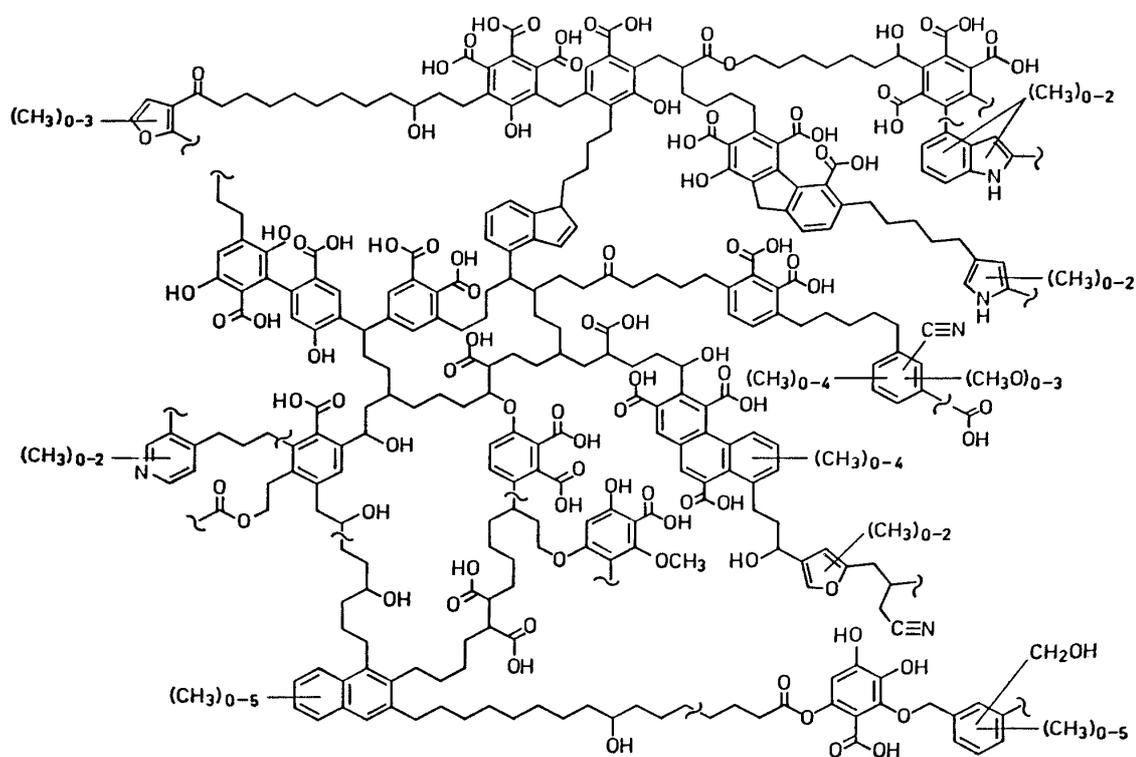


Figura 1.3. Modelo bidimensional para a estrutura dos ácidos húmicos. (Schulten e Schnitzer, 1993).

Em 1999, Sein *et al.* desenvolveram um modelo baseado numa conformação de menor energia (**Figura 1.4**). De acordo com este modelo a estrutura dos AH contém espaços vazios de diferentes tamanhos, onde podem alojar-se compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, como carboidratos e materiais proteicos, lipídios, agrotóxicos e outros poluentes. Podem também estar presentes elementos inorgânicos como argilas e óxidos-hidróxidos (Schulten e Schnitzer, 1997).

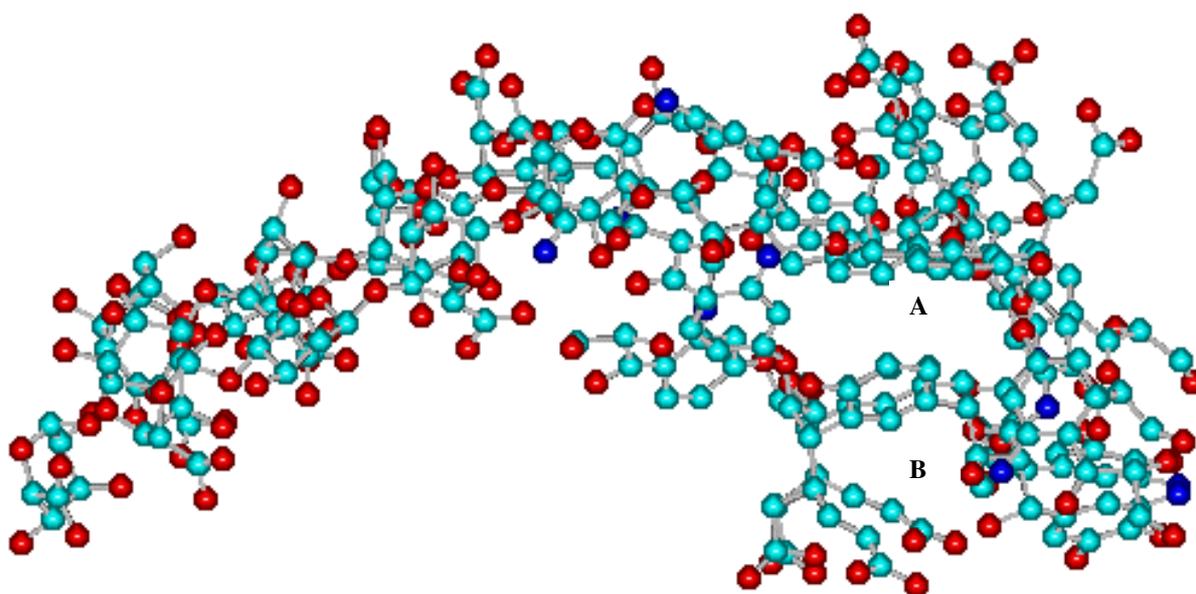


Figura 1.4. Modelo tridimensional para a estrutura de ácidos húmicos. (Sein *et al.*, 1999).

Obs :  = carbono,  = oxigênio,  = nitrogênio; A e B = indicam os vazios provavelmente presentes na estrutura das SH.

Estudos mais recentes, por outro lado, têm levado à acreditar que as SH, contrariamente aos modelos macromoleculares até então propostos, podem consistir de agregados de moléculas menores, apresentando uma espécie de “fórmula unitária média universal” (Steelink, 1985; Picollo *et al.*, 1996; Sein *et al.*, 1999; Cozzolino *et al.*, 2001) (**Figura 1.5**). A incidência de unidades de carbono do tipo C-(6+3) nestas estruturas (ramificação n-/iso-propil ligada ao anel aromático representadas pela união de três símbolos “o” na **Figura 1.5**) é uma consequência do trabalho de Steelink (1985), em um estudo detalhado sobre as características elementares de AH extraídos de solos. Segundo este autor,

as SH seriam formadas por associações de moléculas relativamente pequenas, denominadas “building blocks”, blocos construtores, unidas por interações supramoleculares.

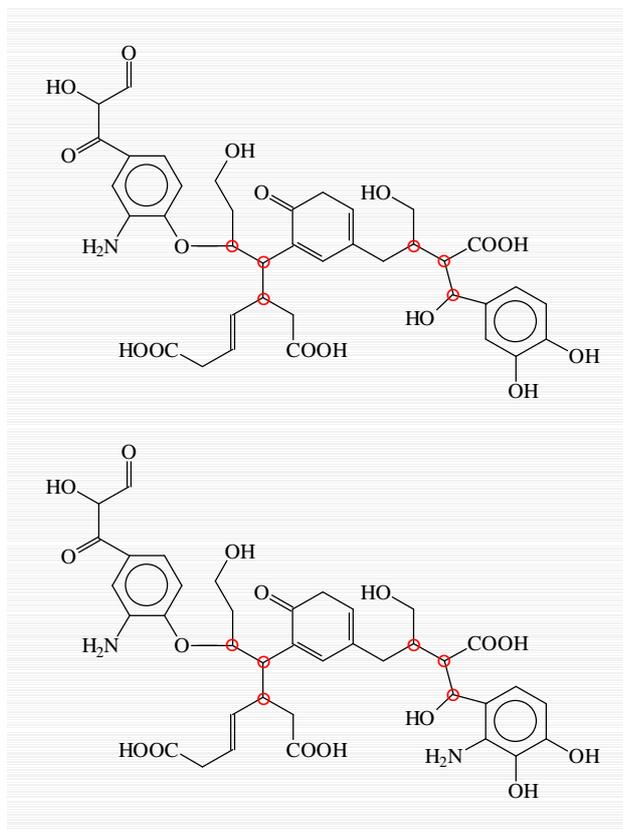


Figura 1.5. Modelos estruturais de “building blocks” para os ácidos húmicos (Steelink, 1985).

Obs.: As tríades, representadas pela união de três símbolos “o”, indicam as unidades de carbono do tipo C-(6+3) nestas estruturas.

Ainda nesta mesma abordagem, Mangrich, *et al.* (1988 e 1990) e Merce *et al.* (1996 e 1998) estudaram, através da complexação com metais, a conexão de blocos de AH, determinando o caráter da ligação e o tipo de matéria orgânica que se ligava aos íons vanadilo, de AH naturais e sintéticos, para formar grandes blocos moleculares.

Investigações recentes conduzidas em nosso laboratório têm contribuído para descrever as características estruturais (CHN), espectrais (infravermelho, fluorescência e ultravioleta) e ácido-base (acidez total, carboxílica e fenólica assim como as curvas de titulação em presença e ausência de metais) de SH provenientes de sedimentos estuarinos e lacustres da Ilha de Santa

Catarina e proximidades (Arend, 1999; Sierra *et al.*, 2000 e 2001; Giovanela *et al.*, 2004). O conjunto de dados mostrou que o material estudado é recente e pouco humificado com características estruturais mistas entre àquelas de SH de solos e ambientes marinhos.

Amostras provenientes de locais impactados por dejetos orgânicos devido à sua proximidade da cidade de Florianópolis, como o Manguezal de Itacorubi, não apresentaram alterações detectáveis pelos métodos analíticos aplicados, levando a crer que as diferenças observadas entre SH de diferentes origens estariam ligadas não somente à fonte do material, mas também e de forma significativa, ao metabolismo das bactérias responsáveis pela formação do húmus e às características físico-químicas e geológicas do meio. Entretanto, a análise de lipídios detectou que o percentual de fósforo inorgânico determinado no manguezal de Itacorubi (84 %) foi maior do que o de Ratonas -área de preservação permanente- (58 %), possivelmente devido à contaminação urbana (Mater *et al.*, 2004) A importância do aporte de esgoto doméstico para o manguezal do Itacorubi foi avaliada a partir da concentração do coprostanol que variou, em média, de 7,7 ng g⁻¹ em Ratonas para 1,42 µg g⁻¹ no Itacorubi (Mater *et al.*, 2004). Esse nível elevado é compatível com valores encontrados em outros ambientes contaminados.

As implicações ambientais deste tipo de observação referem-se à possibilidade de as perturbações antropogênicas moderadas tenderem mais a afetar os processos químicos relacionados às SH que suas características químicas propriamente ditas.

1.6. Interações entre substâncias húmicas e compostos orgânicos

A dinâmica e os mecanismos das interações entre SH e moléculas orgânicas dependem tanto das propriedades físico-químicas das primeiras (tais como tipos de grupamentos funcionais, distribuição de cargas, dimensões, forma e configuração molecular, características estruturais e funcionais, solubilidade e polaridade) assim como das características químicas das segundas. Estas interações são igualmente influenciadas pelas condições do sistema, como qualidade e quantidade de matéria inorgânica, pH, temperatura, potencial redox, umidade e força iônica da solução (Senesi e Felici, 1993).

As SH presentes na fase sólida podem concentrar compostos orgânicos na superfície, através de mecanismos de adsorção, ou formar complexos solúveis controlando sua persistência, degradação, toxicidade e biodisponibilidade no ambiente. Nos solos, por exemplo, a adsorção de moléculas orgânicas sintéticas e naturais à MO natural tem sido, muitas vezes, descrita e interpretada através de isothermas de adsorção. Os principais mecanismos envolvidos na adsorção de moléculas orgânicas pela MO dos solos e sedimentos são: troca de cátions (moléculas orgânicas carregadas positivamente), formação de pontes de hidrogênio, interações de van der Waals, troca de ligantes, transferência de cargas e formação de ligações covalentes (Ravelli-Neto, 1995; Tavares *et al.*, 1996).

Diversos trabalhos têm sido publicados demonstrando a utilização das SH como agentes coadjuvantes na remediação de aquíferos e efluentes, ou seja, atuando como auxiliares nos processos de floculação/precipitação de metais e compostos orgânicos (Rebhun *et al.*, 1996, 1998). Entretanto, poucos trabalhos têm sido focalizados nos mecanismos propriamente ditos destas interações, principalmente com compostos orgânicos.

Os mecanismos que levam às interações entre SH e compostos orgânicos em ambientes aquáticos ainda não estão completamente elucidados. Estudos envolvendo complexação, adsorção, oclusão nos espaços vazios das moléculas, partição em microambientes hidrofóbicos, são algumas das possibilidades consideradas (Tavares *et al.*, 1996; Resende, 1997; Wershaw, 1986). Uma possibilidade de interação que vem sendo cada vez mais levada em consideração é a formação de agregados organizados, os quais poderiam alojar compostos orgânicos de pequena massa molar (Wershaw, 1986; von Wandruszka *et al.*, 1997 e 1998).

As interações que estão recebendo atenção especial são aquelas entre as SH e contaminantes orgânicos como pesticidas, herbicidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Em geral, tem sido demonstrado que a solubilidade destes compostos em água pode ser aumentada pela presença de SH, e que seus coeficientes de partição (K_{doc}) entre o meio aquoso e as SH podem ser avaliados assumindo um modelo micela-soluto (Chiou *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1997).

A aromaticidade das SH tem demonstrado ser um importante fator para a captura de poluentes aromáticos em meio aquoso. Por exemplo, Tanaka *et al.* (1997), mostraram que a solubilidade do pireno em água aumenta linearmente com a concentração de SH, e que a

aromaticidade destas, mais que os fatores que determinam a sua densidade de carga (pH e força iônica), contribui para este aumento.

Assim como a aromaticidade, a massa molar também parece ser determinante nas interações SH-contaminantes orgânicos. Em geral, uma maior massa molar corresponde a um maior número de grupos aromáticos, sendo que o aumento do número de ligações de carbono conjugadas, aumenta a polidispersidade do substrato húmico e assim, sua habilidade em capturar compostos orgânicos (Chin *et al.*, 1997).

Evidências na literatura sugerem, portanto, que tanto a aromaticidade como a massa molar das SH, assim como as propriedades físico-químicas tanto das SH como dos solutos orgânicos, são importantes para controlar a especiação de compostos orgânicos em águas naturais e também para o transporte e difusão de HPAs, em meios aquosos e terrestres.

De qualquer forma, uma vez que as interações mais importantes ocorrem em meio aquoso, é de fundamental importância, numa primeira instância, compreender o comportamento deste material em solução.

1.7. Tensoatividade das substâncias húmicas

Os líquidos tendem a adotar formas que tornam mínima a sua área superficial, de modo que um número máximo de moléculas fique no interior da fase líquida, envolvidas pelas moléculas vizinhas e com elas interagindo. As gotículas de líquido, por isso tendem a ser esféricas, pois a esfera é a forma que tem a menor área superficial para um dado volume.

Os efeitos de superfície podem ser expressos na linguagem das energias de Helmholtz e de Gibbs (Atkins, 1999). A ligação entre estas funções termodinâmicas e a área superficial se faz pelo trabalho necessário para modificar a área de um dado valor, pois dA e dG são iguais (em condições diferentes) ao trabalho feito para alterar a energia do sistema. O trabalho necessário para modificar a área superficial, σ , de uma amostra, de uma grandeza infinitesimal $d\sigma$, é proporcional a $d\sigma$ e se escreve como:

$$dw = \gamma d\sigma \quad \text{[Equação 1]}$$

A constante de proporcionalidade, γ , é denominada *tensão superficial* (TS ou γ); suas dimensões são de energia/área e suas unidades são joules por metro quadrado (J m^{-2}). Entretanto, valores de γ também são muitas vezes registrados em newtons por metro (N m^{-1} , pois $1 \text{ J} = 1 \text{ N m}$).

O trabalho de formação de uma área superficial, a volume e temperatura constantes, pode ser igualado à variação da energia de Helmholtz, e então:

$$dA = \gamma d\sigma \quad [\text{Equação 2}]$$

Como a energia de Helmholtz diminui ($dA < 0$) se a área da superfície diminuir ($d\sigma < 0$), as superfícies têm, naturalmente, a tendência a se contraírem.

Alguns compostos têm a propriedade de alterar a TS da água, sendo denominados de tensoativos (surfactantes). Estes são compostos anfifílicos, orgânicos ou organometálicos que formam colóides ou micelas em solução. Substâncias anfifílicas ou anfílicas são moléculas que possuem regiões distintas e características, hidrofílicas e hidrofóbicas. Exemplos comuns de tensoativos são os sabões e detergentes que diminuem a TS da água de modo que ela é mais rapidamente absorvida pelos poros e áreas sujas, facilitando a limpeza.

A importância dos tensoativos é devida, principalmente, à sua capacidade em modificar algumas propriedades reacionais com conseqüente melhoria em sensibilidade e/ou seletividade analítica. As principais características do uso de tensoativos estão relacionadas à formação de ambientes organizados, também conhecidos como ambientes micelares (Maniasso, 2001). Uma propriedade importante das micelas é o poder de solubilizar os mais variados solutos e espécies pouco solúveis. A quantidade de soluto solubilizado é, em geral, diretamente proporcional à concentração do tensoativo, desde que a concentração do tensoativo seja igual ou superior à concentração micelar crítica (CMC) e que existam várias possibilidades de solubilização no sistema micelar (Maniasso, 2001).

AH e AF, proteínas, ácidos graxos e outros compostos orgânicos naturais possuem caráter anfifílico. As moléculas de AH e AF contêm grupos polares (hidrofílicos), como os carboxílicos e fenólicos, e grupos apolares (hidrofóbicos), como a maioria dos grupos alifáticos e aromáticos não substituídos. Essa composição confere a estes ácidos um caráter tensoativo (Visser e Caillier, 1988).

O aumento da solubilidade de HPAs em água está relacionado com a atividade superficial das SH. Tanaka *et al.* (1997), por exemplo, observaram que a solubilidade aparente do pireno em água é aumentada na presença de SH. Por meio de medidas de fluorescência, Puchalski *et al.* (1992), concluíram que SH têm domínios hidrofóbicos nas quais substâncias polinucleares aromáticas poderiam alojar-se.

Considerando-se a onipresença das SH na natureza, torna-se evidente que esta propriedade lhes confere um papel primordial no destino e transporte de xenobióticos nos ambientes aquáticos naturais. Assim, o estudo da variação da tensão superficial de soluções de SH torna-se um parâmetro relevante para elucidar os tipos de agregações destas substâncias em meio aquoso. Entretanto, apesar de as investigações sobre SH terem sido iniciadas há longo tempo, encontram-se poucos dados na literatura abordando a tensoatividade dos AH em solução. Tchapeck e Wasowski (1976) descreveram uma redução aproximadamente linear da tensão superficial com o aumento da concentração de AH; Chen e Schnitzer (1978) também demonstraram que a TS de soluções concentradas de extratos de solos teve uma redução significativa em relação à da água pura. Tchapeck *et al.* (1978) descreveram que extratos aquosos de solo, mesmo com baixas concentrações de COD, reduziram entre 8 e 9 mN m⁻¹ a tensão superficial da água. Anderson *et al.* (1995) demonstraram que a matéria orgânica dissolvida em solução de solo foi mais efetiva que os AH extraídos por métodos químicos, na redução da TS, em concentrações equivalentes de COD. Yates e von Wandruszka (1999), mostraram a dependência da TS dos AH em solução em relação ao pH e à força iônica, propondo um modelo “pseudomicelar” para explicar os dados obtidos.

Em todos os trabalhos citados, apesar de as conclusões convergirem para um ponto comum, ou seja, a confirmação das propriedades anfífilas das SH e sua potencialidade de formar agregados em solução, as comparações são difíceis de serem feitas em razão da diversidade de condições experimentais. Em geral, as concentrações usadas nestes estudos excedem em muito os valores de concentração de SH encontrados em sistemas aquáticos naturais e, ainda, as metodologias de extração e purificação dos AH diferem de um trabalho para outro produzindo materiais com características diferentes.

1.8. Espectroscopia de fluorescência

Quando uma molécula absorve radiação eletromagnética, a maneira pela qual ela retorna ao seu estado fundamental é regida por sua estrutura e pelas propriedades físico-químicas do seu ambiente. Em algumas situações, o caminho de volta ao estado fundamental envolve a emissão de radiação. Se esta emissão provém do primeiro estado singlete excitado, o processo é chamado de fluorescência e o grupo que emite a radiação é denominado fluoróforo (Parker, 1968; Wehry, 1973).

A instrumentação para as medidas de fluorescência (**Figura 1.6**) comporta uma *fonte de luz* para excitar a amostra, um *monocromador* para selecionar o comprimento de onda de excitação, um *compartimento para a amostra*, um *segundo monocromador* para isolar e analisar a emissão fluorescente proveniente da amostra, um *fotomultiplicador* e, finalmente, um *registrador* para determinar a intensidade de emissão de fluorescência.

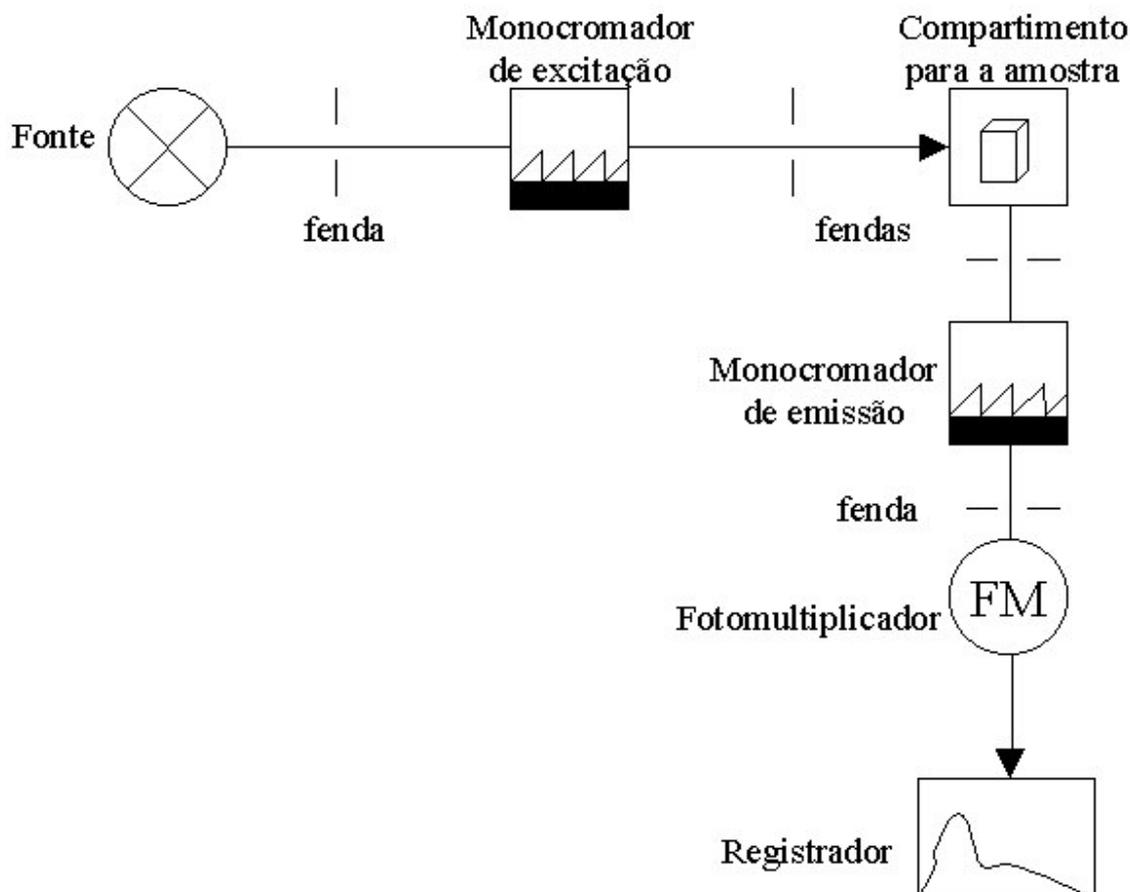


Figura 1.6. Principais componentes de um espectrofluorímetro.

A fluorescência se distingue dentre as técnicas ópticas usadas para investigar as moléculas pelo fato de o tempo de vida do estado excitado ser suficientemente grande para que uma variedade de interações físico-químicas possa ocorrer antes da emissão. Estas incluem o movimento rotacional, a reorientação do solvente, a formação de complexo, a transferência de próton e a transferência de energia do estado excitado para outro cromóforo (Brand e Gohlke, 1972).

Este é um método de análise relativamente simples, muito sensível e não destrutivo, e que tem sido utilizado para estudar vários sistemas químicos, físicos e biológicos. Apesar destas vantagens, muitos laboratórios hesitam ainda em utilizá-la por falta de intercalibração entre os resultados obtidos com diferentes instrumentos.

