

## ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EXTRAÍDAS DA ÁGUA, SOLOS E SEDIMENTOS DA LAGOA DOS PATOS-MS, BRASIL

Júlio César Azevedo<sup>1</sup>, Mariana Carolina Teixeira<sup>2</sup> e Jorge Nozaki<sup>3</sup>

### RESUMO

Substâncias húmicas (SHs) foram extraídas de amostras de água, solo e sedimento, coletadas em 4 pontos da lagoa dos Patos - MS. As substâncias húmicas da água foram extraídas de acordo com o método proposto por Thurman e Malcolm (1981) e do sedimento e solo, de acordo com os métodos propostos pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Foram utilizadas as técnicas de espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis e espectroscopia de fluorescência atômica. Foram obtidas correlações lineares entre as medidas de absorvância no UV-Vis e de fluorescência atômica e as concentrações de ácido fúlvico (7,3 a 35,5 mg L<sup>-1</sup>) e de ácido húmico (4,8 a 23,9 mg L<sup>-1</sup>). Variações nos valores de pH (meio ácido, neutro e alcalino) não causaram modificações significativas nas medidas obtidas pelas técnicas de absorção no UV-Vis e de fluorescência atômica.

**Palavras-chave:** *ácido húmico, ácido fúlvico, espectroscopia, fluorescência, sedimento.*

### SPECTROSCOPIC STUDY OF HUMIC SUBSTANCES EXTRACTED FROM WATER, SOIL AND SEDIMENT SAMPLES OF THE PATOS LAKE, MS, BRAZIL

### ABSTRACT

Humic substances (HSs) were extracted from samples collected in 4 areas of sediment, water and soil from Patos' lake - MS. The humic substances from the water were extracted according to Thurman and Malcolm methods (1981) and, those from sediment and soil were extracted as proposed by the International Society of Humic Substances (ISHS). The following spectroscopic techniques were performed in this study: ultraviolet and visible (UV-Vis) and fluorescence emission. The effects of ambient factors as concentration and variations of pH in fluorescence emission of humic substances (fulvic and humic acids) were evaluated. It was observed that the UV-Vis technique and the intensity of emitted fluorescence from humic substances extracted from water has shown linear correlation with the variation of fulvic acid (7.3 the 35.5 mg L<sup>-1</sup>) and of humic acid (4.8 the 23.9 mg L<sup>-1</sup>) concentrations, considering just dissolved organic carbon. However, for pH variation (acid, neutral and alkaline media) significant variations were not observed in both, UV-Vis and fluorescence emission techniques.

**Key words:** *fluorescence, fulvic acid, humic acid, sediment, spectroscopy.*

<sup>1</sup> Licenciatura e Bacharelado em Química, Doutorado em Ecologia de Ecossistemas Aquáticos, NUPELIA, UEM. Trabalho com pesquisa na área de química analítica ambiental, análises de traço, matéria orgânica natural e tratamento de resíduos-UTFPR-Curitiba-PR

<sup>2</sup> Iniciação científica PIBIC/ CNPq/ FUNCEFET-PR. Desenvolve pesquisa com metais pesados em sedimentos e com a matéria orgânica natural (MON)-UTFPR-Curitiba-PR.

<sup>3</sup> Pós-Doutorado University of New Mexico-Albuquerque-NM-USA, NM, Estados Unidos. Trabalhou com pesquisa na área de química analítica ambiental, análises de traço, matéria orgânica natural e tratamento de resíduos-UEM-PR†.

## INTRODUÇÃO

Matéria orgânica natural (MON) é amplamente distribuída no solo, águas naturais e sedimentos. Mudanças hidrológicas e da composição do solo influenciam a quantidade da matéria orgânica em ambientes aquáticos, sua natureza química e, podem provocar diferentes efeitos biogeoquímicos no ecossistema (1,2). Assim, as características químicas da MON são influenciadas pela fonte do material (alóctones ou autóctones) e pelos processos biogeoquímicos envolvidos no ciclo do carbono nos sistemas terrestres e aquáticos. Estes fatores incluem o fluxo de carbono orgânico alóctone proveniente da bacia hidrográfica, fixação do carbono autóctone pelo fitoplâncton e plantas aquáticas, transformação e degradação do carbono alóctone e autóctone pela atividade biológica e/ou fotodegradação (1,3).