1.8.1. Sondas fluorescentes

O termo sonda solvatofluorescente ou simplesmente *sonda fluorescente* tem sido usado para substâncias cuja posição das bandas de emissão no espectro de fluorescência dependem do solvente. Elas ainda podem ser chamadas de corantes ou indicadores solvatofluorocrômicos ou fluorossolvatocrômicos (Reichardt, 1994).

Uma definição para sonda fluorescente geralmente adotada em estudos com macromoléculas é: “pequenas moléculas que sofrem mudanças em uma ou mais de suas propriedades fluorescentes como um resultado de interações não covalentes com uma macromolécula” (Brand e Gohlke, 1972).

Nos últimos anos, trabalhos utilizando sondas fluorescentes associadas com SH têm produzido resultados que dão suporte ao estudo destas interações.

As sondas fluorescentes, mais que a fluorescência das SH propriamente dita, são usadas no estudo de materiais húmicos porque possuem bandas melhores definidas nos espectros facilitando a interpretação dos dados. Embora o monitoramento da fluorescência das SH esteja sendo utilizado em muitos estudos, os espectros apresentam bandas largas e menos definidas. Por outro lado, as sondas quando preparadas sob determinadas condições experimentais específicas podem fornecer respostas para várias questões, como a polaridade do ambiente.

Na maioria dos trabalhos com SH, o **pireno** tem sido utilizado como sonda, pois oferece um número maior de vantagens sobre outros fluoróforos, como por exemplo:

- um forte pico de excitação em 240 nm, no qual muitas soluções de AH são fracamente excitadas;
- pode ser detectado em concentrações na ordem de 10^{-7} mol L⁻¹, praticamente sua solubilidade limite em água;
- sua hidrofobicidade, devido a sua aromaticidade, ajuda sua rápida associação em microambientes apolares, pois o torna capaz de interagir com os elétrons π dos grupos aromáticos da matriz húmica;
- a razão entre o primeiro e o terceiro pico vibracional do seu espectro de emissão (I_1 / I_3) é um bom indicador da polaridade do ambiente percebido por ele (Nakajima, 1971; Kalyanasundaram e Thomas, 1977; Dong e Winnik, 1982; Yates *et al.*, 1997);
- comparado a outros HPAs ele possui uma toxicidade relativamente baixa;
- sua configuração planar o torna menos impedido estericamente em sua interação com a SH dissolvida, ao contrário de moléculas tridimensionais, como DDT, que são menos eficientes na interação com os elétrons π dos grupos aromáticos das SH (Chin *et al.*, 1997).

1.9. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são poluentes orgânicos de importância ambiental e interesse toxicológico, pois muitos apresentam propriedades pré-carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais (Sisino *et al.*, 2002 e referências citadas).

Os HPAs são emitidos por fontes naturais (vulcões, por exemplo) ou antropogênicas (derramamento de petróleo, queima de combustíveis, resíduos industriais, etc.) e muitos processos térmicos também dão origem a estas substâncias. Após a emissão, os HPAs, que são substâncias lipofílicas e podem ter grande persistência no meio ambiente, distribuem-se nos compartimentos ambientais em proporções que dependem de suas propriedades físico-químicas e das características destes locais.

Em resíduos sólidos, a presença de HPAs é de interesse, uma vez que pode ocorrer contaminação humana direta – por contato com o resíduo, ou indireta – causada pelo destino

final inadequado dos resíduos e conseqüente contaminação do solo, lençóis freáticos, corpos d'água superficiais, biota e ar.

Dessa forma, a utilização de HPAs no estudo das SH é de relevante interesse para o meio ambiente, sendo que neste trabalho o *pireno* e o *naftaleno*, além de serem utilizados como sondas fluorescentes, serão também usados como representantes de HPAs, para avaliar as interações das SH com poluentes orgânicos.

1.10. Poluição aquática

Pelo menos em princípio, reconhece-se hoje o problema representado pelo comprometimento do meio ambiente. Pode-se definir poluição aquática como “a introdução antropogênica no meio ambiente aquático de substâncias ou energias responsáveis pelo comprometimento da saúde e sobrevivência humana e de outros organismos, prejudicando a estrutura dos ecossistemas ou interferindo no uso dos recursos naturais” (Harrison, 1990).

Os poluentes podem ser tanto de natureza química como física, podendo assim ser medidos, com maior ou menor precisão em água. Entretanto, no que se refere às possibilidades de eliminar os perigos decorrentes da presença destas substâncias, há bastante divergência de opiniões.

A desintoxicação completa de todas as emissões ou despejos industriais, é tão dispendiosa que se torna impossível sua aplicação geral. Por causa disso, torna-se necessário reduzir a produção em alguns ramos industriais para evitar maior poluição, o que por sua vez acarreta conseqüências econômicas negativas. Resta, portanto, para o momento, um compromisso, como o melhor caminho viável: eliminar, dentro do economicamente admissível, os poluentes mais tóxicos, para diminuir os riscos que pesam sobre a saúde humana (Fellenberg, 1980).

Determinados componentes como, por exemplo: metais pesados (Cd, Pb, Hg, etc.), compostos organoclorados (PCBs, etc.) e HPAs (benzeno, benzopireno, etc.), ou ainda alguns tipos de hidrocarbonetos alifáticos, são uma ameaça em potencial à saúde humana, devido a sua toxicidade, persistência e bioacumulação.

Estes compostos podem ser classificados como prioridade no controle da poluição em ambientes aquáticos, onde são frequentemente encontrados. Estas substâncias são muito prejudiciais mesmo em baixas concentrações, pois permanecem por longos períodos no ambiente aquático e participam da cadeia alimentar nestes ecossistemas.

Estes poluentes se acumulam nos organismos e as concentrações encontradas refletem o grau de poluição no ambiente. Particularmente na água, a concentração de um poluente pode ser muito baixa para ser detectada usando métodos analíticos de rotina, contudo, serão gradualmente acumuladas dentro dos ecossistemas até concentrações consideráveis em algumas espécies.

As SH apresentando uma elevada representatividade nestes ambientes interagem com estas substâncias, diminuindo sua disponibilidade no meio e, como substâncias orgânicas refratárias (SOR), vão minimizar a bioacumulação destes poluentes nos organismos, diminuindo assim os danos causados pela poluição no meio ambiente. Assim sendo, o conhecimento do modo de interação entre SH e poluentes seria do interesse de todos, pois são substâncias que estão disponíveis na natureza e que podem contribuir na restauração de ecossistemas impactados.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo:

- 1) *Analisar o comportamento de substâncias húmicas provenientes de sedimentos aquáticos e terrestres, de modo a identificar os tipos de interações entre estas substâncias e poluentes orgânicos em meio aquoso.*
- 2) *Estimar a importância destas interações no aumento da solubilidade de compostos orgânicos apolares em água.*

Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Extração e purificação, segundo a metodologia recomendada pela IHSS, de **substâncias húmicas** de origens aquática e terrestre provenientes de amostras de sedimento coletadas em diferentes pontos da costa brasileira: (a) **Manguezal de Ratoles** (Florianópolis – SC), (b) **Lagoa do Peri** (Florianópolis – SC) e (c) **Ilha do Mar Virado** (São Paulo – SP).
- Avaliação das propriedades físico-químicas das frações de AF e AH, através das seguintes técnicas analíticas:
 - **análise elementar - CHNS** (estudo da composição química do material húmico);
 - **espectroscopia de infravermelho - IV** (caracterização dos grupamentos funcionais presentes nas estruturas do material húmico);
- Observação da variação da **tensão superficial** das soluções aquosas das SH em diferentes condições de **concentração, pH, força iônica** e, ainda, na presença/ausência de **hidrocarbonetos policíclicos aromáticos** (pireno e naftaleno).
- Avaliação do papel da concentração e do pH das soluções de SH extraídas, na **solubilização** do **pireno** em solução aquosa.
- Monitoramento da **fluorescência** da sonda (pireno), assim como das SH visando estabelecer um mecanismo para estas interações.

III. AMOSTRAGEM

3.1. Áreas de estudo

3.1.1. Lagoa do Peri

O Parque Municipal da Lagoa do Peri (**Figura 3.1**) está localizado na região sudeste da Ilha de Santa Catarina e abriga o maior manancial de água potável superficial da costa catarinense, que totaliza uma área de 5,2 km² (Lapolli *et al.*, 1990).

Os principais canais fluviais que drenam para a lagoa são o Ribeirão do Peri, o Cachoeira e o Cachoeira Pequena. A cobertura vegetal do local é composta principalmente por espécies integrantes da Mata Atlântica, reflorestamento de Pinus e eucaliptos, e por vegetação de restinga.



Figura 3.1. Vista parcial da Lagoa do Peri..

3.1.2. Manguezal de Ratonos

Os manguezais constituem parte típica da vegetação litorânea intertropical, situadas em partes planas, inundáveis na maré alta e emersas na maré baixa, acompanhando as margens das baías e desembocaduras de rios. É em regiões de águas calmas sujeitas a inundações pela maré que se forma a vasa, solo pantanoso, onde se instalam os manguezais.

O Manguezal de Ratonos (**Figura 3.2**) está localizado na Bacia do rio Ratonos (ao nordeste da Ilha de Santa Catarina) ocupando uma área de 6,25 km² (Silva, 1990). Por se encontrar em região pouco habitada, dentro de uma reserva ecológica, este ecossistema apresenta características químicas e biológicas naturais consideravelmente preservadas.



Figura 3.2. Vista parcial do Manguezal de Ratonos.

3.1.3. Mar Virado

A Ilha do Mar Virado (**Figura 3.3**) está situada no litoral do Estado de São Paulo e está localizada a 22 km do continente, entre as enseadas da Fortaleza e do Mar Virado, e possui uma área de aproximadamente 800000 m². A vegetação local é composta essencialmente por espécies integrantes da Mata Atlântica.



Figura 3.3. Vista parcial da Ilha do Mar Virado.

3.2. Coleta dos sedimentos

Os sedimentos lacustre e estuarino, do fundo da Lagoa do Peri e da Enseada de Ratonos, respectivamente, foram coletados, com o auxílio de uma embarcação, através de amostradores do tipo van Veen, capacidade para 1000 g, por um mergulhador autônomo, munido de um cano de PVC de 100 mm de diâmetro x 1000 mm de altura. As amostras de sedimento sob vegetação foram coletadas manualmente com o auxílio de uma pá pequena de jardim. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Hidrogeoquímica do Núcleo de Estudos do Mar (NEMAR), sendo efetuadas análise granulométrica e de teor em matéria orgânica. As amostras foram lavadas para retirada de sais solúveis, secas em estufa à temperatura inferior a 60°C, tamizadas, pulverizadas em grau de porcelana e homogeneizadas para posterior separação granulométrica.

Após a passagem em coluna vibratória e num jogo de peneiras Granutest, tomou-se 100 g de cada amostra de sedimento e deu-se início à etapa de extração.

A amostra de sedimento da Ilha do Mar Virado foi coletada nas águas que circundam a ilha, em uma estação pré-definida. Imediatamente após a coleta, os sedimentos foram armazenados em uma câmara refrigerada e encaminhados para o Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Universidade de São Paulo (UNESP), onde foram processados e preparados para o processo de extração.

3.3. Designação das amostras

Os ácidos húmicos **AHP1**, **AHP7** e o ácido fúlvico **AFP4**, representando um material de origem lacustre, foram extraídos de sedimentos da Lagoa do Peri (**Figura 3.4**). Os ácidos húmicos **AHMR1**, **AHMR2**, **AHMR7**, **AHMR8** e **AHMR11** e ácidos fúlvicos **AFMR2**, **AFMR7**, **AFMR8** e **AFMR11**, de origem estuarina foram extraídos de sedimentos do Manguezal de Ratonos (**Figura 3.5**). Os AH e AF, **AHMV1** e **AFMV1**, respectivamente, de origem marinha, foram extraídos de sedimentos da Ilha do Mar Virado (**Figura 3.6**).

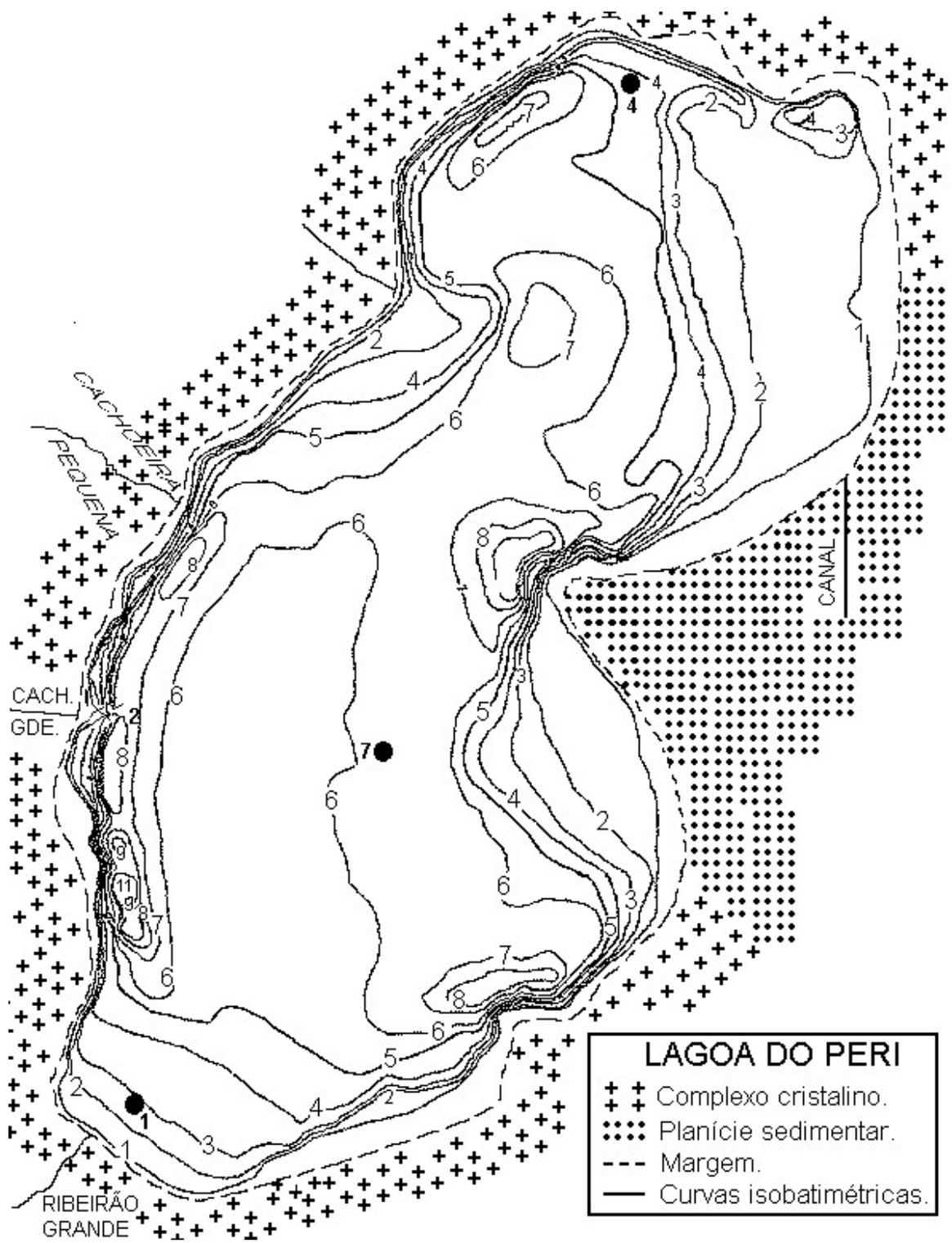


Figura 3.4. Pontos de coleta na Lagoa do Peri.



Figura 3.5. Pontos de coleta no Manguezal de Ratoes.



Figura 3.6. Ponto de coleta no Mar Virado.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

4.1.1. Solventes e reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

O pireno (98%) e o naftaleno (99%) são provenientes da Sigma, e foram usados sem tratamento.

A água foi destilada e purificada pela passagem por um sistema de troca iônica do tipo Milli-Q Water, com condutividade específica menor que $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

4.1.2. Resinas

As resina Supelite XAD-8 e Amberlite 200 foram adquiridas da *Supelco Inc.* e, previamente purificadas segundo a metodologia proposta por Thurman e Malcolm (1981), e o próprio fabricante, descrita também por Giovanela *et al.*, 2004:

4.2. Extração das substâncias húmicas

As SH de origem lacustre, estuarina e marinha foram extraídas e purificadas conforme o protocolo recomendado pela IHSS. O fluxograma da **Figura 4.1** mostra, de maneira simplificada as etapas envolvidas no processo de extração, descritas a seguir.

O AH Aldrich, usado como modelo de um material isento de influências de MO aquática, foi submetido a um processo de purificação idêntico àquele aplicado as SH extraídas no presente trabalho.

O padrão de matéria orgânica aquática natural (MON), Suwannee River (IR101N), adquirida da IHSS foi utilizada em sua forma comercial.

ETAPAS PARA EXTRAÇÃO DE AH E AF DE SEDIMENTOS

1- LAVAGEM ÁCIDA

- Hidratar 100 g de sedimento com H₂O destilada até formar uma pasta
- Adicionar 1 L de HCl 0,1 M e agitar por 1 h
- Repouso por 24 h tampado, para decantação do sedimento
- Retirar sobrenadante por sifonação

2- LAVAGEM BÁSICA

- Adicionar ao precipitado 1 L de NaOH 0,1 M
- Agitar por 4 h sob atmosfera de N₂ e deixar em repouso por 48 h

3- DESCARTE DO QUE NÃO É AH E AF

- Separar o sobrenadante por sifonação e filtrar
- Centrifugar o precipitado (descartar precipitado)

4- SEPARAÇÃO ENTRE AH E AF

- Adicionar HCl 6 M até pH ~1
- Após repouso de 24 h, separar por sifonação e centrifugação
- AH = precipitado / AF = sobrenadante

5- TRATAMENTO DO AF

- Preparar coluna com a resina XAD-8
- Passar: 1 L de HCl 0,1 M para igualar pH da coluna ao pH do AF
- 0,5 L de AF (vazão ~ 1gota/segundo)
- 1,5 L de H₂O para retirar sais
- 0,6 L de NaOH 0,1 M para retirar AF da resina
- Retirar resina para purificação

6- TRATAMENTO DO AH

- Adicionar ao precipitado (AH) 0,5 L de solução HCl/HF (0,1/0,3 M) e colocar sob agitação magnética, em frasco plástico, por 12-18 h
- Congelar e descongelar, descartar sobrenadante
- Lavar AH com água gelada para manter AH insolúvel
- Testar reação do sobrenadante com AgNO₃, quando não reagir mais, diluir o precipitado em NaOH 0,1 M

7- ELUIÇÃO DO AH E AF NA RESINA IRA 200

- Preparar coluna com a resina IRA 200 (troca iônica)
- Passar: AF / AH 5 X pela coluna e após, passar H₂O destilada até sair gota transparente
- Retirar resina IRA 200 para purificação

8- ROTA-EVAPORAÇÃO/ LIOFILIZAÇÃO

- Rotaevaporar AH / AF até um volume de ~ 50 mL
- Congelar em balões de fundo chato
- Liofilizar

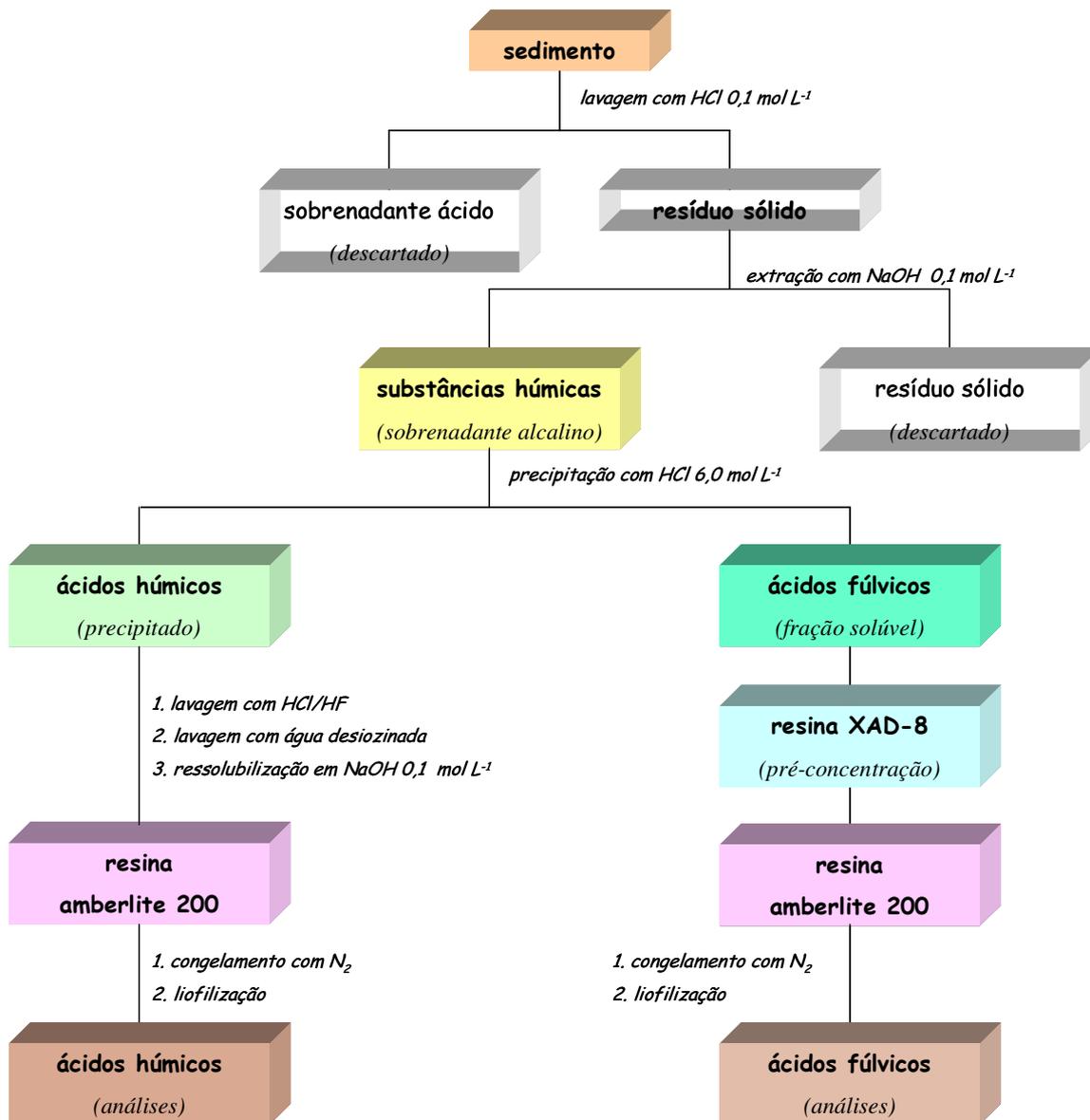


Figura 4.1. Representação esquemática das etapas envolvidas no processo de extração e purificação das substâncias húmicas.

4.3. Caracterização química e espectroscópica das amostras

A análise elementar foi realizada em um analisador elementar CHNS modelo EA 1100, da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

Os espectros de infravermelho (~2 mg da fração em pastilha de KBr) foram registrados em um espectrofotômetro FTIR da Perkin Elmer modelo 16 PC.

4.4. Preparação das soluções

a) *Soluções estoque*

As soluções estoque de SH foram preparadas a 1000 ou 2000 mg L⁻¹ (dependendo da quantidade de amostra obtida na extração) da seguinte forma: colocou-se a quantidade necessária de SH num balão volumétrico e adicionou-se água Milli-Q até cerca de 40 % do volume total. Submeteu-se a solução ao ultrassom (USC 1450, Unique) por 1 h, ajustou-se o pH a 7 (KOH), e finalmente, completou-se o volume com água Milli-Q.

Depois de preparada, cada solução foi filtrada em membranas de microfibras de vidro (GF/C, 47 mm, Watman) previamente calcinadas a 500°C durante 1 h.

Soluções estoque de pireno e naftaleno (0,01 mol L⁻¹) foram preparadas usando-se etanol ou ciclohexano como solventes.

Para ajustar as soluções nas concentrações de trabalho, adicionou-se uma alíquota da solução estoque em balões volumétricos, completando-se seu volume com água Milli-Q ou soluções de eletrólitos, dependendo do caso.

b) *Efeito do pH*

Para medir os efeitos da variação do pH na tensão superficial das soluções de SH, foram preparadas soluções (50 mL) na concentração de 30 mg de SH L⁻¹. Cada uma das soluções foi subdividida em duas porções, sendo 25 mL acidificados (HCl) e 25 mL alcalinizados (KOH).

Para avaliar este efeito através do monitoramento da fluorescência, 100 mL de soluções a 30 mg L^{-1} foram preparadas e após, subdivididas em porções de 10 mL cada. O pH destas soluções foi ajustado individualmente, sendo que quando em presença de eletrólitos e/ou HPAs, o pH foi ajustado após a adição destes.

O pH foi medido num pHmetro TEC2 da Technal, à temperatura ambiente ($\sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$).

c) Efeito da adição de eletrólitos

Para avaliar o efeito na adição de eletrólitos, foram preparadas soluções de 30 mg de SH L^{-1} usando-se, ao invés de água Milli-Q, soluções de NaCl ou MgCl_2 de forma que a força iônica (I) final da solução fosse de 0,3 ou 0,11, dependendo do caso. Estas soluções permaneceram em repouso por um mínimo de 2 h após seu preparo, antes de serem submetidas a qualquer avaliação. Estes valores de I foram escolhidos para aproximar as condições experimentais das condições encontradas em ambientes aquáticos naturais costeiros.

d) Efeito da adição de HPAs

Para preparar as soluções HPAs-SH-água, uma alíquota de solução estoque necessária para atingir uma concentração final de 10^{-7} , 10^{-6} ou $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de HPAs, foi introduzida num balão volumétrico, evaporado o solvente, sendo então, acrescentada a solução de SH (10, 30 ou 50 mg L^{-1} , com ou sem eletrólito, dependendo do caso) e submetida ao ultrassom por 1 h repousando, em seguida, por 24 h no escuro.

4.5. Medidas da tensão superficial

As medidas de TS foram feitas num tensiômetro Krüss, modelo K8, pelo método do anel (Pt-Ir, 20 mm) à 22°C (banho MQBTC 99-20, Microquímica Ind. e Com. Ltda.). Todas as medidas foram feitas em triplicata.

4.6. Medidas de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram registrados em um espectrofluorímetro Perkin Elmer, modelo LS5, à temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$), usando uma cubeta de quartzo (3 mL), com fendas de entrada e saída de luz, de 5 e 2,5 nm, respectivamente. Os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) utilizados foram 334 e 240 nm. O primeiro λ_{exc} foi usado para monitorar a fluorescência do pireno e o segundo de modo a minimizar a influência da fluorescência das SH (Engebretson e von Wandruszka, 1998; Sierra *et al.*, 2001). A faixa de comprimentos de onda monitorada para todos os espectros foi de 350 a 600 nm, sendo realizado um branco com água Milli-Q, antes de cada seção de trabalho. O programa não permite a subtração do branco, portanto os espectros mostrados aqui são os espectros não corrigidos. As razões I_1/I_3 do pireno (medidas no $\lambda_{\text{exc}} = 240$ nm) aqui mostradas são o resultado da média de três replicatas.

4.7. Influência das SH na solubilidade de HPAs em água

a) Cromatografia Gasosa (CG)

A partir de uma solução de pireno em ciclohexano, uma curva de calibração foi preparada com as seguintes concentrações: 0,1; 1,0; 2,5; 10; 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Foram preparadas soluções de AH-pireno, em triplicata, nas concentrações de 10, 30 e 50 mg de AH Aldrich L^{-1} e 100 μmol de pireno L^{-1} , adicionando-se uma alíquota da solução estoque de pireno etanólico no frasco volumétrico e, após evaporado o etanol, adicionando-se as soluções de AH. Estas soluções foram submetidas ao ultrassom, por 1 h, e permaneceram em repouso, no escuro, por 72 h. Com uma micropipeta, foram retirados 5 mL de cada solução AH-pireno e colocadas em frascos de extração, nos quais foram adicionados igual volume do solvente ciclohexano. Para a extração, a mistura foi agitada num agitador horizontal por 24 h. Ao término deste tempo, o solvente foi separado com uma micropipeta e a ele foi adicionado o padrão interno hexadecano deuterado ($\text{C}_{16}\text{D}_{34}$), foi então evaporado sob atmosfera de nitrogênio, avolumado e as áreas medidas por meio da técnica de cromatografia gasosa (cromatógrafo Shimadzu GC 17^A, da Central de Análises do Departamento de Química da

UFSC), sob as seguintes condições experimentais: temperatura inicial à 100° C e temperatura final de 310° C, com taxa de aquecimento de 10° C min⁻¹; com uma coluna do tipo DB1 de medidas 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

b) Transferência de pireno por fluxo de N₂

Para avaliar de forma quantitativa a influência da concentração e do pH das soluções de SH na solubilização do pireno em solução aquosa, adaptou-se um experimento baseado no fato de que moléculas de pireno em solução aquosa podem ser evaporadas por meio de borbulhamento com gás N₂ (von Wandruszka *et al.*, 1997). A idéia era verificar se a presença de SH em ambientes contaminados por HPAs afeta a biodisponibilidade destes.

Prepararam-se soluções nas concentrações 10, 30 e 50 mg L⁻¹ de AH com pireno (1 µmol L⁻¹), ajustando-se o pH em 4,0; 6,5 e 9,0. Um volume de 100 mL de cada uma destas soluções foi colocado no recipiente apropriado mostrado no aparato da **Figura 4.2**. Neste recipiente, as soluções foram purgadas com gás N₂, sendo o gás excedente transportado ao outro recipiente contendo uma solução receptora de solvente hidroorgânico (etanol:água; na proporção 2:1).

Cada solução de AH foi submetida ao fluxo de N₂ por 2 h, com uma vazão controlada em 5 L min⁻¹. Em seguida, a solução receptora foi submetida à análise de fluorescência, nas mesmas condições descritas no **item 4.6**, sendo que foi utilizado para este experimento apenas o λ_{exc} = 334 nm. Os espectros das soluções hidroalcoólicas foram então comparados aos espectros de calibração feitos anteriormente com diferentes concentrações de pireno em solução etanol:água (2:1).

O sistema de transferência do pireno foi lavado abundantemente com H₂O e etanol, antes de cada troca de solução, para prevenir a adsorção do pireno nas paredes dos vidros. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

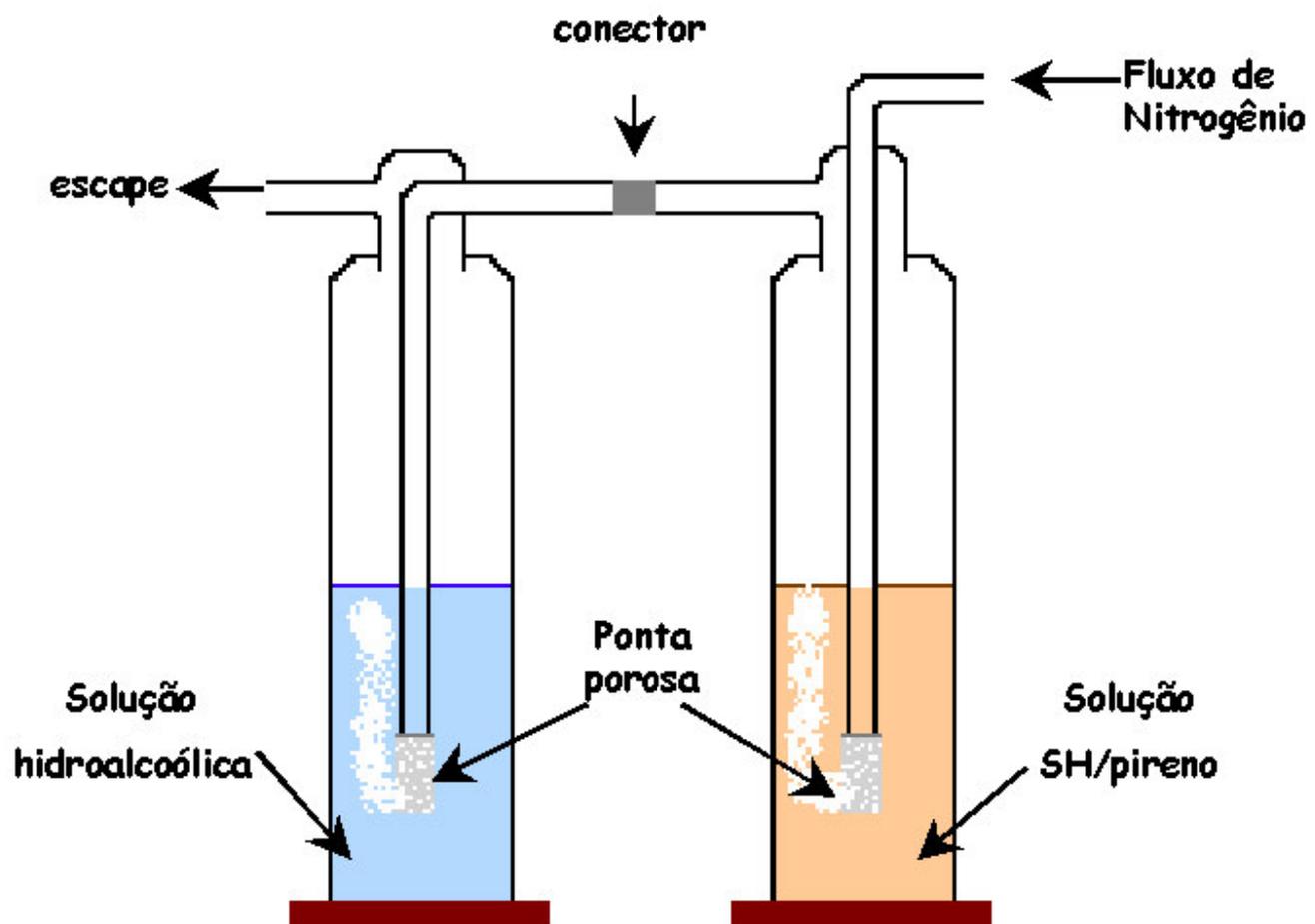


Figura 4.2. Ilustração do transferidor de pireno por fluxo de N_2 .

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise elementar

As SH são constituídas essencialmente de carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), enxofre (S) e fósforo (P), sendo C e O os elementos mais abundantes, seguidos do H e N. O conteúdo de enxofre varia desde quantidades traço até algumas unidades por cento, dependendo da origem da amostra e o conteúdo em P é geralmente muito baixo (Stevenson, 1994; Rice e MacCarthy, 1991; Rashid, 1985).

A composição elementar das SH também varia de acordo com a fonte de MO e o local de sua formação. Fatores como vegetação, clima e tipo de ambiente influenciam diretamente no processo de humificação, determinando de certa forma, as características químicas das SH originadas.

A **Tabela 5.1** apresenta a composição elementar das substâncias húmicas do presente estudo. Os valores encontram-se dentro daqueles citados na literatura (Rice e MacCarthy, 1991).

As relações atômicas H/C e N/C refletem as características estruturais das SH e têm sido freqüentemente utilizadas para estabelecer o grau de condensação, a fonte de MO, as transformações diagenéticas, bem como as condições ambientais sob as quais as SH foram formadas. Sedimentos marinhos, por exemplo, sendo anaeróbios ou menos aerados que solos superficiais e tendo uma fonte de MO mais alifática e relativamente rica em nitrogênio, produzem SH com maiores razões H/C e N/C (Rashid, 1985; Rice e MacCarthy, 1991; Sierra *et al.*, 2005). Amostras tipicamente terrestres, por outro lado, apresentam uma composição mais rica em ligninas, devido ao aporte de vegetais superiores, apresentando conseqüentemente menores razões H/C e N/C (Sierra *et al.*, 2005). Segundo Rice e MacCarthy (1991) o grau de alifaticidade dos AH decresce de acordo com a ordem: marinho > água doce > solo.

Tabela 5.1. Composição elementar das SH estudadas.

AMOSTRA	C (%)	H(%)	N(%)	S(%)	H/C	N/C	Cinzas(%) ¹
ÁCIDOS FÚLVICOS							
MV1	43,9	5,0	2,2	2,4	1,36	0,04	3,1 ± 0.3
MR2	38,9	4,7	2,3	2,7	1,44	0,05	10,0 ± 0.2
MR8	33,7	4,2	1,1	-	1,48	0,03	12,0 ± 0.2
P4	36,7	4,0	2,2	1,3	1,30	0,05	6,9 ± 0.4
ÁCIDOS HÚMICOS							
MV1	49,7	6,1	3,9	1,8	1,46	0,07	5,3 ± 0.2
MR1	44,5	4,8	3,9	1,7	1,30	0,08	nd
MR2	31,6	4,0	3,2	1,4	1,50	0,09	nd
MR7	37,5	4,3	2,3	1,6	1,34	0,05	10,0 ± 0,2
MR8	51,7	5,9	4,2	1,8	1,36	0,07	8,0 ± 0.2
MR11	50,2	5,6	3,6	nd	1,33	0,06	8,0 ± 0,2
P1	51,1	5,6	3,4	2,4	1,31	0,06	6,0 ± 0.2
P7	48,1	5,7	4,3	1,7	1,41	0,08	7,2 ± 0.2
ALDRICH	60,2	5,7	1,3	1,3	1,13	0,02	15,6 ± 0.3
MATÉRIA ORGÂNICA AQUÁTICA NATURAL (IHSS)							
MON	52,5	4,2	1,1	0,7	0,95	0,02	nd

$$H/C = [(\%H / \%C) * 12.011] / 1.00794$$

$$N/C = [(\%N / \%C) * 12.011] / 14.0067$$

¹ O desvio padrão foi calculado pela média de triplicatas.

Estas tendências são confirmadas pelos valores aqui medidos. O AH Aldrich (purificado), por exemplo, como representante de SH isenta de influência aquática apresenta os menores valores das razões H/C e N/C, indicando um maior grau de insaturação e um conteúdo menor de nitrogênio do que nos outros casos. As outras amostras foram obtidas de sedimentos com aportes tanto terrestres quanto aquáticos, marinhos ou não, dependendo do caso. O ácido fúlvico AFMR2 e os ácidos húmicos AHMR1 e AHMR2, por exemplo, foram extraídos de amostras de sedimentos estuarinos coletadas sob a coluna d'água, na

desembocadura do Rio Ratonos tendo, conseqüentemente, forte predominância da matéria orgânica aquática marinha, o que se reflete nos valores elevados das razões N/C. As outras amostras de estuários (AFMR8, AHMR7, AHMR8, AHMR11), foram obtidas de sedimentos localizados em zonas de inundação alternada por águas marinhas, recebendo ainda material proveniente da vegetação terrestre circundante, apresentando assim valores intermediários das razões H/C e N/C.

As SH lacustres (AFP4, AHP1 e AHP7) também foram extraídas de sedimentos coletados sob a coluna d'água, entretanto, por ser um lago costeiro de água doce, sem influência marinha, o material aí encontrado tem características próprias, uma vez que tem forte influência da vegetação local.

O AHMV1, extraído de sedimentos marinhos apresenta um elevado valor da razão H/C mostrando um elevado grau de alifaticidade em relação às outras amostras. Estas e outras variáveis (grau de humificação, por exemplo) contribuem para as pequenas diferenças observadas entre as composições elementares das amostras estudadas.

A amostra de MO natural aquática Suwannee River foi adquirida da IHSS, sendo que a MO dissolvida, encontrada neste ambiente, é proveniente da decomposição recente de vegetação típica pantanosa (Malcolm *et al.*, 1995). Esta amostra não foi obtida pelo mesmo procedimento das outras SH deste trabalho, por isso não se pode avaliar se as diferenças entre elas são devido às características da MO propriamente ditas ou ao método de extração.

5.2. Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (IV) tem sido amplamente utilizada na análise de SH, existindo na literatura uma quantidade razoável de informações e dados resultantes desta técnica (Lobartini e Tan, 1988; Kawahigashi *et al.*, 1996). Sua importância reside no fato, de através dela, ser possível obter informações sobre o tipo de grupos funcionais presentes nas estruturas, estabelecer a presença ou ausência de impurezas inorgânicas e ainda, analisar as interações entre SH-metal (Stevenson, 1994).

A **Tabela 5.2** relaciona as principais bandas de absorção dos espectros de absorção no IV, em geral observadas para SH e, nas amostras deste estudo. A **Figura 5.1** apresenta os

espectros de absorção no IV das SH estudadas. As frações extraídas em um mesmo ecossistema apresentaram espectros muito similares entre si. Assim, para melhor visualização, apenas alguns espectros estão sendo mostrados.

Tabela 5.2. Atribuições das principais bandas no IV das substâncias húmicas estudadas.

<i>N° ONDA (cm⁻¹)</i>	<i>ATRIBUIÇÕES (adaptado de Stevenson, 1994)</i>
3424-3380	Estiramento axial de O-H e N-H em ligação de hidrogênio intermolecular
2940-2840	Estiramento axial simétrico e assimétrico de C-H alifático (CH ₂ e CH ₃).
1725-1720	Estiramento axial de C=O de ácidos carboxílicos e cetonas
1660-1630	Estiramento axial de C=O de amidas (banda de amida I), C=O de quinonas e/ou C=O ligados ao hidrogênio de cetonas conjugadas
1630-1600	Estiramento axial de C=C do anel aromático
1650-1580	Estiramento simétrico de COO ⁻
1590-1520	Deformação angular de N-H de amidas (banda de amida II) e estiramento axial de C=N
1500-1400	Estiramento axial de C=C do anel aromático
1400-1380	Deformação angular de O-H de ácidos carboxílicos, deformação angular simétrico e assimétrico de C-H, estiramento axial C-O de OH fenólico, estiramento assimétrico de COO ⁻
1280-1220	Estiramento axial de C-O e deformação angular de O-H de ácidos, estiramento C-O de aril -éteres, ésteres e fenóis
1100-1050	Estiramento de C-O de polissacarídeos ou vibração de impurezas (ex. Si-O).
600-560	Vibração de C-C alifático.

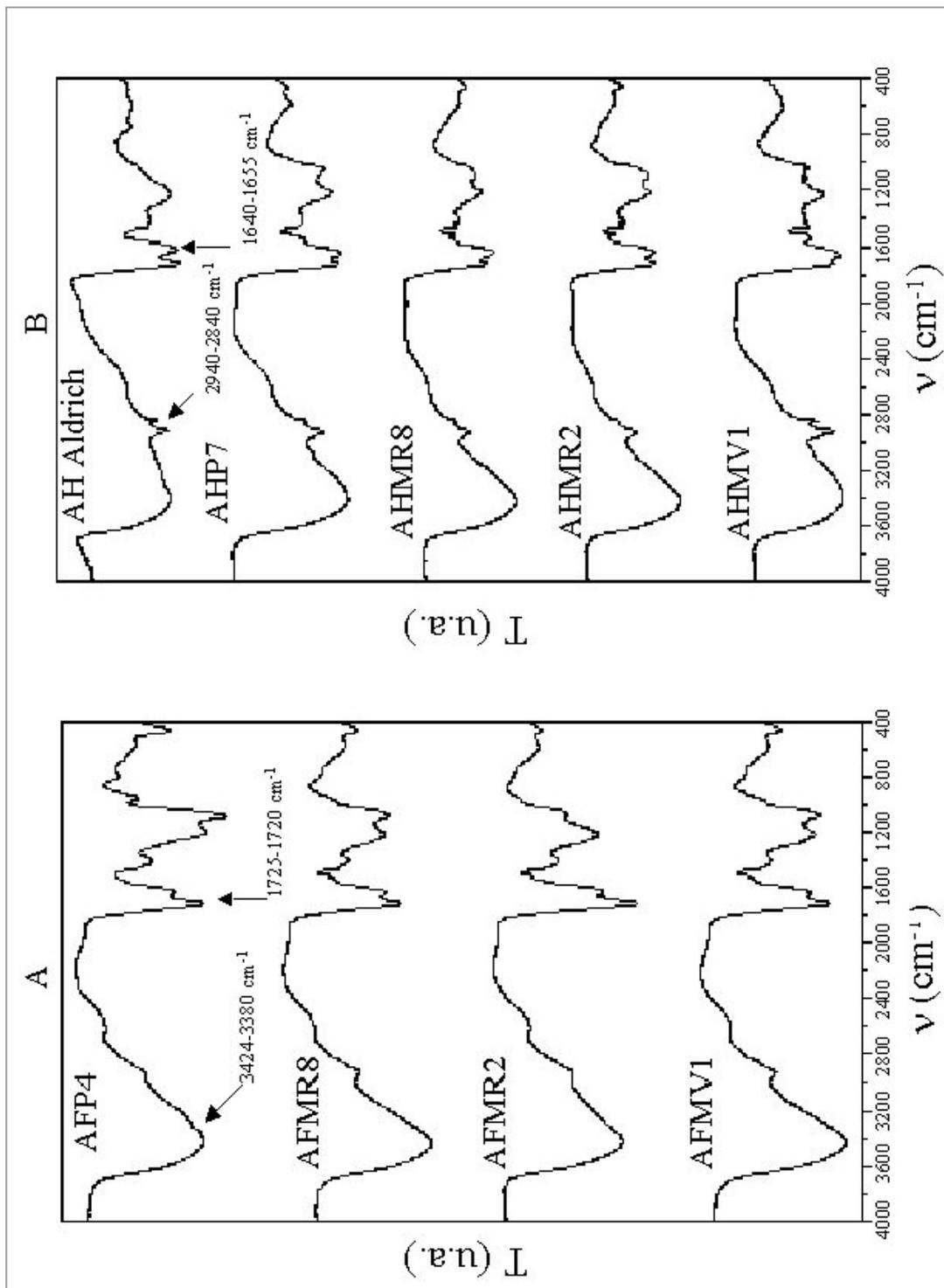


Figura 5.1. Espectros de absorção no IV das SH estudadas. (A) AF e (B) AH.

Numa avaliação generalizada dos espectros, pode-se supor uma estrutura rica em anéis aromáticos intercalados por cadeias alifáticas saturadas. Percebe-se que as bandas mais marcantes entre as SH, como as que representam OH de álcoois e fenóis ($3424\text{--}3380\text{ cm}^{-1}$), carboxilas aromáticas e alifáticas ($1725\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$), $\text{-CH}_2\text{-}$ alifáticos ($2940\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$) e amidas primárias ($1640\text{--}1655\text{ cm}^{-1}$), repetem-se em todas as amostras, atestando a similaridade entre as estruturas. Esta similaridade pode ser reforçada devida à metodologia de extração que funciona como uma espécie de filtro para a obtenção de um tipo específico de material, porém continua evidente uma identidade comum para as SH. Por outro lado, também é possível observar certas características das frações de SH que permitem explicar o comportamento particular dos AH e AF em água, assim como as diferenças entre as amostras da mesma fração, devido à sua origem ou mesmo às etapas no processo de purificação. Os espectros de AH, por exemplo, apresentam a banda relativa ao estiramento de C-H alifático ($2940\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$) melhor definido, sugerindo uma maior incidência de cadeias alifáticas nestes, em relação aos AF. Outra característica marcante identificada nestes espectros é a banda referente ao estiramento C=C de anel aromático e dos estiramentos C=O de amidas ($1660\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$). Em geral, esta banda se localiza em frequências maiores e é mais proeminente do que nos correspondentes AF, concordando com as características elementares destas frações (**Tabela 5.1**), que atestam um maior conteúdo de N nas amostras de AH assim como um maior grau de insaturação destes em relação aos AF. Esta banda ainda pode sofrer deslocamentos para a direita ou para a esquerda, dependendo da fonte de MO da amostra. O estiramento C=C de aromático, por exemplo, é provavelmente responsável por esta banda em materiais derivados de lignina, enquanto a banda C=O de amida I deve prevalecer em materiais de origem protéicos, tipicamente marinhos (Giovanela, 2003; Sierra *et al.*, 2005).

Os AF, por outro lado, exibem a banda referente ao estiramento C=O de ácidos carboxílicos ($1725\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$) mais intensa que dos AH. De fato, uma maior incidência destes grupos é que torna esta fração das SH mais solúvel em água, uma vez que um alto conteúdo de grupos carboxílicos leva à formação de ligações de hidrogênio. Ainda para os AF, a banda em torno de 1080 cm^{-1} , referente ao estiramento C-O de polissacarídeos, está mais definida, enquanto para os AH a distribuição das bandas nesta região não é muito clara. Como esta faixa também compreende a região de absorção de grupos Si-O, os AH que não foram tão

purificados como os AF, podem ter a banda referente ao estiramento C-O de polissacarídeos encoberta por essa absorção.

5.3. Fatores que afetam a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos

5.3.1. Tensão superficial vs. concentração de ácidos húmicos

A **Figura 5.2** mostra a variação da TS com a concentração para soluções de AH entre 0 e 2000 mg L⁻¹ em ausência e presença NaCl ($I = 0,3$). As medidas foram feitas a pH 7 visando preservar a relevância ambiental das interpretações e, neste pH, torna-se impossível solubilizar os AH em concentrações superiores a este valor. A escolha deste valor de força iônica (I) foi baseada nos seguintes critérios: primeiro, um teste foi realizado usando quantidades crescentes de sal, numa mesma concentração de AH e, somente em concentrações de NaCl superiores a 0,2 mol L⁻¹ algum efeito foi observado na TS das soluções (Rauen *et al.*, 2001 e 2002). Segundo, um valor de força iônica desta ordem de grandeza é passível de ser encontrado num ambiente típico estuarino, onde a salinidade pode variar entre 0 e 35 g kg⁻¹. Expressa em termos de força iônica esta variação é de 0 a 0,7.

Mesmo sendo amostras de origens distintas, os AH estudados, apresentaram o mesmo padrão de comportamento. Em geral, a TS das soluções diminui sistematicamente com o aumento da concentração de AH até cerca de 1000-1200 mg L⁻¹. A partir de então a taxa de variação diminui ligeiramente levando a crer que, em alguns casos, alcançaria um valor constante em concentrações maiores. Estes dados reforçam um modelo do tipo anfifílico para os AH, resultante da presença simultânea de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos nas estruturas. Na medida em que a concentração de AH aumenta no seio da solução, a presença dos grupos hidrofóbicos promove a distorção das moléculas de água aumentando a energia livre do sistema. Como forma de minimizar a energia livre e restaurar a estrutura do solvente as moléculas de AH migram para a superfície e sua partição na interface ar-água reduz a tensão superficial da solução relativamente à da água pura (Rauen *et al.*, 2001 e 2002).

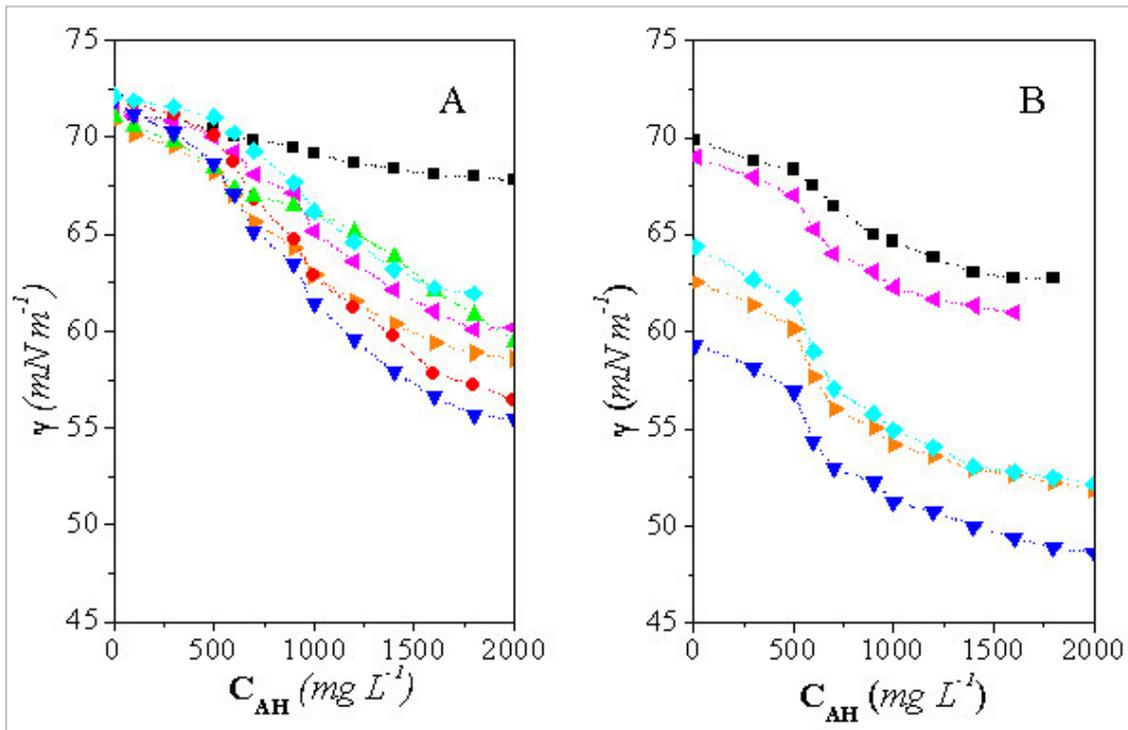


Figura 5.2. Efeito da concentração sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos; (A) em ausência e (B) em presença de NaCl ($I = 0,3$); pH = 7,0; T = 22°C. O ponto zero corresponde à TS para a água pura. ■ = AH Aldrich; ▼ = AHP1, ▲ = AHP7; ● = AHMR2, ▲ = AHMR7; ▼ = AHMR8; ◆ = AHMR11.

A diminuição na taxa de variação da TS a partir de uma determinada concentração parece indicar que os AH são capazes de se orientar ou se organizar em solução de forma a proteger suas porções hidrofóbicas das interações com o solvente, diminuindo assim o percentual de migração para a superfície (Rauen *et al.*, 2001 e 2002). Este tipo de arranjo poderia ser intramolecular, considerando-se que os AH são macromoléculas flexíveis que podem enrolar-se sobre si mesmas ou intermolecular, pela associação de um determinado número de macromoléculas (Yates e von Wandruszka, 1999). Tanto num caso como no outro, o interior das aglomerações seria relativamente hidrofóbico e o exterior mais hidrofílico. O termo “pseudomicela” tem sido usado por von Wandruszka e colaboradores (1997, 1998, 1999) para definir o primeiro tipo de arranjo.

Em relação às outras amostras, o AH Aldrich mostrou-se menos sensível no que se refere à influência da concentração na TS. Esta diferença de resposta pode estar ligada às peculiaridades estruturais entre ácidos húmicos sem e com influência aquática. Duas possibilidades podem ser consideradas: primeiro, um percentual maior de insaturações e conseqüente hidrofobicidade, no caso do AH Aldrich, podem fazer com que a concentração de agregação seja atingida antes, para este tipo de material. Assim, a pouca variação na TS superficial seria, no caso do AH terrestre, atribuída ao fato de o material já estar, desde baixas concentrações formando, em solução, agregados orientados de forma a proteger seus grupos hidrofóbicos das interações com o solvente. Uma segunda razão, que não descarta a primeira, estaria no tipo e concentração de grupos funcionais ácidos do AH Aldrich. De fato, AH de fonte terrestre são, em geral, ricos em grupos fenólicos enquanto os AH de ambientes aquáticos, contém relativamente mais grupos carboxílicos (Rashid, 1985). Assim, em pH 7, o grau de protonação dos grupos ácidos é diferenciado nas diversas amostras e deve influenciar no percentual de anfifilicidade e conseqüente capacidade das misturas húmicas de se agregarem.

Com a adição de NaCl observa-se novamente um comportamento similar entre as soluções de diferentes AH. Em cada um dos casos, em maior ou menor grau, o valor de concentração na qual ocorre uma desaceleração da taxa de migração para a superfície diminui consideravelmente, quando comparado ao valor das soluções sem adição de sal, ficando neste caso, em torno de 750 mg L^{-1} . Este comportamento pode ser explicado pela neutralização dos grupos hidrofílicos pelo íon Na^+ , aumentando o caráter anfifílico dos AH e promovendo sua migração para a superfície, mesmo em concentrações menores. Com a adição de sal é possível igualmente observar com mais nitidez a concentração crítica acima da qual a migração para a superfície cessa, tornando-se o valor da TS constante ou praticamente constante a partir deste ponto (Rauen *et al.*, 2001 e 2002).

Esta anfifilicidade é manifestada, ou não, dependendo do grau de neutralização das cargas negativas, seja pelo próton, seja pela adição de sal. Esta possibilidade de mudança de comportamento, em função das características físico-químicas do ambiente, deve ser considerada quando do estudo das interações entre a MON e xenobióticos.

O modelo pseudomicelar parece, novamente, adequar-se para descrever este tipo de comportamento. Assim, a partir desta concentração crítica de agregação que seria

correspondente à CMC dos surfactantes, as estruturas húmicas parecem rearranjar-se em agregados similares a micelas no seio da solução, cessando ou diminuindo a migração para a superfície (Rauen *et al.*, 2001 e 2002). As informações aqui obtidas contrastam com os dados mostrados por Guetzloff e Rice (1994), segundo os quais, os AH podem formar micelas em concentrações extremamente altas, mostrando que o AH Aldrich começa a formação de agregados micelares a partir da concentração de $7,4 \text{ g L}^{-1}$. Entretanto, deve-se levar em consideração que naquele trabalho o pH foi de 12,3.

Uma observação de relevância ambiental que deve igualmente ser enfatizada aqui é que mesmo que as variações na TS ocorram em percentuais diferentes, para as diferentes amostras, o valor da concentração crítica de agregação é muito semelhante entre elas. Esta uniformidade de resposta, que é igualmente observada nos efeitos da concentração e do pH, mostra que os AH, desde que tenham sido obtidos pelo mesmo processo de extração, apresentam uma identidade comum, independentemente do ambiente onde foram gerados. As implicações deste tipo de observação residem na possibilidade de se poderem elaborar modelos de comportamento que possam ser extrapolados para diferentes situações. Obs.: Este experimento não foi realizado com AF porque a quantidade de material disponível não era suficiente para a preparação de soluções muito concentradas desta fração húmica.

5.3.2. Variação da tensão superficial com o pH

A **Figura 5.3** mostra a variação da tensão superficial de soluções de AH e AF com o pH, na concentração 30 mg L^{-1} . Este valor de concentração foi escolhido por ser passível de ser encontrado em águas naturais, ricas em MO, como os estuários (Sierra, 1992).

Segundo estes dados pode-se observar que para os AH, em pHs alcalinos e nesta concentração, os valores da TS são próximos ou, em alguns casos, ligeiramente maiores ou menores do que o da água pura ($72,6 \text{ mN m}^{-1}$). Com a diminuição do pH a TS em geral diminui atingindo um mínimo entre pH 3,0 e 5,0. Perfis similares foram obtidos por Yates e von Wandruszka (1999), trabalhando com AH de rios e solos na concentração de 500 mg L^{-1} . De fato, em condições básicas, os grupos carboxílicos e fenólicos dos AH estão 100 % desprotonados, o que confere às moléculas uma configuração estendida, devido à repulsão

entre as cargas negativas. Nesta situação de concentração e pH, os AH devem estar totalmente hidrofílicos não alterando ou mesmo, em alguns casos, aumentando ligeiramente a TS, ao atrair as moléculas de água para o seio da solução devido ao aumento da entropia do sistema.

Com a diminuição do pH, ocorre a neutralização parcial das cargas negativas pelo próton, o que ocasiona a flexibilização das estruturas húmicas, aumentando o percentual de espécies anfífilas, as quais migram para a superfície. Este efeito reflete-se na diminuição da TS. Em pHs muito ácidos, as moléculas tendem a flocular, deixando a superfície, e a TS volta a subir em alguns casos. Todas as amostras aqui estudadas comportaram-se de maneira similar, com relação ao efeito do pH.

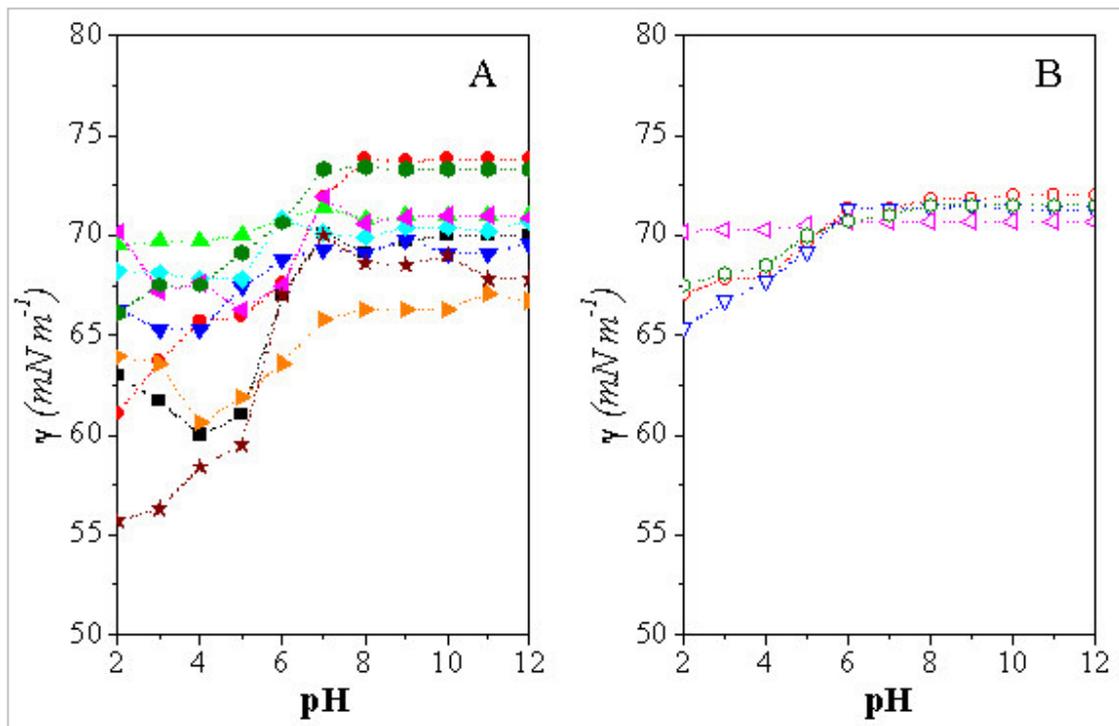


Figura 5.3. Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de (A) AH e (B) AF, na concentração de 30 mg L^{-1} ; $T = 22^\circ\text{C}$. ■ = AH Aldrich; ◀ = AHP1, ▶ = AHP7; ● = AHMR2, ▲ = AHMR7; ▼ = AHMR8; ◆ = AHMR11; ● = AHMV1. ◀ = AFP4; ○ = AFMR2; ▼ = AFMR8; ◻ = AFMV1. ★ = MON.

Para os AF, por outro lado, estes efeitos são menos evidentes e o comportamento hidrofílico se mantém constante em praticamente em toda a faixa de pH. A menor resposta apresentada pelos AF pode ser atribuída às suas características estruturais. Eles apresentam

uma maior densidade de grupos carboxílicos, assim como, uma massa molar reduzida, em comparação aos AH. Um maior número de grupamentos ácidos permite a formação de um grande número de ligações de hidrogênio com a água em todos os valores de pH, dificultando o desenvolvimento do caráter anfifílico nestas estruturas (Yates e von Wandruszka, 1999). Somente em pHs muito baixos, algum efeito é observado. A solução da amostra MON, por sua vez, mostrou um comportamento semelhante aos AH, ou seja, apresentou maior sensibilidade aos valores mais baixos de pH. Em todos os casos estudados, a faixa de pH 6,0 – 7,0, parece ser crítica no que concerne à atividade superficial das SH. Pequenas diferenças nas respostas devem estar ligadas às quantidades relativas de grupamentos ácidos que podem ser neutralizados ou não, nestes pHs, mudando assim o percentual de estruturas anfifílicas de uma amostra para outra.

Analisando algumas particularidades, percebe-se que para as amostras AHMR2 e AHMV1, os valores da TS continuam a decrescer mesmo em baixos valores de pH. O AHMR7 praticamente não apresenta valor mínimo de TS. Estas diferenças devem-se, provavelmente em parte, às distintas características estruturais das amostras, devido às suas diferentes origens, as quais lhes conferem maior ou menor solubilidade em pHs ácidos ou, ainda, ao grau de purificação de cada uma. Devido às dificuldades técnicas para obtenção de uma quantidade significativa de cada amostra, não foi possível submetê-las a um processo posterior de purificação para investigar este aspecto. Entretanto, estas pequenas diferenças não invalidam a discussão anterior, a qual descreve uma tendência geral de comportamento.

É interessante observar que, no que se refere ao efeito do pH, o AH Aldrich mostra valores mínimos de TS ainda mais baixos que dos outros AH. De fato, os AH Aldrich mostra um caráter anfifílico especialmente forte em pH 4. Assim, a pouca resposta observada no caso do efeito da concentração (**Figura 5.2**) parece estar ligada principalmente à concentração relativa e ao tipo de grupos funcionais. Note-se que a pH 7,0 (o pH em que foi analisado o efeito da concentração), o valor da TS do AH Aldrich ainda é relativamente alto, demonstrando que estas macromoléculas preferem permanecer no seio da solução, nestas condições. Somente em pH 6,0, quando se inicia a protonação dos grupos carboxílicos, faz-se sentir os efeitos da atividade superficial do AH Aldrich.

5.3.3. Efeito da força iônica sobre a TS das soluções de AH em diferentes valores de pH

Para avaliar o efeito de eletrólitos no processo de desenvolvimento do caráter anfifílico dos AH em solução, medidas da TS em função do pH foram feitas em presença de NaCl e MgCl₂, com $I = 0,3$. Cada uma das soluções foi vigorosamente agitada após a adição de sal, e deixada em repouso por 2h antes de serem realizadas as medidas, para evitar a ocorrência de variações nos resultados devido a efeitos cinéticos (Rauen *et al.*, 2004).

A **Figura 5.4** mostra o efeito da adição de (A) NaCl e (B) MgCl₂, com $I = 0,3$, no perfil TS vs. pH, para soluções de algumas amostras de AH.

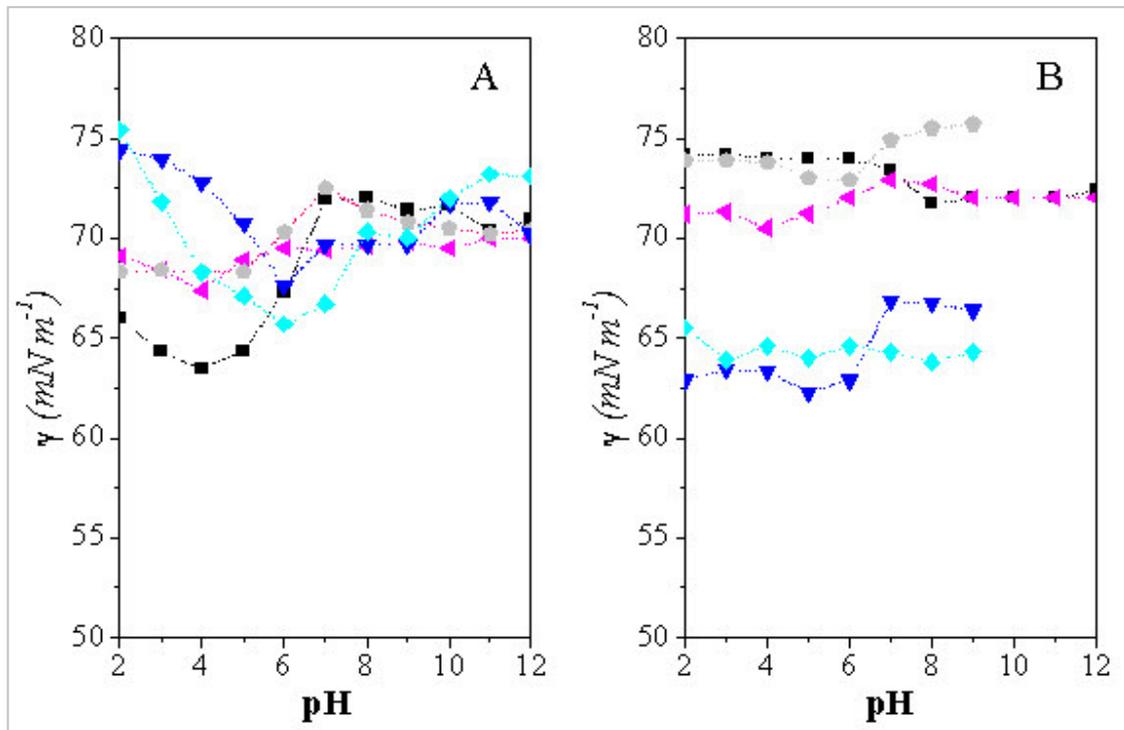


Figura 5.4. Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de AH em presença de (A) NaCl e (B) MgCl₂, na concentração de 30 mg L⁻¹; T = 22°C. ■ = AH Aldrich; ▲ = AHP1; ● = AHMR1; ▼ = AHMR8; ◆ = AHMR11.

A presença de NaCl modifica o perfil TS vs. pH. Neste perfil, o AH Aldrich assume valores mínimos de TS maiores do que os apresentados no perfil da **Figura 5.3**. Percebe-se também que os AHMR8 e AHMR11 apresentam em pH 6,0 os seus mínimos. A partir deste

valor de pH, os valores de TS das soluções destas duas amostras aumentaram rapidamente com a acidificação do meio, atingindo valores de TS maiores que da água. O AHP1 por sua vez apresentou valores de TS mais baixos do que quando em soluções com $I = 0$. Estes valores permanecem praticamente constantes por toda a faixa de pH, apresentando uma leve variação em meios mais ácidos. E o AHMR1, que havia se mostrado pouco sensível à variação do pH, com a adição de NaCl desenvolveu um leve caráter anfifílico em pHs mais ácidos, aproximando seu comportamento das outras amostras.

Este perfil pode ser explicado de maneira similar ao da **Figura 5.3**, porém, neste caso, os sítios negativos das moléculas húmicas são neutralizados pelos íons Na^+ antes mesmo de chegar a valores de pH mais ácidos.

Quando o sal é o MgCl_2 , por outro lado, os perfis ficam completamente modificados. Neste caso, tanto o AH Aldrich como AHP1 praticamente não apresentam resposta à variação do pH, ou seja, os valores de TS permanecem praticamente constantes. Para estas duas amostras não ocorre a migração de espécies anfifílicas para a superfície, e as estruturas parecem estar solubilizadas em toda a faixa de pH. Nestas condições, as moléculas destas amostras, portanto, parecem aglomerar-se de modo a protegerem seus sítios hidrofóbicos, produzindo microssistemas estáveis em meio aquoso, independente do valor de pH. Von Wandruszka e colaboradores (1997 e 1999) também observaram diferentes graus de sensibilidade à variação do pH, com adição de sais para soluções de AH de ambientes distintos. Estas diferenças podem ser explicadas conforme as características estruturais das amostras. O AH Aldrich, por exemplo, é rico em grupamentos fenólicos e os AH lacustres apresentam, além de grupamentos fenólicos, um forte sinal de grupos protéicos indicando uma alta incidência de grupos amidas (Giovanela *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2005). Ambos AH também parecem possuir muitos grupos alifáticos e apresentam uma elevada massa molar (Sierra *et al.*, 2005). A presença simultânea de cadeias alifáticas extensas intercaladas com grupamentos aromáticos pode dar às moléculas a habilidade de desenvolver domínios intramoleculares em meio aquoso. Os dados aqui apresentados sugerem que o íon Mg^{2+} é mais eficiente na promoção de estruturas húmicas com configuração aglomerada que o íon Na^+ . Engebretson e von Wandruszka (1997 e 1998) sugeriram que por ser um cátion divalente, o íon Mg^{2+} atuaria como ponte entre diferentes partes de AH macromoleculares, ou entre dois AH de cadeia menores, produzindo micro-ambientes hidrofóbicos em meio aquoso.

Para os AH estuarinos, dois efeitos são observados pela adição de cátions Mg^{2+} : enquanto o AHMR1 permanece solubilizado entre pH 2,0 e 8,0, os AHMR8 e AHMR11 desenvolvem caráter anfífilo e migram para a superfície nesta faixa de pH. Para estas três amostras ocorre floculação em pH~9,0. A hidrólise do íon Mg^{2+} , seguida da formação de complexos insolúveis, do tipo Mg-OH-HA, deve ser responsável por este efeito (Buffle, 1990). A formação destes complexos está associada à elevada incidência de grupos carboxílicos nestas amostras estuarinas, uma vez que os AH Aldrich e AHP1 não mostraram sinais de precipitação. A solubilidade do AHMR1 pode estar associada à sua pequena massa molar e elevado conteúdo de grupamentos ácidos. Os AHMR8 e AHMR11, por outro lado, que tinham desenvolvido fraco caráter anfífilo em presença de NaCl, foram fortemente afetados pela presença de $MgCl_2$. Este efeito pode ser explicado pela formação de “pontes”, pelo íon Mg^{2+} , como já foi dito anteriormente (Engelbreton e von Wandruszka, 1997 e 1998).

5.3.4. Efeito da adição de pireno/naftaleno sobre a tensão superficial das soluções de substâncias húmicas

Considerando as propriedades anfífilas supra-citadas é de se esperar que as SH tenham um papel importante na solubilização de compostos orgânicos apolares. Numa primeira aproximação, para melhor estudar estas interações, foi observado o efeito da adição de compostos orgânicos apolares (COA) como o pireno e o naftaleno na TS das soluções de SH em diferentes pHs (**Figura 5.5**).

Como se pode observar, a presença de pireno, mesmo numa concentração tão baixa, altera completamente o perfil da TS *vs.* pH para as soluções de AH. O mesmo não acontece nas soluções de AF. Para os AH, enquanto, em ausência de pireno (**Figura 5.3**), a TS das soluções de AH começa a diminuir em torno de pH 7,0, indicando a migração das espécies anfífilas para a superfície a partir deste pH, em presença de pireno, a variação da TS é muito pequena. Algumas amostras inclusive tiveram uma ligeira elevação nos valores de TS entre pH 6,0 e 7,0, indicando justamente o contrário, que as poucas moléculas que estavam na superfície voltam para a solução.

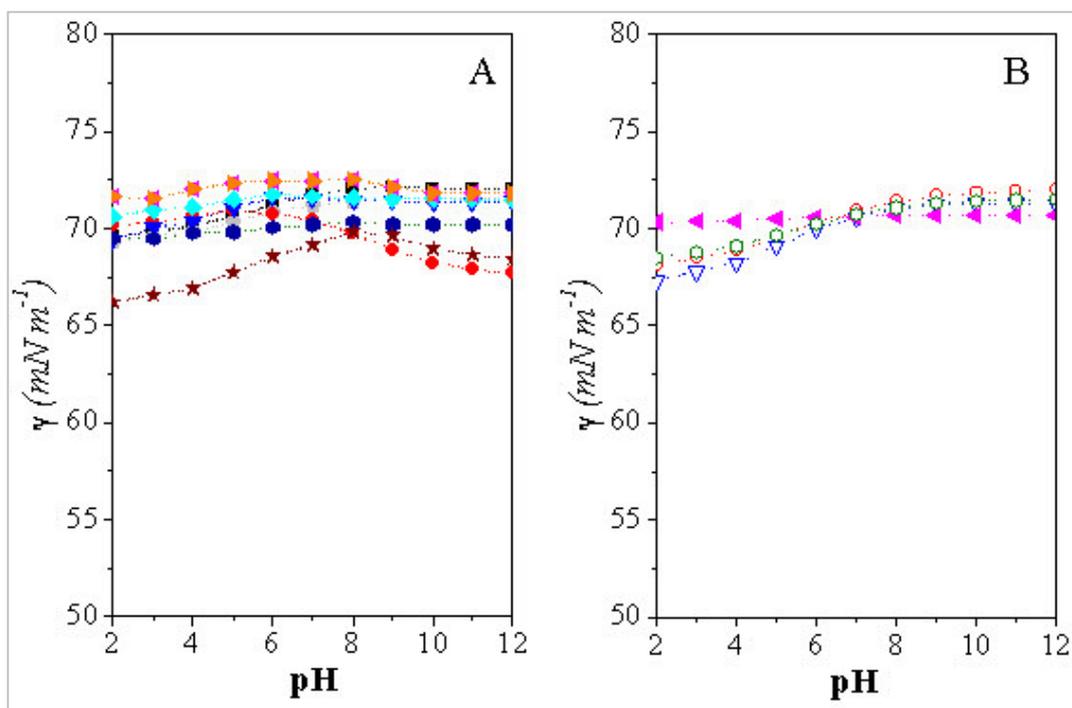


Figura 5.5. Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de substâncias húmicas. (A) AH e (B) AF, na concentração de 30 mg L^{-1} ; em presença de pireno ($0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) $T = 22^\circ\text{C}$. ■ = AH Aldrich; ◀ = AHP1, ▶ = AHP7; ● = AHMR1; ● = AHMR2, ▲ = AHMR7; ▼ = AHMR8; ◆ = AHMR11; ● = AHMV1. ◀ = AFP4; ○ = AFMR2; ▼ = AFMR8; ◻ = AFMV1. ★ = MON.

Apesar de as variações serem pequenas, este efeito é certamente mecanístico, pois todas as soluções mostraram a mesma tendência. A explicação mais plausível para este evento é de que, as moléculas de pireno, atuam como núcleos promotores para a “micelização” dos AH. Aparentemente, em pH próximo a 6,0 ou 7,0 a neutralização parcial das cargas negativas associada à interação entre as cadeias hidrofóbicas dos AH com as moléculas de pireno, promove a formação de aglomerados similares às micelas, fazendo com que as espécies anfífilas retornem ao seio da solução, aumentando assim os valores da TS. Esta configuração parece ser estável, mesmo em pHs ácidos, uma vez que a migração para a superfície não ocorre nestas condições. Já para os AF, o perfil apresentado é praticamente o mesmo que em ausência de pireno, demonstrando pouca interação entre as moléculas de AF e pireno.

Ao adicionar uma quantidade maior de pireno às soluções de SH (**Figura 5.6**), novas características do comportamento destas substâncias são evidenciadas. Nestas condições, um certo caráter anfifílico é desenvolvido por alguns AH (**Figura 5.6 A**) e por todos os AF (**Figura 5.6 B**). Para os AF, este comportamento pode ser explicado pela ocorrência simultânea de dois fatores: a competição entre as moléculas de pireno e os AF pela solvatação pelas moléculas de água, e a interação entre o pireno e as porções hidrofóbicas dos AF, enfraquecendo ou até mesmo rompendo as ligações de hidrogênio entre AF e água. Nestas circunstâncias, algumas moléculas ficam menos hidrofílicas, migrando para a superfície, diminuindo assim, os valores de TS. Para algumas amostras, este efeito já aparece em valores mais elevados de pH, mas, em geral, é mais pronunciado em valores abaixo de pH 7,0 quando a neutralização dos sítios negativos diminui de maneira mais significativa a hidrofilicidade das moléculas de AF. De um modo geral, percebe-se aqui novamente, um comportamento regular para todas as amostras estudadas.

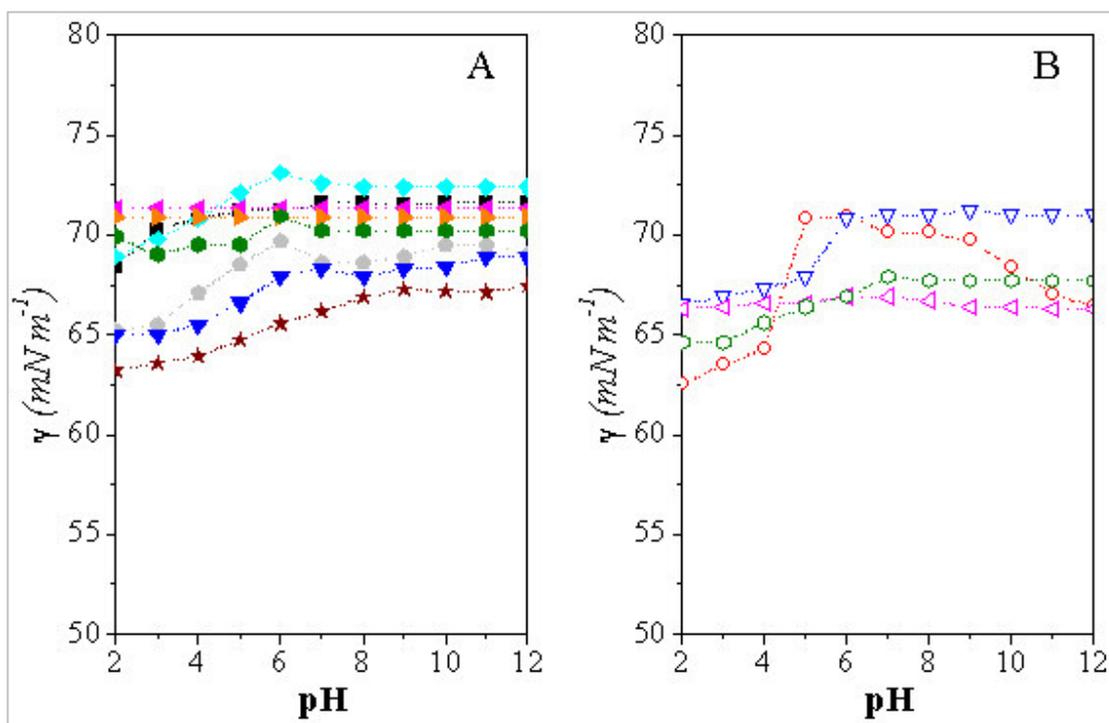


Figura 5.6. Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de substâncias húmicas. (A) AH e (B) AF, na concentração de 30 mg L^{-1} ; em presença de pireno ($1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) $T = 22^\circ\text{C}$. ■ = AH Aldrich; ◀ = AHP1, ▶ = AHP7; ● = AHMR1; ● = AHMR2; ▼ = AHMR8; ◆ = AHMR11; ● = AHMV1. ◀ = AFP4; ○ = AFMR2; ▼ = AFMR8; ○ = AFMV1. ★ = MON.

Uma explicação similar pode ser dada ao desenvolvimento do caráter anfifílico para algumas amostras de AH, quando as soluções estão com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pireno (**Figura 5.6 A**). Quando a concentração de pireno é desta ordem de grandeza, algumas destas moléculas são alocadas nos microdomínios hidrofóbicos das moléculas de AH enquanto outras ficam no meio aquoso. Nestas circunstâncias, assim como para os AF, as interações entre o pireno livre em solução e os grupos aromáticos dos “monômeros” de AH contribuem para romper as ligações de hidrogênio formadas entre AH e água, diminuindo, conseqüentemente, a solubilidade destes monômeros. Estas estruturas, menos solúveis, migram para a superfície diminuindo a TS destas soluções em pH mais ácidos. Nos AH estuarinos e para a MON este efeito é mais pronunciado, provavelmente devido ao maior número de grupos carboxílicos (que sofrem mais a influência das alterações do pH) em relação aos AH terrestres e lacustres (Rauen *et al.*, 2004).

Para melhor compreender o modo de interação entre as SH em solução e os COA, monitorou-se também as variações ocorridas na TS das soluções de SH perante a presença simultânea de pireno e sal (NaCl e MgCl_2) (**Figura 5.7**).

Nestas condições, novamente são observados comportamentos diferenciados entre as amostras. Para as amostras AHP1, AH Aldrich e AHMR1, os perfis são semelhantes aos apresentados por estas em soluções contendo apenas pireno (**Figura 5.5 A**). Praticamente não ocorre migração das moléculas para a superfície, indicando principalmente, que as espécies estão dispersas em solução pelas razões já explicadas anteriormente, ou seja, para o AHP1 e para o AH Aldrich, provavelmente ocorre a formação de domínios similares a micelas enquanto para o AHMR1, provavelmente é devido à sua maior capacidade de solubilização, uma vez que este demonstrou comportamento hidrofílico em toda a faixa de pH quando em soluções sem sal e sem pireno. A presença simultânea destes dois componentes afetou a surfactância das amostras AHMR8 e AHMR11. O perfil apresentado é diferente daqueles observados nos experimentos com adição de NaCl (**Figura 5.4 A**) e com adição de pireno (**Figura 5.5 A**). Aqui, as estruturas permanecem na superfície em valores de pH mais ácidos (são mais anfifílicas que nas condições experimentais anteriores). Acima de pH 8 com a desprotonação, o caráter anfifílico destas amostras diminui e suas moléculas mergulham na solução, aumentando os valores da TS. Porém, este aumento na TS não é o suficiente para configurar a formação de estruturas similares às micelas, como visto para os AH Aldrich e

AHP1. O comportamento dos AHMR8 e AHMR11 pode estar relacionado à sua baixa massa molar e menor conteúdo de anéis aromáticos em relação às outras amostras.

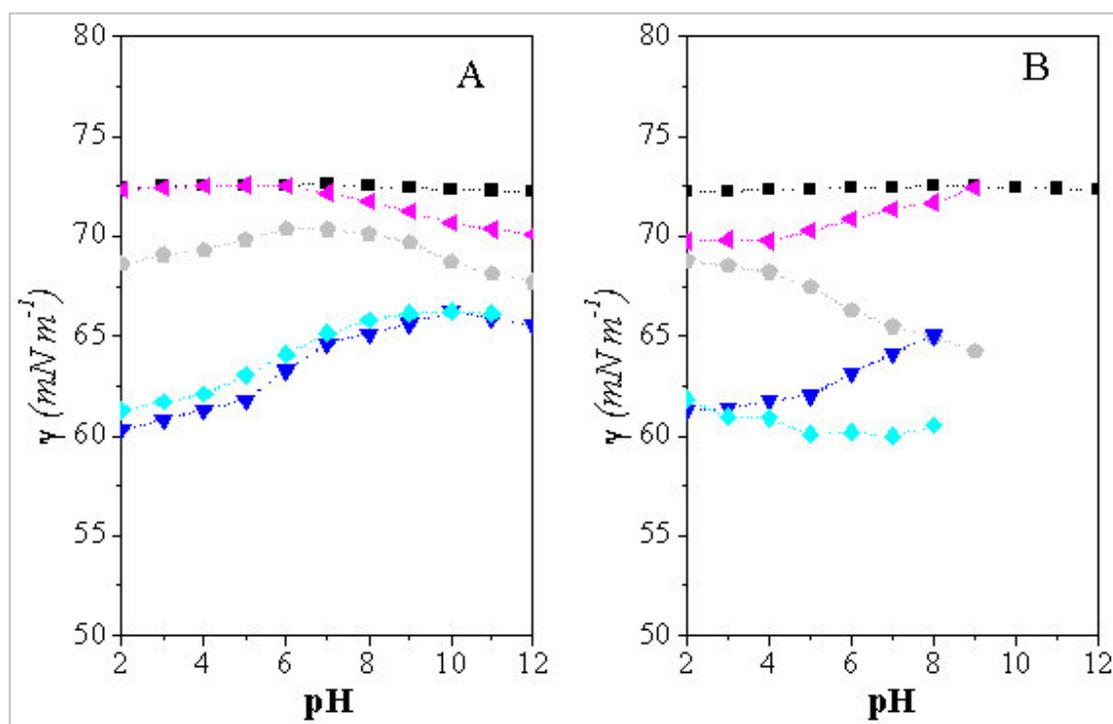


Figura 5.7. Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos em presença de (A) NaCl e (B) MgCl₂, na concentração de 30 mg L⁻¹, em presença de pireno (0,1 μmol L⁻¹); T = 22°C. ■ = AH Aldrich; ▲ = AHP1; ● = AHMR1; ▼ = AHMR8; ◆ = AHMR11.

Para as soluções contendo simultaneamente pireno e MgCl₂ (**Figura 5.7 B**), é possível observar o desenvolvimento de algum caráter anfifílico para a amostra AHMR1 em valores de pH abaixo de 7,0 o que não era observado em outras condições experimentais. A floculação dos AH estuarinos em pH alcalino é novamente observada, devido à presença significativa de grupamentos carboxílicos nas amostras destes ambientes, que favorece a formação de complexos insolúveis (**item 5.3.3**), o que não ocorre com o AH Aldrich e AHP1. Nestas condições, de um modo geral, os valores de TS são bastante irregulares, e mostram

praticamente as mesmas tendências de comportamento de quando as soluções estavam apenas em presença de MgCl_2 .

Através da **Figura 5.8**, pode-se perceber a diferença de comportamento das soluções de AH Aldrich, AHMR8 e NOM, com adição de outro COA, o naftaleno. Para fins de comparação, o naftaleno foi adicionado na mesma concentração que o pireno ($0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$). Para melhor visualizar o comportamento destas amostras, repetiu-se aqui o perfil TS vs. pH destas três SH, já apresentados e discutidos nas **Figuras 5.3-A e 5.6-A**.

Nestas três amostras, pode-se perceber que a presença de naftaleno criou uma situação intermediária no comportamento anfifílico destas substâncias. Os valores de TS não ficaram tão constantes quanto os valores de TS das soluções em presença de pireno, mas tiveram uma variação menor do que nas soluções contendo apenas as SH. Em geral, os valores de TS, mesmo na faixa alcalina, ficaram mais baixos que nas outras condições experimentais.

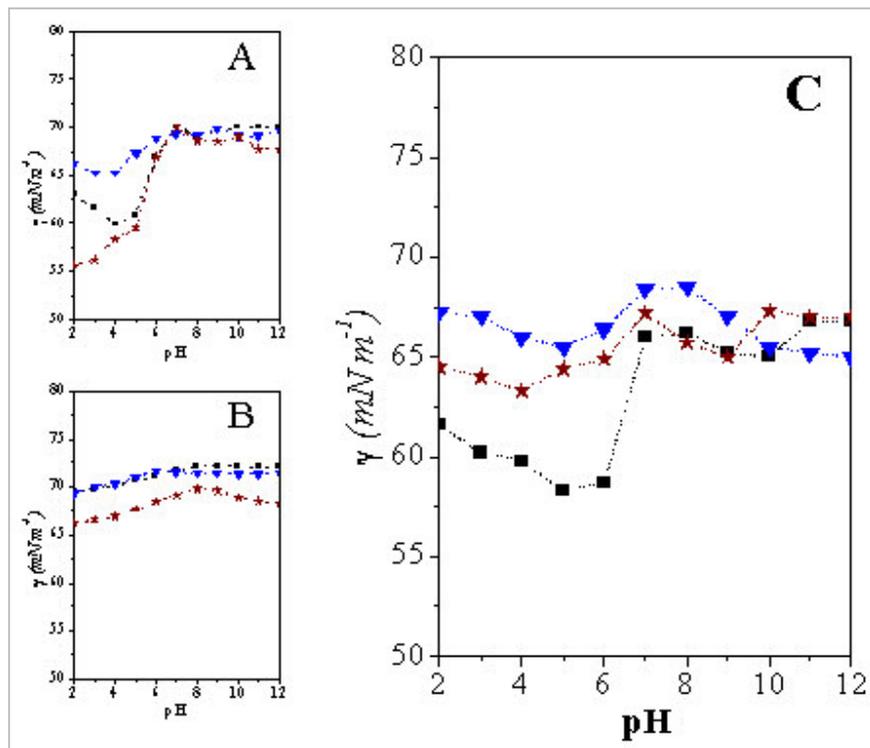


Figura 5.8. Efeito do pH sobre a tensão superficial das soluções de ácidos húmicos na concentração de 30 mg L^{-1} , em (A) ausência de pireno e naftaleno, (B) presença pireno ($0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (C) presença de naftaleno ($0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$); $T = 22^\circ\text{C}$. ■ = AH Aldrich; ▼ = AHMR8; ★ = NOM.

Analisando as amostras individualmente, percebe-se que ocorreu uma mudança mais significativa no perfil da amostra MON, na presença do naftaleno do que as amostras AH Aldrich e AHMR8, principalmente em pHs ácidos. Os AH Aldrich e AHMR8, por sua vez, em pHs mais baixos, apresentaram valores mínimos de TS muito próximos dos valores em ausência de COA, mas num pH maior (~6, neste caso).

Pelo menos dois fatores levam a este comportamento diferenciado para o naftaleno em relação ao do pireno (**Figura 5.9**): a sua menor massa molar e sua maior solubilidade em água ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$ contra $2\text{-}3 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ para o pireno). Isto faz com que o naftaleno esteja mais estável em meio aquoso do que o pireno e mostre menos tendência a se alojar nos microambientes hidrofóbicos gerados pelas SH. Também em presença de naftaleno, ao contrário do caso do pireno, uma parte das moléculas húmicas permanece na superfície em toda a faixa de pHs (observe que os valores da TS são mais baixos do que o da água pura, mesmo em pHs mais básicos) o que indica que o naftaleno não é tão eficiente na formação de aglomerados micelares como o pireno. Este tipo de observação leva mais uma vez à conclusão de que o pireno é um coadjuvante da “micelização” das SH observada nos estudos anteriores. Por outro lado, o fato de a presença de naftaleno diminuir a TS das soluções de SH indica que as interações entre o naftaleno e as porções hidrofóbicas nas moléculas húmicas potencializa o caráter anfifílico destas últimas. Para confirmar se o efeito da diminuição da TS não seria devido à simples presença de naftaleno na solução o mesmo experimento foi feito em ausência de SH, e os valores de TS foram constantes e muito próximos do da água em toda a faixa de pH.

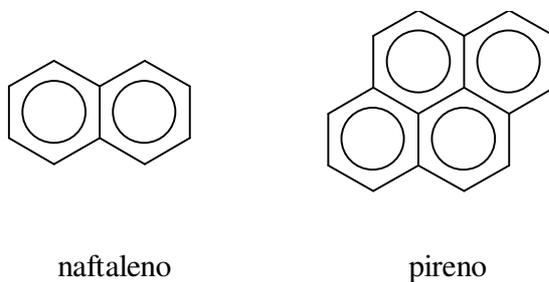


Figura 5.9. Estruturas moleculares do naftaleno e no pireno.

5.4. Fatores que afetam a fluorescência do pireno em soluções de SH

5.4.1. Estudo da interação pireno-substância húmica através da análise da razão I_1/I_3

Tradicionalmente a razão I_1/I_3 tem sido utilizada para monitorar a polaridade do microambiente no qual se encontra o pireno, sendo maior em ambientes polares e diminuindo em ambientes apolares (Schuette *et al.*, 1994; Engebretson e von Wandruszka, 1997). Portanto, sob este ponto de vista, se realmente ocorre a partição do pireno em ambientes apolares gerados pelas moléculas húmicas, então deve ser observado um decréscimo da razão I_1/I_3 , nestas condições.

A **Figura 5.10** mostra os espectros de fluorescência do pireno em água e em solução de AH Aldrich, à pH 6,0, com λ_{exc} 240 nm. Este comprimento de onda foi escolhido para minimizar a interferência da fluorescência do AH na fluorescência do pireno.

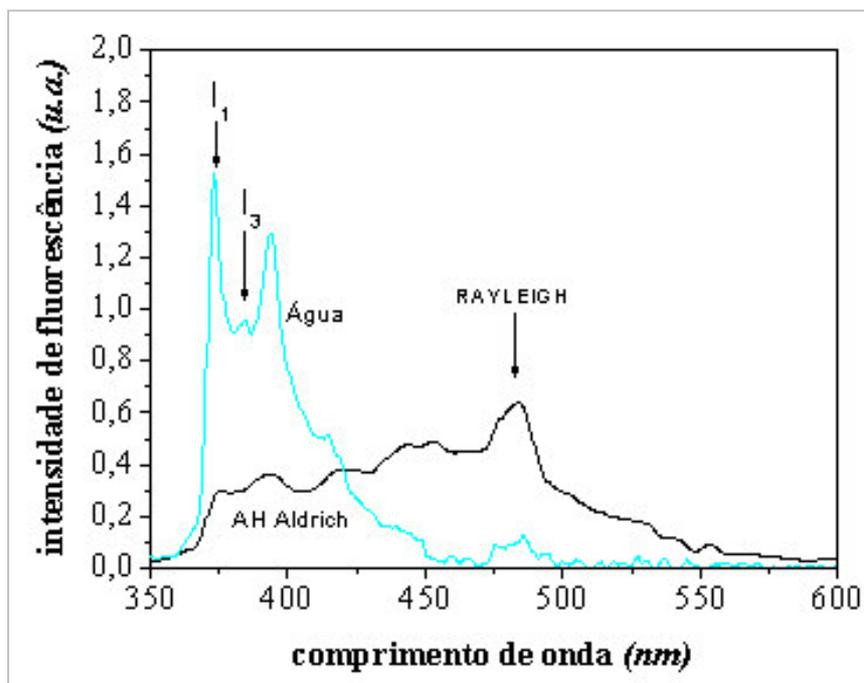


Figura 5.10. Espectros de fluorescência do pireno em água e em solução de AH Aldrich (30mg L^{-1}). I_1 (373 nm) e I_3 (384 nm). pH 6,0. λ_{exc} 240 nm. $T = 22^\circ\text{C}$. — = AH Aldrich; — = água.

A presença de AH atenua a intensidade de fluorescência do pireno, conforme já tem sido observado em trabalhos anteriores (Engebretson e von Wandruszka, 1994). Os dados mostram que a razão I_1/I_3 diminui da água (~1,6) para as soluções de AH (~1,25), indicando que o pireno percebe um ambiente relativamente hidrofóbico nas soluções de AH.

A **Figura 5.11** mostra os valores da razão I_1/I_3 do pireno em vários valores de pH, para algumas das amostras estudadas. Estes valores foram obtidos dos espectros de soluções de SH filtradas após adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pireno. Os valores da razão I_1/I_3 medidos em água (ambiente polar) e ciclohexano (ambiente apolar) também são apresentados nas figuras. Fica evidenciado que em presença de SH, as moléculas de pireno percebem um ambiente menos polar do que em água pura.

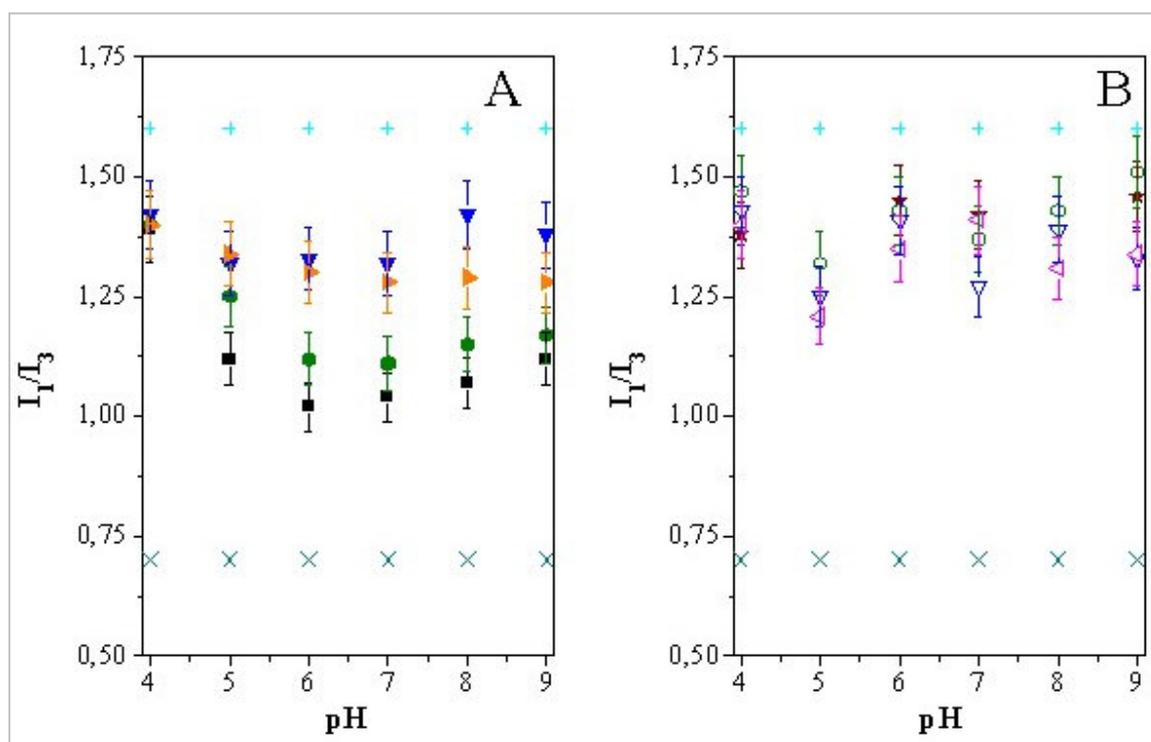


Figura 5.11. Variação da razão I_1/I_3 do pireno em soluções de substâncias húmicas. (A) AH e (B) AF de diferentes origens, filtradas após adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pireno, em diferentes valores de pH. I_1 (~373 nm) e I_3 (~384 nm). $\lambda_{\text{exc}} = 240 \text{ nm}$. ■ = AH Aldrich; ► = AHP7; ▼ = AHMR8; ● = AHMV1. ◀ = AFP4; ▼ = AFMR8; ◊ = AFMV1. ★ = MON. + = água; × = ciclohexano.

Comparando-se os valores apresentados, percebe-se que em presença de AF as razões I_1/I_3 são mais próximas dos valores em água pura do que para os AH. Para os AH, os menores valores foram medidos entre pH 6,0 e 7,0, devendo este efeito ser correlacionado com àquele demonstrado na **Figura 5.6**, de que esta faixa de pH é crítica no que se refere à atividade superficial das SH, principalmente para os AH. Em ausência de pireno, o caráter anfifílico dos AH começa a se manifestar apenas em valores abaixo de pH 6,0 (**Figura 5.3**). A **Figura 5.11-A**, no entanto, mostra que em toda a faixa de pH o valor da razão I_1/I_3 é mais baixo que seu correspondente em água, indicando que o pireno percebe ambientes hidrofóbicos, em quase toda a faixa de pH, quando AH estão presentes.

Os valores de I_1/I_3 aumentam quando o pH é menor (**Figura 5.11-A**), indicando que a maior parte das moléculas de pireno sente um ambiente mais polar nestas condições. Uma explicação possível para a ocorrência deste efeito em pHs baixos, é de que as cargas negativas são neutralizadas pelo próton, ocasionando um colapso da estrutura húmica diminuindo o acesso do pireno aos domínios hidrofóbicos.

Dentre as amostras estudadas os menores valores da razão I_1/I_3 foram medidos em presença do AH Aldrich, em toda a faixa de pH. Considerando os valores de N/C e H/C (**Tabela 5.1**), verifica-se que este AH é pobre em nitrogênio e hidrogênio quando comparado às outras amostras, reflexo de sua natureza exclusivamente terrestre. Esta característica, portanto, confere a esta amostra uma maior aromaticidade ou, pelo menos, um maior número de grupamentos apolares, que podem estar relacionados ao maior efeito observado nos valores de I_1/I_3 . De acordo com Guetzloff e Rice (1994), o AH Aldrich pode formar aglomerados similares a micelas em concentrações acima de 7,4 g de AH L⁻¹, para soluções em meio alcalino. Porém, os dados aqui apresentados indicam que, em presença de pireno, estes domínios similares a micelas podem ser formados bem abaixo desta concentração, e em toda a faixa de pH.

Para os AF, o decréscimo dos valores da razão I_1/I_3 é menos evidenciado e praticamente constante em toda a faixa de pH, apresentando os menores valores em pH 5,0. Isso mostra a menor tendência destas amostras, em formar domínios similares a micelas. Este comportamento é devido a sua menor massa molar e maior conteúdo de grupos ácidos, como já foi explicado anteriormente. Para as soluções contendo MON, o decréscimo da razão I_1/I_3 foi pequeno, como para os AF.

5.4.2. Monitoramento das características espectrais de fluorescência do pireno em diferentes condições.

5.4.2.1 Em presença de substâncias húmicas

As Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15 mostram os espectros de fluorescência do pireno em soluções de SH de diversas origens, filtradas após adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, em quatro valores diferentes de pH e com λ_{exc} em 334 nm. Nos espectros de fluorescência do pireno em soluções de AH, observa-se, neste caso, além das bandas de emissão dos monômeros, um pico largo centrado em 450 nm, que corresponde à emissão dos excímeros do pireno. Nos espectros feitos com λ_{exc} em 240 nm, esta emissão fica comprometida, devido à interferência da banda Rayleigh.

Excímeros (derivado de *excited dimers*, em inglês) são complexos produzidos pela interação de uma molécula excitada com uma molécula no estado fundamental com a mesma identidade química. Os excímeros são observados quando do efeito do aumento da concentração sobre a fluorescência de um mesmo soluto: na medida em que a concentração aumenta, a intensidade normal de fluorescência decresce e uma nova banda, num comprimento de onda maior, aparece. Este efeito tem sido utilizado em estudos de reconhecimento de compostos orgânicos, assim como a razão entre a intensidade do excímero pela intensidade do monômero pode informar a viscosidade efetiva sentida pela sonda (quanto maior a razão, menor a viscosidade do ambiente onde o excímero se encontra) (Winnik e Regismond, 1996).

O pireno mostra este comportamento de forma particularmente clara. Apesar de serem geralmente formados em soluções concentradas pode ocorrer a emissão de excímeros em soluções de baixa concentração desde que a solução forneça as condições necessárias para a aproximação de uma quantidade suficiente de moléculas do pireno em determinados microambientes (Miyazawa e Winnik, 2003). Para as soluções de pireno em água pura, por exemplo, nas concentrações usadas nas figuras a seguir, não foram observadas emissões de excímeros em nenhum valor de pH, independente do λ_{exc} . Entretanto, como pode ser claramente observado, a presença de AH induz à formação de excímeros de pireno **o que evidencia de forma definitiva não somente a formação de microdomínios hidrofóbicos**

pelas moléculas húmicas, mas também a inserção das moléculas de pireno nestes microdomínios.

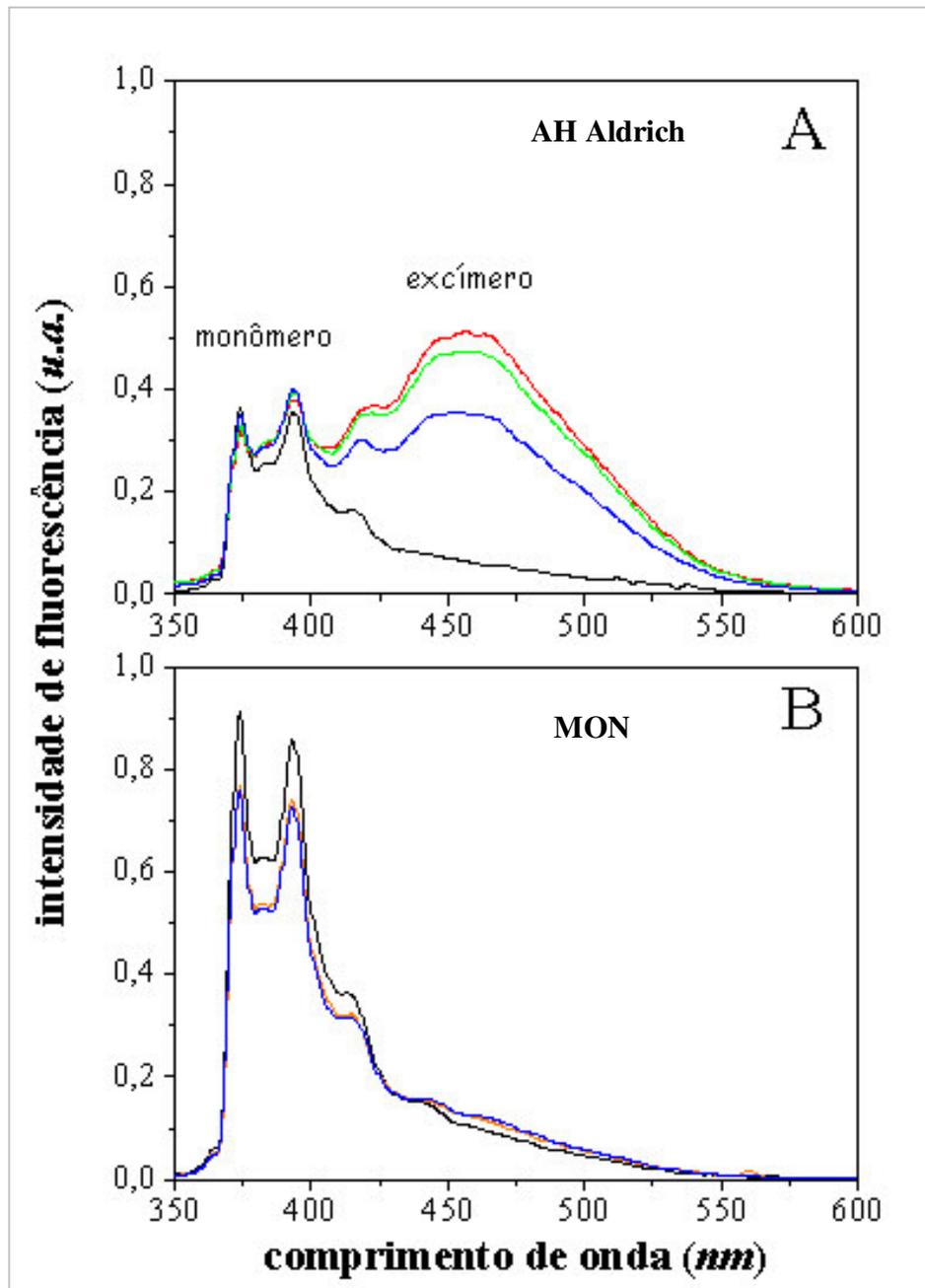


Figura 5.12. Espectros de fluorescência do pireno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtrado) em solução de (A) AH Aldrich e (B) MON (30 mg L^{-1}). $\lambda_{\text{exc}} = 334 \text{ nm}$. $T = 22^\circ\text{C}$. pH 4,0 = —; pH 6,0 = —; pH 7,0 = —; pH 9,0 = —.

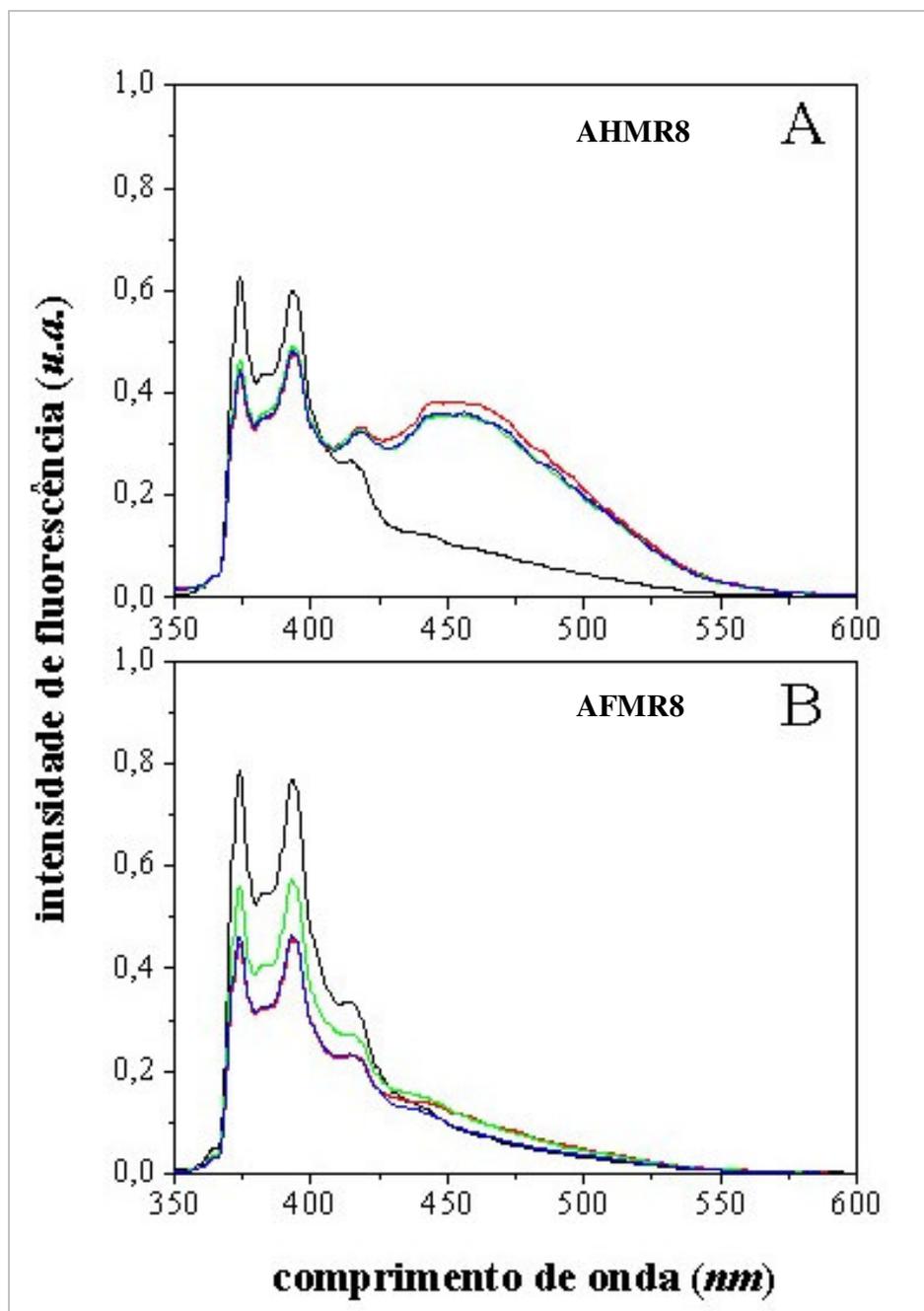


Figura 5.13. Espectros de fluorescência do pireno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtrado) em solução de SH estuarinas: (A) AHMR8 e (B) AFMR8 (30 mg L^{-1}). $\lambda_{\text{exc}} = 334 \text{ nm}$. pH 4,0 = —; pH 6,0 = —; pH 7,0 = —; pH 9,0 = —.

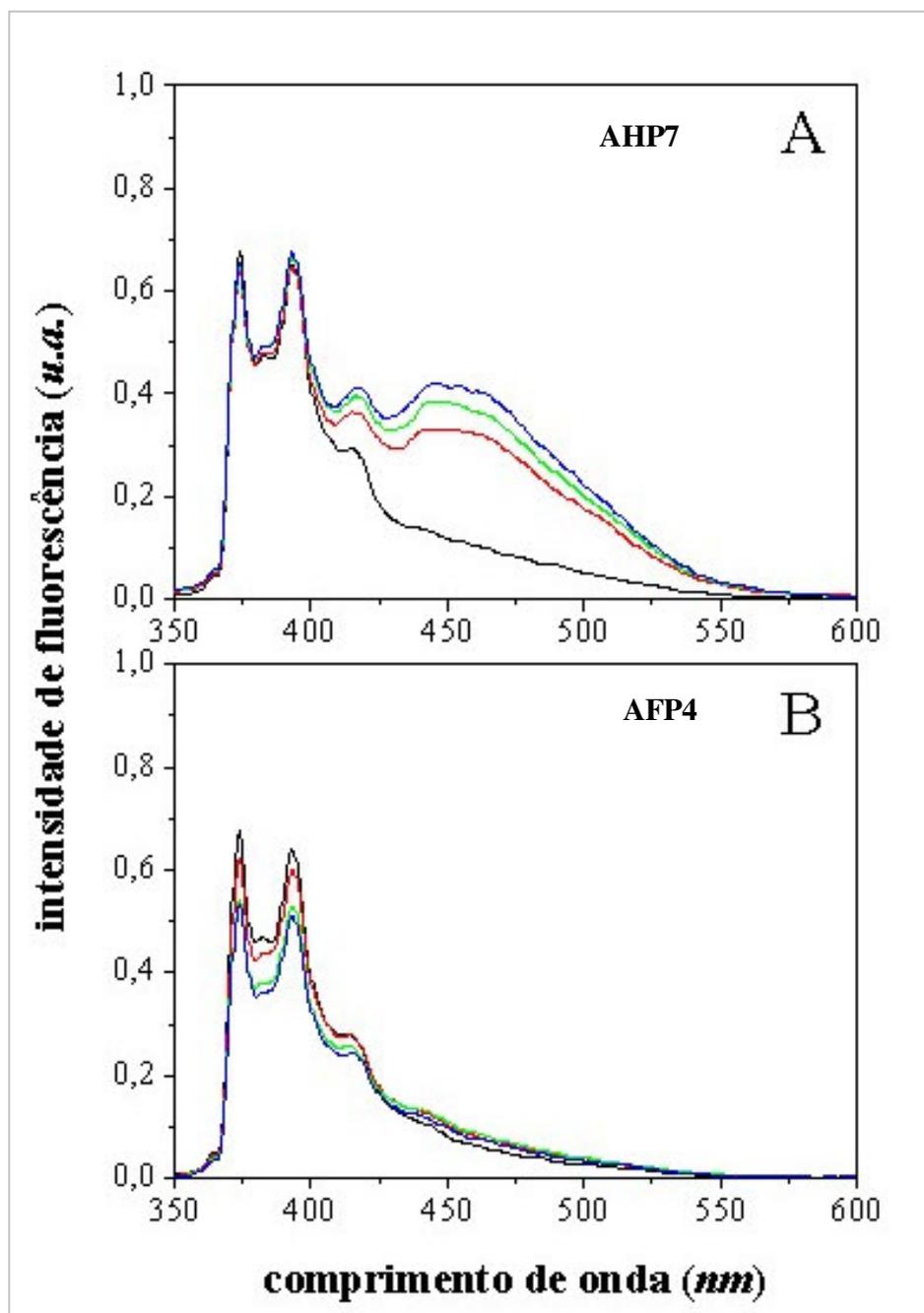


Figura 5.14. Espectros de fluorescência do pireno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtrado) em solução de SH lacustres: (A) AHP7 e (B) AFP4 (30 mg L^{-1}). $\lambda_{\text{exc}} = 334 \text{ nm}$. pH 4,0 = —; pH 6,0 = —; pH 7,0 = —; pH 9,0 = —.

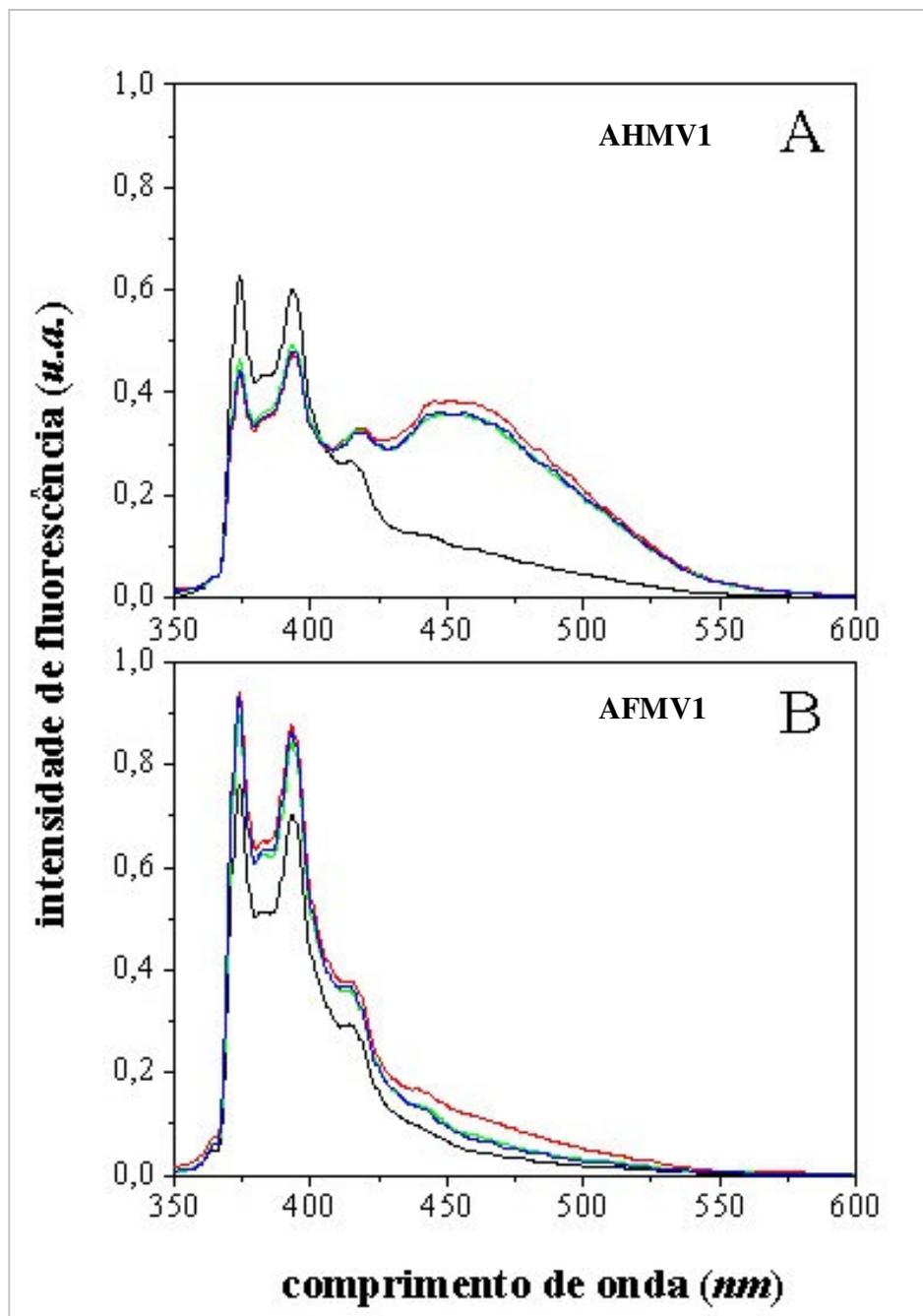


Figura 5.15. Espectros de fluorescência do pireno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtrado) em solução de SH marinhas: (A) AHMV1 e (B) AFMV1 (30 mg L^{-1}). $\lambda_{\text{exc}} = 334 \text{ nm}$. pH 4,0 = —; pH 6,0 = —; pH 7,0 = —; pH 9,0 = —.

Ressalte-se que, nas amostras estudadas, após a adição dos $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pireno, as soluções foram filtradas, retirando o excesso de pireno (não solubilizado) e, mesmo assim, a intensidade de emissão do excímero é bastante forte. De forma a ter uma noção quantitativa deste efeito de potencialização da concentração do pireno em solução de AH, foram feitas medidas de fluorescência para soluções com quantidades crescentes de pireno, em ciclohexano e em etanol e, somente para soluções com mais de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pireno foram observadas emissão de excímeros.

Todas as amostras aqui estudadas apresentaram um comportamento similar, sendo que a intensidade da emissão dos excímeros para a amostra estuarina (AHMR8) foi menor que para o AH Aldrich, para o AH lacustre (AHP7) assim como para o AH marinho (AHMV1). Como já foi visto, os AH estuarinos apresentaram comportamentos diferenciados em outros experimentos e estas diferenças foram atribuídas à sua natureza mais ácida (Rauen, 2004). Sua menor eficiência aparente, na formação de domínios hidrofóbicos, pode igualmente ser atribuída a estas características.

A emissão de excímeros não foi detectada em pH 4, embora tenha sido observado que nesta acidez, as SH apresentam, em geral, seu maior caráter anfifílico (**Figura 5.3**). Este efeito pode ser explicado do mesmo modo pelo qual foram explicados os valores mais altos da razão I_1/I_3 nestes pHs (**Figura 5.10-A**). Aparentemente, neste pH a conformação das moléculas húmicas, quase colapsadas, não permite o acesso de um número suficiente de moléculas de pireno aos ambientes hidrofóbicos não havendo assim (ou em menor grau), a formação de excímeros. Em pH 9,0, por outro lado, os grupos carboxílicos e fenólicos dos AH estão desprotonados, e as moléculas assumem uma configuração estendida devido à repulsão entre as cargas negativas, ocorrendo uma diminuição do número de ambientes hidrofóbicos, assim como a possibilidade da formação de excímeros.

Para os AF (**Figuras 5.13 B, 5.14 B, 5.15 B**), o sinal de excímeros não é observado em nenhum pH, confirmando as conclusões anteriores, sobre a menor tendência destas estruturas em formar domínios hidrofóbicos. Todas as amostras de AF, independente da origem, apresentaram o mesmo comportamento quanto à ausência de excímeros.

A amostra contendo MON, por outro lado, contraria as expectativas, uma vez que apresenta evidências, nas medidas de TS, de formação de aglomerados similares a micelas (**Figura 5.6**), mas não induz à formação de excímeros de pireno. Observe que a variação na

razão I_1/I_3 também não é muito significativa, neste caso (**Figura 5.10**). Uma explicação possível para este comportamento é de que, mesmo que os domínios hidrofóbicos sejam formados por esta amostra, o acesso do pireno a estes ambientes é dificultado, como no caso dos AH em valores baixos de pH, por exemplo.

Outro ponto interessante, que deve ser levado em consideração, na análise destes espectros, é o fato de que, quanto maior a intensidade da emissão de excímeros do pireno, menor a intensidade dos monômeros, e vice-versa. Este efeito é um sinal que a atenuação, usualmente observada na fluorescência com o aumento da concentração de AH (Gauthier, 1986 e 1987), deve resultar do envolvimento das moléculas de pireno pelas estruturas húmicas pseudomicelares.

5.4.2.2 Em presença de substância húmica e sal

A **Figura 5.16** apresenta as razões I_1/I_3 do pireno em soluções de AH (30 mg L^{-1}) com $I = 0,3$ (NaCl). Em presença de NaCl os valores das razões I_1/I_3 são pouco alterados com a mudança de pH. Os valores estão muito próximos ao da água e aos apresentados pelos AF na **Figura 5.10-B**, indicando que as moléculas de pireno não se encontram (ou estão em menor número) alojadas em cavidades hidrofóbicas. Como foi dito anteriormente, a presença de sal neutraliza as cargas negativas dos AH mesmo em valores de pHs mais altos, e acabam provocando um colapso das estruturas húmicas, dificultando o acesso do pireno nestes ambientes. Isto pode ser bem visualizado pelos valores de I_1/I_3 medidos em solução de AH Aldrich, que no caso anterior eram próximos a 1,0 em pH 6, e neste último caso, não baixaram de 1,25 em nenhum valor de pH.

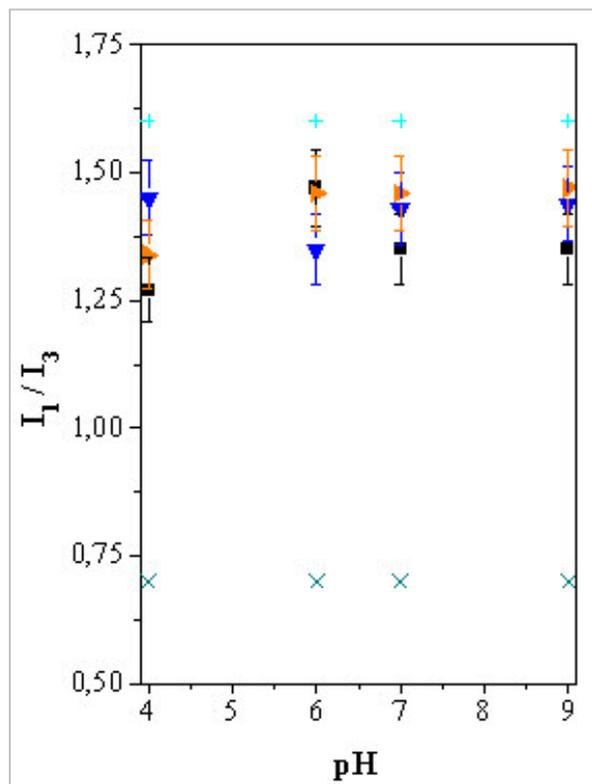


Figura 5.16. Comparação entre a razão I_1/I_3 do pireno em soluções de ácidos húmicos de diferentes origens, filtradas após adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pireno, em diferentes valores de pH. $I = 0,3$ (NaCl). I_1 (~373 nm) e I_3 (~384 nm). $\lambda_{\text{exc}} = 240$ nm. ■ = AH Aldrich; ▶ = AHP7; ▼ = AHMR8. + = água; x = ciclohexano.

A **Figura 5.17** mostra os espectros de fluorescência do pireno em soluções de três amostras de AH, nas mesmas condições anteriores (**Figuras 5.12, 5.13, 5.14, 5.15**), porém, para estas medidas, as soluções foram filtradas após 1 h da adição de NaCl ($I = 0,3$). Nesta situação, a intensidade de fluorescência do pireno é bem menor que em ausência de sal, contudo ainda é possível observar a formação de excímeros, só que num menor grau.

Os espectros confirmam o perfil apresentado pela **Figura 5.16**, ou seja, o acesso das moléculas de pireno aos ambientes hidrofóbicos é dificultado em presença de sal assim como também o era em pHs ácidos. Do mesmo modo, devido à adição de sal, menos moléculas de pireno foram solubilizadas pelas SH, tendo sido, portanto, retidas no filtro, e com isso a intensidade observada do monômero também é menor.

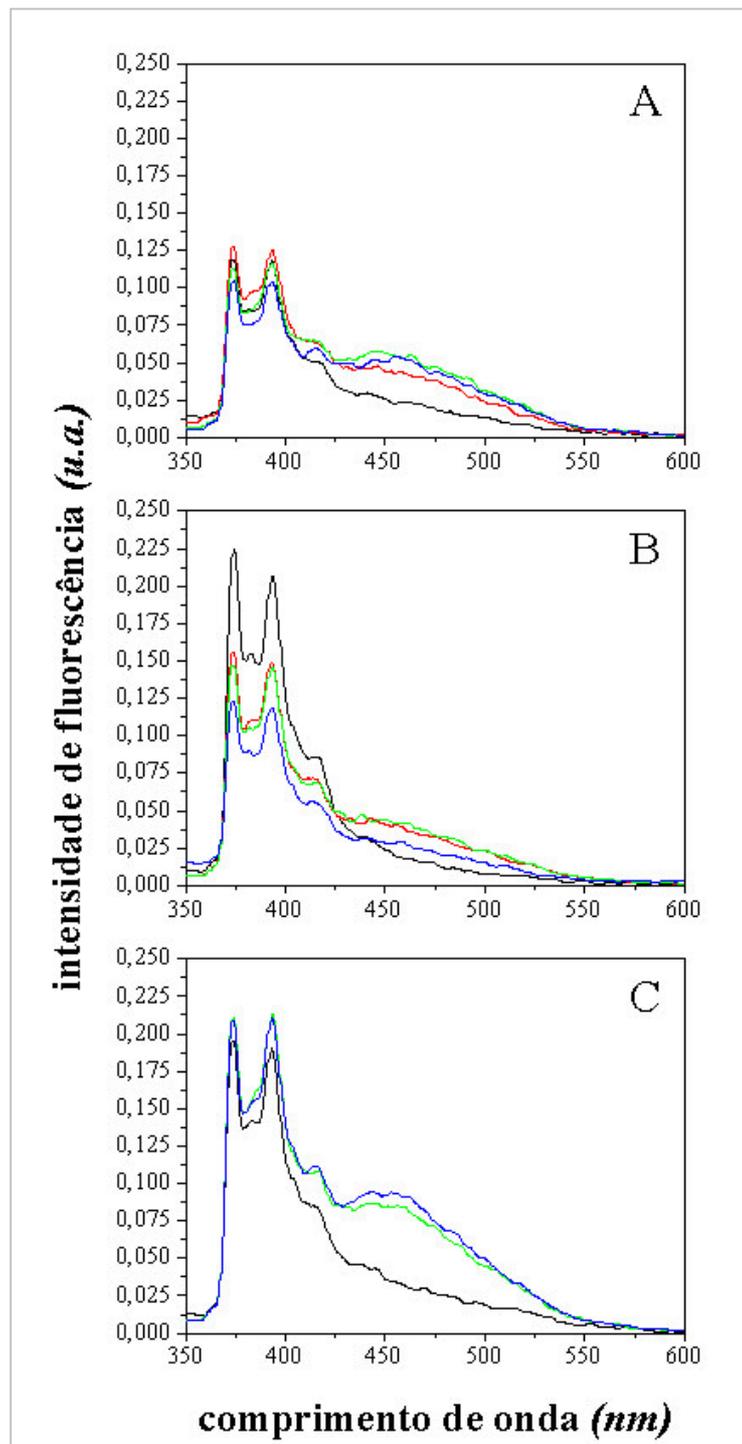


Figura 5.17. Espectros de fluorescência do pireno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, filtrado) em soluções de ácidos húmicos, medidos após 1h da adição de NaCl ($I = 0,3$). (A) AH Aldrich; (B) AHMR8 e (C) AHP7 (30 mg L^{-1}). $\lambda_{\text{exc}} = 334 \text{ nm}$. pH 4,0 = —; pH 6,0 = —; pH 7,0 = —; pH 9,0 = —.

5.5. Influência da presença de substâncias húmicas na disponibilidade do pireno em soluções aquosas

Mesmo em baixas concentrações, a MO dissolvida e/ou particulada em ambientes aquáticos pode aumentar a solubilidade e estabilidade de compostos orgânicos, sendo que os resultados mostrados anteriormente evidenciaram, de forma bastante efetiva, as propriedades anfífilas das SH estudadas

Para quantificar o efeito da presença das SH na solubilidade de um composto orgânico apolar em água medimos a variação da concentração do pireno em solução aquosa, em presença de quantidades crescentes de AH Aldrich por meio de cromatografia gasosa e fluorescência. A **Figura 5.18** mostra os resultados desta investigação, utilizando a técnica de cromatografia gasosa.

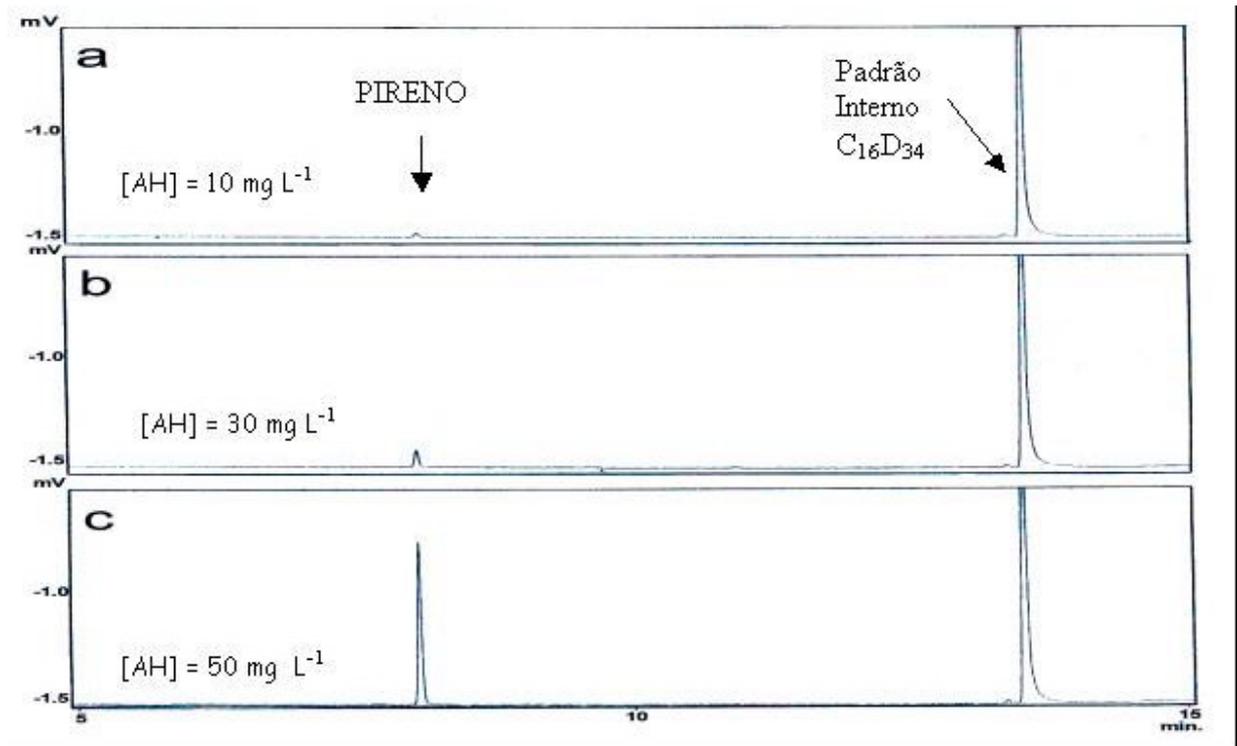


Figura 5.18. Medida por cromatografia gasosa (CG) para avaliar o efeito da concentração de AH Aldrich na solubilidade do pireno em solução aquosa: Concentração de AH Aldrich: (a) 10 mg , (b) 30 mg e (c) 50 mg de AH L⁻¹; pH =7,0; T_i = 100° C; T_f = 310° C; coluna DB1 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

A faixa de concentrações e o pH de trabalho foram escolhidos com base nos resultados mostrados acima e também com o objetivo de mimetizar situações possíveis de serem encontradas em ambientes naturais. Estes dados representam o resultado de um único experimento que foi realizado com o intuito de testar a metodologia. Entretanto, já é possível observar nitidamente a influência dos AH no processo de solubilização do hidrocarboneto aromático.

Provavelmente a eficiência dos AH neste processo deve variar de acordo com as suas características (concentração, tamanho, polaridade, conformação molecular), as quais são dependentes da sua origem (marinha, estuarina, terrestre), assim como das características do ambiente onde elas se encontram (pH, força iônica, presença de co-solutos) e ainda, com as propriedades dos compostos orgânicos propriamente ditos. Assim, outros experimentos foram realizados, com diferentes amostras e em diferentes condições, com o objetivo de compreender que outros fatores poderiam afetar este processo. A técnica baseada no transporte de pireno através do fluxo de N₂ descrita no **item 4.7 (Figura 4.2)** é que foi utilizada para este fim, devido à facilidade de obtenção dos resultados.

A **Figura 5.19** mostra os espectros de fluorescência do pireno, nas soluções hidroalcoólicas, provenientes de soluções com diferentes concentrações de SH (10, 30 e 50 mg L⁻¹; pH ~ 6,5) contendo 1,0 µmol de pireno. Para efeito de comparação, foi colocado o espectro proveniente de uma solução aquosa sem SH.

Fica evidente que a presença de SH, qualquer que seja sua concentração, influi na disponibilidade do pireno em meio aquoso.

Para o AH Aldrich, pode-se observar que as soluções desta amostra retiveram mais pireno do que as outras em todas as concentrações, e que, assim como o AHMR8, a variação da concentração influenciou na capacidade de capturar o pireno. Quanto maior a concentração de AH, menor a intensidade de fluorescência do pireno na solução hidroalcoólica. Para os AHP7 e MON a variação da concentração proposta neste estudo não influenciou na permanência do pireno nas soluções.

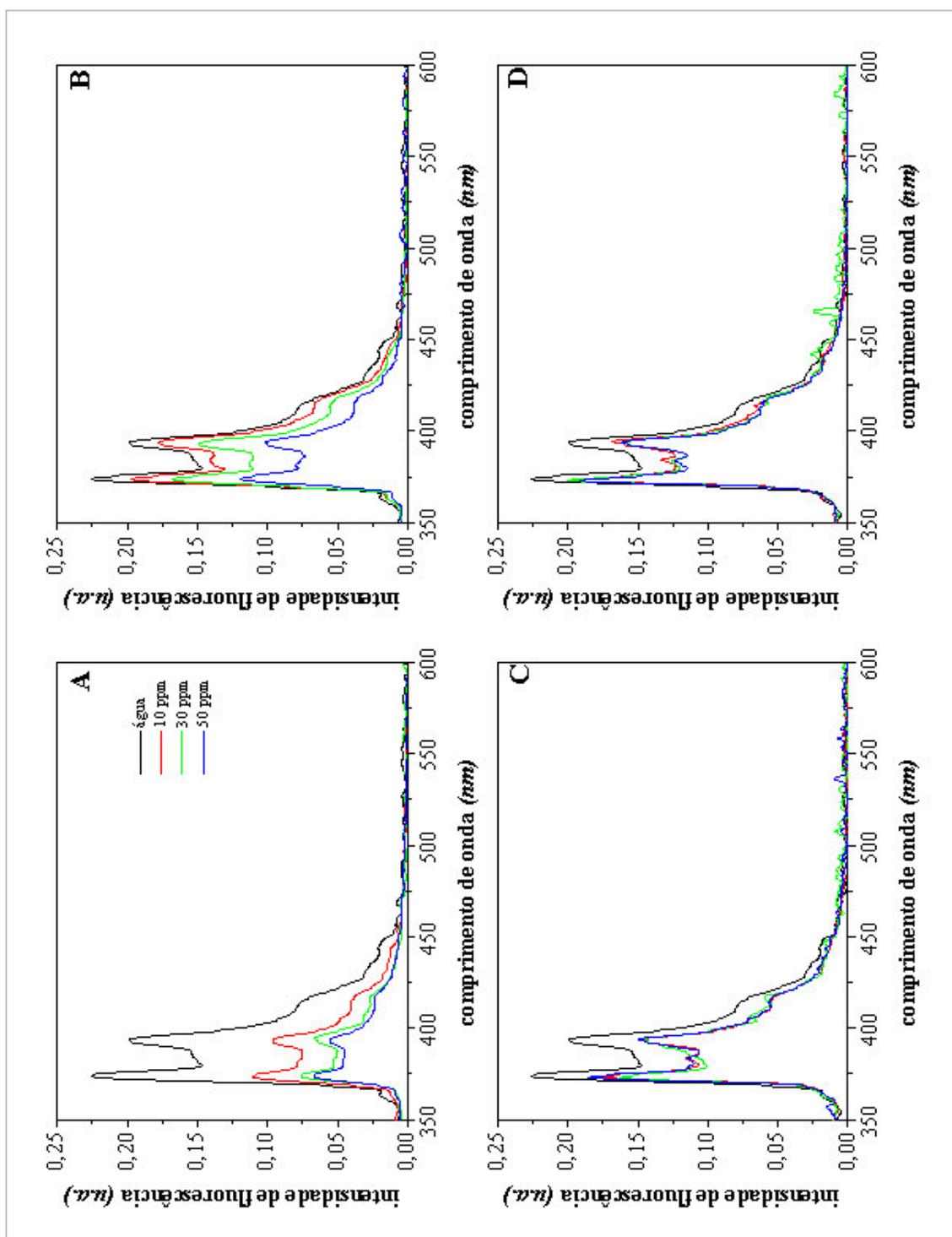


Figura 5.19. Espectros de fluorescência do pireno nas soluções hidroalcoólicas (etanol: água (2:1), proveniente de soluções com diferentes concentrações de ácidos húmicos (10, 30 e 50 mg L⁻¹), com pireno (1,0 μmol), após 2 h de fluxo de N₂. (A) AH Aldrich; (B) AHMR8; (C) AHP7 e (D) MON. pH ~ 6,5. λ_{exc} = 334 nm.

A **Figura 5.20** mostra os espectros de fluorescência do pireno, presente nas soluções captadoras hidroalcoólicas, proveniente de soluções de SH (30 mg L^{-1}), em três valores de pH (4,0; 6,5; 9,0), que continham $10 \text{ }\mu\text{mol}$ de pireno.

Numa análise geral, pode-se perceber que o pH do meio influencia de forma bastante evidente, a disponibilidade do pireno em meio aquoso contendo SH. Esta afirmação se baseia no fato de que, quanto maior a intensidade de fluorescência do pireno na solução captadora, menor era sua interação com as moléculas húmicas na solução de origem.

Observa-se que os espectros provenientes das soluções de AH apresentaram a mesma ordem de intensidade de fluorescência do pireno: $\text{pH } 4,0 < \text{pH } 6,5 < \text{pH } 9,0$. Já para o espectro proveniente da solução contendo MON, a intensidade de fluorescência do pireno é menor para pH 6,5.

Em todas as amostras estudadas, a maior intensidade foi observada em pH 9,0. Este resultado vem ao encontro dos obtidos por meio de TS e também pela análise da fluorescência do pireno diretamente nas soluções húmicas, já apresentados. Em valores de pH mais alcalinos, as moléculas húmicas estendidas não conseguem uma interação eficaz com as moléculas de pireno, que ficam livres em solução e são mais facilmente transportados pelo N_2 .

Para os AH, a menor intensidade em pH 4,0 revela que neste pH a interação AH-pireno é bastante estável. Este dado ressalta o maior caráter anfifílico apresentado pelas SH, na avaliação por TS, neste pH. Ao mesmo tempo revela que, apesar de não terem sido observados a formação de excímeros, o pireno é capturado pelos ambientes hidrofóbicos gerados pelas moléculas húmicas e esta interação não consegue ser rompida pelo fluxo de N_2 .

Em pH 6,5, os AH não estão com uma configuração tão contraída quanto em pH 4,0, assim, o pireno se aloja em ambientes hidrofóbicos maiores, capazes de abrigar um número maior de moléculas, o que explica a formação de excímeros neste pH de forma tão efetiva.

Na solução com MON, é em pH 6,5 que as moléculas húmicas têm uma maior interação com o pireno, e em pH 4,0, provavelmente assumem uma conformação muito contraída e poucas moléculas de pireno conseguem ser capturadas, sobrando mais moléculas de pireno para serem transportadas pelo N_2 .

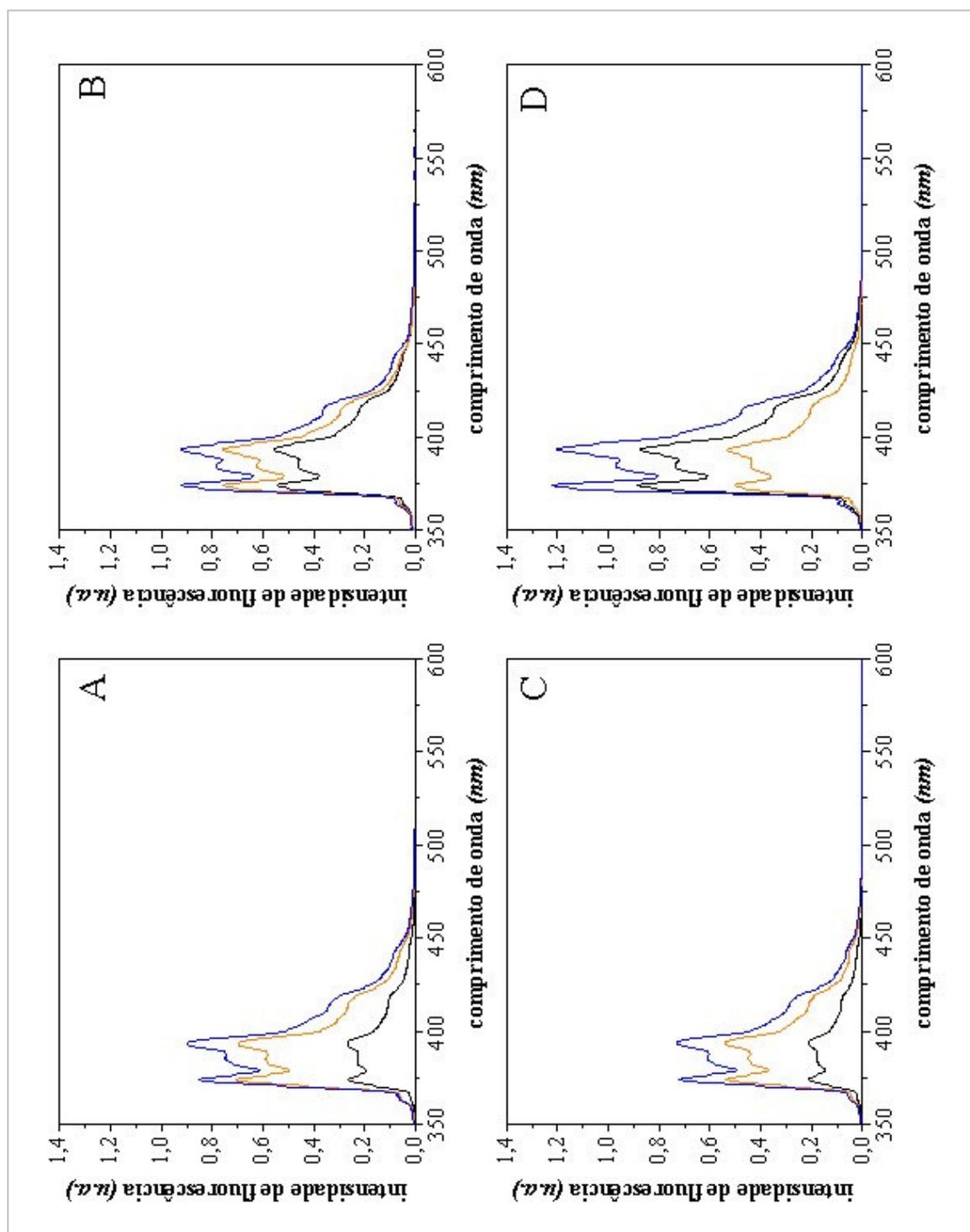


Figura 5.20. Espectros de fluorescência do pireno nas soluções hidroalcoólicas, proveniente de soluções de ácidos húmicos (30 mg L^{-1}), em diferentes valores de pH, com pireno ($10 \text{ } \mu\text{mol}$), após 2 h de fluxo de N_2 . (A) AH Aldrich; (B) AHMR8; (C) AHP7 e (D) MON. $\lambda_{\text{exc}} = 334 \text{ nm}$. pH 4,0 = —; pH 6,5 = —; pH 9,0 = —.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados pode-se concluir que:

- a) As SH estudadas, independentemente de sua origem, apresentam comportamento anfífilo, o que se justifica pela presença em sua estrutura de domínios hidrofóbicos e hidrofílicos;
- b) Mesmo que as variações de TS ocorram em percentuais diferentes para as diferentes amostras, o valor da concentração crítica de agregação é muito semelhante entre elas. Esta uniformidade de resposta, que é igualmente observada nos efeitos de concentração e pH, mostra que estas substâncias, se obtidas pelo mesmo método de extração, apresentam uma identidade comum, independente do ambiente onde foram gerados. As propriedades surfactantes das SH podem ser mais ou menos evidenciadas em função:
 - i) de sua estrutura molecular, a qual por sua vez, mesmo mantendo um padrão, devido à metodologia de extração, ainda parece guardar sinais do material de origem; ii) dos parâmetros físico-químicos como pH, força iônica do meio e presença de co-solutos;
- c) O aumento da força iônica ou a diminuição do pH aumentam a atividade superficial das SH devido à neutralização parcial das cargas negativas. Uma força iônica excessivamente elevada ou um pH extremamente ácido, por outro lado, podem provocar a floculação do material;
- d) A presença de NaCl e MgCl₂ produz efeitos diferentes nas amostras sendo que, no caso do MgCl₂, produziu mudanças mais efetivas na configuração dos AH. Os sítios negativos das moléculas húmicas são neutralizados pelos cátions em pHs elevados, e o íon Mg²⁺ por ser divalente, atua como ponte nas interações inter ou intramoleculares, produzindo, mais efetivamente, microambientes hidrofóbicos em meio aquoso;

- e) Em ausência de pireno, a diminuição do pH aumenta o caráter anfifílico da maioria das amostras estudadas, mas quando o pireno é adicionado às soluções, parece atuar como núcleo promotor de uma possível micelização, nas proximidades de pHs neutros; este aspecto é menos pronunciado com a adição de HPAs mais solúveis, como o naftaleno.

- f) A presença de SH modifica as características de fluorescência do pireno e estes efeitos parecem resultar da concentração do hidrocarboneto nos domínios hidrofóbicos das moléculas húmicas. Esta interferência é mais ou menos pronunciada dependendo da origem e organização molecular das SH;

- g) Os AH aumentam a solubilidade do pireno em água, immobilizando estas moléculas e, com base no conjunto de dados supracitados, pode-se supor que isto se deve às interações do tipo hidrofóbica-hidrofóbica, ou mesmo micela-soluto, sendo que, neste último caso, o hidrocarboneto aloja-se em cavidades formadas pelas macromoléculas em solução.

"Ambiente limpo não é o que mais se limpa, mas o que menos se suja."

(Chico Xavier)

VII. BIBLIOGRAFIA

AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MACCARTHY, P. *An introduction to humic substances in soil, sediment, and water*. In **Humic substances in soil, sediments and water** (G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw & P. MacCarthy, eds). Wiley-Interscience, New York, p. 1-9, 1985.

ALLOWAY, B. J. *The origins of heavy metals in soils*. In: ALLOWAY, B. J. (Ed) **Heavy metal in soils**. New York: John Wiley, p. 29-39, 1990.

ANDERSON, M. A.; HUNG, A.; MILLS, D.; SCOTT, M. S. *Factors affecting the surface tension of soil solutions and solutions of humic acids*. **Soil Science**. v. 160, p. 111-116, 1995.

AREND, K. *Determinação dos grupos funcionais e estudo das características de complexação de compostos húmicos sedimentares por métodos químicos e potenciométricos*. 1999. **Dissertação** (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ATKINS, P. W. **Físico-química**. v. 1; 6^a. ed. LTC editora. 1999.

BRAND, L.; GOHLKE, J.R. *Fluorescence probes for structure*. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 41, p. 843-868, 1972.

BRULAND, K. W.; DONAT, J. R.; HUTCHINS, D. A. *Interactive influence of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters*. **Limnology Oceanography**, v. 36, p. 1555-1577, 1991.

BUFFLE, J. **Complexation reactions in Aquatic Systems: analytical approach**, Ellis Horwood: New York, 1990.

CHEN, Y.; SCHNITZER, M. *The surface tension of aqueous solutions of soil humic substances*. **Soil Science**, v. 125, p. 7-15, 1978.

CHIN, Y. P.; AIKEN, R. G.; DANIELSEN, K. M. *Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity*. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 1630-1635, 1997.

CHIOU, C. T.; MALCOLM, R. L.; BRINTON, T. I.; KILE, D. E. *Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids*. **Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 5, p. 502-508, 1986.

COZZOLINO, A., CONTE, P., PICCOLO, A. *Conformational changes of humic substances induced by some hydroxy-, keto-, and sulfonic acids*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 563-571, 2001.

DONG, D.C.; WINNIK, M.A. *The py scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with Et and Y values.* **Photochem. Photobiol.**, v. 35, p. 17-21, 1982.

ENGBRETSON, R. R.; von WANDRUSZKA, R. *Kinetic aspects of cation-enhanced aggregation in aqueous humic acids.* **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 488-493, 1998.

ENGBRETSON, R. R.; von WANDRUSZKA, R. *The effect of molecular size on humic acid associations.* **Organic Geochem.**, v.26 (11-12), p. 729-767, 1997.

ENGBRETSON, R. R.; von WANDRUSZKA, R. *Microorganization in dissolved humic acids.* **Environmental Science and Technology**, v.28 (11), p. 1934-1941, 1994.

ERTEL, J. R.; HEDGES, J. I. *The lignin component of humic substances: Distribution among soil and sedimentary humic, fulvic and base-insoluble fractions.* **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 48, p. 2065-2074, 1984.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental.** (tradução de Juergen Heinrich Maar). São Paulo. EPU: Springer: ed. USP, 196p, 1980.

GAUTHIER, T. D.; BOOT, K. A.; GRANT, C. L. *Fluorescence quenching studies of interactions between polynuclear aromatic-hydrocarbons and humic materials.* American Chemical Society, v. 193, p. 89, 1987.

GAUTHIER, T. D.; SHANE, E. C.; GUERIN, W. F., *et al.* *Fluorescence quenching method for determining equilibrium-constants for polycyclic aromatic-hydrocarbons binding to dissolved humic materials.* **Environmental Science and Technology**, v. 20(11), p. 1162-1166, 1986.

GIOVANELA, M.; PARLANTI, E.; SORIANO-SIERRA, E. J.; SIERRA, M. M. D. *Elemental composition, FT-IR spectra and thermal behavior of sedimentary fulvic and humic acids from aquatic and terrestrial environments.* **Geochemical Journal**, v. 38(3), p. 255-264, 2004.

GIOVANELA, M. *Caracterização química e morfológica de substâncias húmicas de ambientes aquáticos.* 2003, 139p. **Tese** (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GUETZLOFF, T. F.; RICE, J. A. *Does humic acid form a micelle?* **Science of the Total Environment**, v. 152 (1), p. 31-35, 1994.

HAYES, J. M.; POPP, B. N.; TAKIGIKU, R.; *et al.* *An isotropic study of biogeochemical relationships between carbonates and organic-carbon in the greenhorn formations.* **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 53(11), p. 2961-2972, 1989.

HARRISON, R. M. *Understanding our environment: an introduction to environmental chemistry and pollution*. **Royal Society of Chemistry**; 1990.

INTERNET. <http://unix.temple.edu/~suebee/jpage4.html>

Capturado em fevereiro de 2005.

<http://www.ihss.gatech.edu>

Capturado em fevereiro de 2005.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J.K. *Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems*. **Journal of American Chemical Society**, v. 99, p. 2039-2044, 1977.

KHAN, S. U.; SCHNITZER, M. *Further investigations on the chemistry of fulvic acid, a soil humic fraction*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, p. 2302-2309, 1971.

KAWAHIGASHI, M.; FUGITAKE, N.; TAKAHASHI, T. *Structural information obtained from spectral analysis (UV-Vis, IR, ¹H-MNR) of particule size fractions in two humic acids*. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 42, p. 355-360, 1996.

KERNDORFF, H.; SCHNITZER, M. *Humic and fulvic acids as indicators of soil and water pollution*. **Water, Air, Soil Polluted**, v. 12, p. 319-329, 1979.

KONONOVA, M. M. **Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación**. Barcelona: Oikos-Tau, p. 127-166, 1982.

KORDEL, W.; DASSENAKIS, M.; LINTELMANN, J.; PADBERG, S. *The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 1571-1600, 1997.

LAPOLLI, E. M.; MOREIRA, J. C.; ZARDO, S. M.; VIEIRA, V. F. *Carta dos elementos do meio ambiente – Parque da Lagoa do Peri*. **Memorial descritivo e mapas**, Florianópolis: Laboratório Associado de Sensoriamento remoto de Santa Catarina, 58p., 1990.

LIAO, W.; CHRISTMAN, R. F.; JOHNSON, J. D.; MILLINGTON, D. S. *Structural characterization of aquatic humic material*. **Environmental Science and Technology**, v. 16, p. 403-410, 1982.

LOBARTINI, J. C.; TAN, K. H. *Differences in humic acids characteristics as determined by carbon-13 nuclear magnetic resonance, scanning electron microscopy and infrared analysis*. **Soil Science Society America Journal**, v. 52, p. 125-130, 1988.

LOBARTINI, J. C.; TAN, K. H.; REMA, J. A.; GINGLE, A. R.; PAPE, C.; HIMMELSBACH, D. S. *The geochemical nature and agricultural importance of commercial humic matter*. **Science of the Total Environment**, v. 113, p. 1-15, 1992.

MALCOLM, N. J.; BIRBETT, J. W.; WILKINSON, A. E.; *et al.* *Experimental determination of partial specific volumes of humic substances in aqueous solution.* **Analytica Chimica Acta**, v. 314, p. 149-159, 1995.

MANAHAM, S. E. Interactions of hazardous-waste chemical with humic substances. In: SUFFET, I. H.; MacCARTHY, P. (Eds.) *Aquatic humic substances: influence on fate and treatment of pollutants.* Washington, D. C. **American Chemical Society**, p. 83-92, 1989.

MANGRICH, A. S.; VUGMAN, N. V. *Bonding parameters of vanadyl ion in humic acids from the Jucu river estuarine region, Brazil.* **The Science of the Total Environment**, v. 75, p. 235-241, 1988.

MANGRICH, A. S.; VUGMAN, N. V. *Vanadyl ion (VO₂⁺) as a spectroscopic probe of metal binding to nitrohumic acid.* **Fuel**, v. 69, p. 925-927, 1990.

MANIASSO, N. *Ambientes micelares em Química Analítica.* **Química Nova**, v. 24, no. 1, p. 87-93, 2001.

MANZATTO, H. R. H. *Dinâmica da matéria orgânica em solo glei pouco húmico cultivado com arroz inundado no vale do rio São João (RJ).* 1990, p. 45-76. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MATER, L.; ALEXANDRE, M. R.; HANSEL, F.; MADUREIRA, L. A. S. *Assessment of Lipid Compounds and Phosphorus in Mangrove Sediments of Santa Catarina Island, SC, Brazil.* **Journal of Brazilian Chemical Society**, 2004.

MERCE, A. L. R.; LOMBARDI, S. C.; MANGRICH, A. S.; *et al.* *Electrochemical and spectroscopic studies of the complexed species of models of nitrohumic acids derived from phthalic acid.* **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 231-242, 1998.

MERCE, A. L. R.; MANGRICH, A. S.; SZPOGANICZ, B.; *et al.* *Equilibrium studies of Al (III) and Fe (III) with nitrosalicylic acids nitrohumic acid-like models.* **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 7, p. 97-102, 1996.

MIYAZAWA, K.; WINNIK, F. M. *Solution properties of hydrophobically-modified phosphorilcholine-based polymers in water and in the presence of surfactants.* **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107(38), p. 10677-10682, 2003.

MORRISON, G. M. P.; BATTLE, G.; FLORENCE, T. M. *Metal speciation and toxicity.* **Chemistry in Britain**, v. 25, p. 791-794, 1989.

NAKAJIMA, A., *Solvent effect on the vibrational structures of the fluorescence and absorption spectra of pyrene.* **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 44, p. 3272-3277, 1971.

ORTIZ DE SERRA, M. I.; SCHNITZER, M. *The chemistry of humic and fulvic acids extracted from argentine soils – II. Permanganate oxidation of methylated humic and fulvic acids.* **Soil Biol. Biochemistry**, v. 5, p. 287-296, 1973.

PARKER, C. A. **Photoluminescence of solutions.** Amsterdam: Elsevier, 1968. 544p.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. *Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography.* **Chemosphere**, v. 4, p. 595-602, 1996.

PUCHALSKI, M. M., MORRA, M. J., von WANDRUSZKA, R. *Fluorescence quenching of synthetic organic compounds by humic materials.* *Environmental Science and Technology*, v. 26, p. 1787-1792, 1992.

RAGLE, C. S.; ENGBRETSON, R. R.; von WANDRUSZKA, R. *The sequestration of hydrophobic micropollutants by dissolved humic acids.* **Soil Science**, v. 162, p. 106-114, 1997.

RASHID, M. A. *Geochemistry of marine humic compounds.* New York, Ed. Springer-Verlag, p. 67-90, 1985.

RAUEN, T.G. *Ácidos Húmicos como agentes tensoativos e sua influência na solubilização de compostos apolares em solução aquosa.* 2001. 48 páginas. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

RAUEN, T. G. BEBACHER, N. A.; SIERRA, M. M. D. *Tensoatividade de ácidos húmicos de procedências distintas.* **Química Nova**, v. 25(6A), p. 909-913, 2002.

RAUEN, T. G.; Debacher, N. A.; MADUREIRA, L. A. S.; SIERRA, M. M. D. *Factors affecting the surfactant properties of humic acids.* **Journal of Coastal Research**. SI 39, ICS 2004 (proceedings). ISSN 07490208.

RAVELLI-NETO, A. *Comportamento dell'erbicida chlorosulfuron in suoli tipici del sud e del sudest del Brasile.* 1995, 141f. **Tese** (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) – Università degli Studi di Firenze, Firenze.

REBHUN, M.; DE SMEDT, F.; RWETABULA, J. *Dissolved humic substances for remediation of sites contaminated by organic pollutants. Binding-desorption model predictions.* **Water research**, v. 30, n. 9, p. 2027-2038, 1996.

REBHUN, M.; MEIR, S.; LAOR, Y. *Using dissolved humic acid to remove hydrophobic contaminants from water by complexation-flocculation process.* **Environmental science and technology**, v. 32, p. 981-986, 1998.

REICHARDT, C. *Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators.* **Chem. Rev.**, v. 94, p. 2319-2358, 1994.

- RESENDE, M. O. *Grupos funcionais das substâncias húmicas ativas na complexação de metais e pesticidas*. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, 1997, São Carlos. **Anais...**São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA, 1997, 207p., p. 63-65.
- RICE, J. A.; MACCARTHY, P. *Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances*. **Organic Geochemistry**, v. 17, p. 635-648, 1991.
- ROCHA, J. C.; DE SENE, J. J.; BURBA, P. K. *Interaction of mercury(II) with humic substances from Rio Negro (Amazonas State, Brazil) by means of an ion exchange procedure*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 9, p.79-84, 1998.
- ROCHA, J. C.; DE SENE, J. J.; SANTOS, A.; TOSCANO, I. A. S.; ZARA, L. F. *Aquatic humus from an unpolluted Brazilian dark-brown stream: general characterization and size fractionation of bound heavy metals*. **Journal of Environmental Monit.**, v. 2, p.39-44, 2000.
- ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.;ALMEIDA,R. N. H. M.; MOZETO, A. A.; ZARA, L. F.; ROMÃO, L. P. C.; SARGENTINI, E. Jr. *Extração de matéria orgânica aquática por abaixamento de temperatura: uma metodologia alternativa para manter a identidade da amostra*. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 208-212, 2003.
- SAAR, R. A.; WEBER, J.H. *Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry*. **Environmental Science and Technology**, v. 16, p. 866-872, 1982.
- SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto alegre: Gênese, p. 69-90, 1999.
- SCHNITZER, M. *Humic substances: chemistry and reactions*. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S. V. (Eds.). **Soil Organic Matter**. Amsterdam: El Selvier Publishing Co., p.1-64, 1978.
- SCHUETTE, J. M., WALMER, I. M. *Fluorescence characterization of the cyclodextrin/pyrene complexe interaction with chiral alcohols and diols*. **Applied Spectroscopy**, v. 45(5), p. 581-586, 1994.
- SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. *Chemical model structures for soil organic matter and soils*. **Soil Science**, v. 162, p. 115-130, 1997.
- SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. *A state of the art structural concept for humic substances*. **Naturwissenschaften**, v. 80, p. 29-30, 1993.
- SCHULTEN, H. R.; PLAGE, B. *A chemical structure for humic substances*. **Naturwissenschaften**, v. 78, p. 311-312, 1991.
- SEAL, B. K.; ROY, K. B.; MUKHERJEE, S. K. *Fluorescence emission spectra and structure of humic and fulvic acids*. **Journal of Indian Chemical Society**, v. 41, p. 212-214, 1964.

SEIN, L. T.; VARNUM, J. M.; JANSEN, S. A. *Conformational modeling of a new building block of humic acid: Approaches to the lowest energy conformer*. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 546, 1999.

SENESI, N.; FELICI, M. *Interazioni tra sostanza orgânica e pesticid*. In: NANNIPIERI, P. (Ed) **Coclo della sostanza orgânica nel suolo**. Bologna: Patron Editore, p. 197-238, 1993.

SIERRA, M. M. D.; GIOVANELA, M. PARLANTI, E., et al. *Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques*. **Chemosphere**, v. 58(6), p. 715-733, 2005.

SIERRA, M. M. D.; AREND, K.; FERNANDES, A. N.; GIOVANELA, M.; SZPOGANICZ, B. *Application of potenciometry to characterize acid and basic sites in humic substances: Testing the BEST7 program with a weak-acid mixture*. **Analytica Chimica Acta**, v. 445 (1), p. 89-98, 2001.

SIERRA, M. M. D.; GIOVANELA, M.; SORIANO-SIERRA, E. J. *Fluorescence properties of well-characterized sedimentary estuarine humic compounds and surrounding pore waters*. **Environmental Technology**, v. 21, p. 979-988, 2000.

SIERRA, M. M. D. *Caractérisation et reactivité de la matière organique fluorescente dissolue dans des milieux côtiers et marins*. 1992, 173p. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Oceanologia) – Universidade de Bordeaux, Bordeaux.

SILVA, A. D. *Estudo Geo-estrutural do Manguezal de Ratores na Ilha de Santa Catarina*. 1990, 126p. **Dissertação** (Mestrado em Geografia – Descritiva) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SISINNO, C. L. S.; NETTO, A. D. P.; REGO, E. C. P.; LIMA, G. S. V. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in leachate from a municipal solid waste dump of Niterói city, RL, Brazil*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68 (1), p. 148-154, 2002.

STEELINK, C. *Implications of elemental characteristics of humic substances*. In: **Humic substances in soil, sediment and water** (G.R. Aiken, D.M. McKnight; R.C. Wershaw and P. MacCarthy, eds) Wiley-Interscience, New York, p. 457-476, 1985.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry** (Genesis, composition, reactions), 2nd ed.; New York, Ed. John Wiley and Sons, p. 378, 1994.

SUFFET, I. H.; MACCARTHY, P. (eds). *Influence of aquatic humic substances on fate and treatment of pollutants*. **Advances in Chemistry series**, n. 219, American Chemical Society, Washington, DC, 1988.

TANAKA, S.; OBA, K.; FUKUSHINA, M.; NAKAYASU, K.; HASEBE, K. *Water solubility enhancement of pyrene in the presence of humic substances*. **Analytical Chimica Acta**, p. 351-357, 1997.

- TAVARES, M.C.H.; LANDGRAF, M.D.; VIEIRA, E.M.; REZENDE, M.O.O. *Estudo da adsorção-dessorção da trifluralina em solo e em ácido húmico*. **Química Nova**, v. 19, p. 605 – 608, 1996.
- TCHAPECK, M.; WASOWSKI, C. J. *The surface activity of humic acid*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 40, p. 1343-1348, 1976.
- TCHAPECK, M.; SCOPPA, C. O.; WASOWSKI, C. J. *The surface tension of soil water*. **Soil Science**, v. 29, p. 17-21, 1978.
- THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. *Preparative isolation of aquatic humic substances*. **Environmental Science Technology**, v. 15, p. 463, 1981.
- VER, L. M. B., MACKENZIE, F. T., LERMAN, A. *Biogeochemical responses of the carbon cycle to natural and human perturbations: past, present and future*. In: GIOVANELA, M. Caracterização química e morfológica e estudo da reatividade de substâncias húmicas de diversas origens. 2004, 77 p. **Tese** (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- VISSER, S. A.; CAILLIER, M. *Observations on the dispersion and aggregation of clays by humic substances*. **Geoderma**, v. 42, p. 331, 1988.
- VON WANDRUSZKA, R.; RAGLE, C.; ENGBRETSON, R. R. *The role of selected cations in the formation of pseudomicelles in aqueous humic acid*. **Talanta**, v. 47, p. 947-952, 1997.
- VON WANDRUSZKA, R. HAAKENSEN T. J.; TOERNE, K. A. *Evaluation of humic acid fractions by fluorimetry and ¹³C NMR spectroscopy*. **Spectrochimica Acta**, v. 54, p. 671-675, 1998.
- WEHRY, E. L. **Modern fluorescence spectroscopy**. Plenum Press, New York, 1973.
- WERSHAW, R. L. *A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems*. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 1, p. 29-45, 1986.
- WILSON, M. A.; PHILP, R. P.; GILLAM, A. A.; GILBERT, T. D.; TATE, K. R. *Comparison of the structure of humic substances from aquatic and terrestrial sources by pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 47, p. 497-502, 1983.
- WINNIK, F. M.; REGISMOND, S. T. A.; *Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers colloids and surfaces*. **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 118(1-2), p. 1-39, 1996.
- YATES, L. M. III; von WANDRUSZKA, R. *Effects of pH and metals on the surface tension of aqueous humic materials*. **Soil Science of America Journal**, v. 63, p. 1645, 1999.

YATES, L. M.; ENGBRETSON, R. R.; HAAKENSEN, T. J.; von WANDRUSZKA, R. *Immobilization of aqueous pyrene by dissolved humic acid*. **Analytica Chimica Acta**, v. 356, p. 295-300, 1997.

ZEPP, R. G. *Environmental photoprocesses involving natural organic matter*. In **Humic substances and their role in the environment** (F. H. Frimmel & R. F. Christman, eds). Wiley, Chichester, p. 193-214, 1988.

VIII. ARTIGOS E TRABALHOS EM EVENTOS

Artigos:

SIERRA, M. M. D.; RAUEN, T. G.; TORMEN, L.; DEBACHER, N. A.; SIERRA, E. J. S. *Evidences from surface tension and fluorescence data of a pyrene-assisted micelle-like assemblage of humic substances*. **Water Research**, v. 39, p. 3811-3818, 2005.

RAUEN, T. G.; DEBACHER, N. A.; MADUREIRA, L. A. S.; SIERRA, M. M. D. *Factors affecting the surfactant properties of humic acids*. **Journal of Coastal Research**. SI 39, ICS 2004 (proceedings). ISSN 07490208.

RAUEN, T. G. DEBACHER, N. A.; SIERRA, M. M. D. *Tensoatividade de ácidos húmicos de procedências distintas*. **Química Nova**, v. 25(6A), p. 909-913, 2002.

Trabalhos completos em eventos:

RAUEN, T. G.; DEBACHER, N. A.; MADUREIRA, L. A. S.; SIERRA, M. M. D. *Factors affecting the surfactant properties of humic acids*. In. 8th international Coastal Symposium, 2004, Itapema – SC.

RAUEN, T. G.; SIERRA, M. M. D. *Fluorescence study of HS-pyrene interactions pH dependence*. In. XII International Meeting of International Humic Substances Society, 2004, São Pedro – SP.

Resumos expandidos em eventos:

TORMEN, L.; FERNANDES, A. N.; GIOVANELA, M.; RAUEN, T. G.; SIERRA, M. M. D. *Estudo das interações entre AH e pireno em meio aquoso*. In. VI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2005, Rio de Janeiro – RJ.

RAUEN, T. G.; SILVA, R. G.; SIERRA, M. M. D. *Investigação por fluorimetria, do papel do pH nas interações pireno/ácidos húmicos em soluções aquosas*. In. V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2003, Curitiba – PR. (apresentação oral)

SILVA, R. G.; FERNANDES, A. N.; RAUEN, T. G.; SIERRA, M. M. D. *Características de fluorescência da matéria orgânica associada a solos, sedimentos marinhos e estuarinos*. In. V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2003, Curitiba – PR.

RAUEN, T. G.; DUTRA, S. J.; FERNANDEZ, A. N.; SIERRA, M. M. D. *Tensoatividade de ácidos húmicos de ambientes aquáticos e terrestres*. In. IV Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2001, Viçosa - MG. (apresentação oral)

Resumos em eventos:

RAUEN, T. G.; SIERRA, M. M. D.; TORMEN, L. *Efeito da concentração de SH na captura do pireno em solução aquosa*. In. 28^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas – MG.

RAUEN, T. G.; SILVA, R. G.; SIERRA, M. M. D. *Interações ácidos húmicos/pireno: influência da origem das substâncias húmicas*. In. XXVI Congresso Latino-americano de Química e 27^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador - BA.

RAUEN, T. G.; SIERRA, M. M. D. *Estudo das interações ácidos húmicos-pireno em diferentes condições de pH e força iônica*. In. 26^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas – MG.

RAUEN, T. G.; MADUREIRA, L. A. S.; SIERRA, M. M. D. *Influência dos ácidos húmicos na solubilidade de poluentes orgânicos em solução aquosa*. In. 25^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas – MG. (apresentação oral)

RAUEN, T. G.; DUTRA, S. J.; FERNANDEZ, A. N.; SIERRA, M. M. D. *Tensoatividade de ácidos húmicos*. In. 24^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2001, Poços de Caldas – MG.