Numerosos estudos têm reconhecido a importância da MON em ambientes aquáticos, tamponando águas com teores baixos de alcalinidade (1), atuando no transporte e degradação de substâncias orgânicas e/ou inorgânicas vitais e tóxicas ao sistema (4), na mobilização e transporte de espécies hidrofóbicas, metais pesados (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn, Cr) e radionuclídeos (Pu, U, Am, Co) (1,2). A MON pode influenciar também a profundidade da zona fótica, afetando a penetração de radiação fotossintética ativa (1,2).

A determinação do carbono orgânico dissolvido (COD) não fornece dados sobre a natureza das substâncias orgânicas, pois MON é constituída por compostos orgânicos aquagênicos e pedogênicos (5). As proteínas, peptídeos e polissacarídeos ocorrem na proporção de 20 a 30 % da MON e os compostos refratários (aquagênicos e pedogênicos) correspondem de 70 a 80% (6). A matéria orgânica refratária de origem pedogênica (MORP) apresenta cadeia carbônica essencialmente com anéis aromáticos com substituintes carboxílicos e hidroxílicos. A matéria orgânica refratária de origem aquática (MORA) apresenta essencialmente uma cadeia carbônica constituída principalmente por carbono alifático (6,7).

Em ambientes aquáticos, a concentração de macromoléculas pedogênicas – ácido húmico (AH), polissacarídeos e lipídeos – é baixa devido à retenção destas substâncias pelas partículas do solo, enquanto proteínas e aminoácidos podem ser completamente degradados. Conseqüentemente, a composição química da MON varia de lago para lago, mas em muitos casos, as frações pedogênicas do ácido fúlvico e aquagênicos (polissacarídeos, peptídeos e seus semelhantes) predominam. A MORA é produzida pela excreção e decomposição do plâncton e macrófitas, incluindo compostos, como proteínas e carboidratos, derivados da parede celular, com elevada massa molecular (7), apresentando importante papel ambiental (8).

Diferentes técnicas têm sido aplicadas para caracterizar, diferenciar e classificar a matéria orgânica natural, entre elas as substâncias húmicas (SHs). Uma das técnicas utilizadas é a espectroscopia de fluorescência atômica. A intensidade de fluorescência é sensível a fatores ambientais, tais como: tipo de solvente, pH, força iônica, temperatura, potencial redox, interações com metais pesados e substâncias orgânicas, sendo estes fatores pouco conhecidos, os quais podem alterar a intensidade de fluorescência (IF) e o comprimento de onda de emissão (9-12). Compostos aromáticos contendo grupos funcionais ácidos ou básicos são sensíveis à variação do pH do meio, alterando o estado excitado da molécula pela transferência de prótons (13,14). Entretanto, de acordo com Miano & Senesi (13) nem todas as SHs sofrem alteração da IF com a variação de pH, como por exemplo, o ácido fúlvico, extraído da terra roxa, que não apresentou alteração da IF com o aumento do pH.

A intensidade de fluorescência também é alterada pelo aumento da massa molecular do soluto, ocorrendo deslocamento do pico para comprimentos de onda mais longos e diminuição da intensidade. Isto ocorre devido à aproximação dos cromóforos aromáticos, aumentando assim a desativação do estado excitado pela supressão ou absorção, por outros cromóforos, da energia emitida (14-16). Quando as SH são fracionadas, de acordo com sua massa molecular, diferenças na absorvância e fluorescência são observadas; em particular,

frações de menor massa molar apresentam maior intensidade de fluorescência e menor absorvância que as frações de maior massa molar (16,17). Uma possível explicação para este fenômeno é o fechamento da posição das subunidades hidrofóbicas, dentro do esqueleto estrutural da macromolécula, mascarados pelos grupos hidrofílicos. Embora as razões deste fato não sejam bem claras, podem ser usados para compreender as mudanças espectrais nas frações das SH, pois, quando a amostra apresenta baixa intensidade de fluorescência em  $\lambda$  mais longo, normalmente são referentes aos ácidos húmicos (10,11,13).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da variação do pH e da concentração das substâncias húmicas nas análises espectroscópicas na região do UV-Vis e da intensidade fluorescência emitida, verificando assim se ocorre deslocamento e diminuição da intensidade de fluorescência

com as variações de pH e da concentração das SHs.

## ÁREA DE ESTUDO

A planície de inundação do alto rio Paraná (Figura 1) é composta por um grande número de ambientes aquáticos, podendo-se destacar os canais secundários, ressacos, distributários com características de habitats semi-lênticos e lagoas temporárias e permanentes. Estes ambientes apresentam uma considerável variabilidade quanto às características limnológicas, que estão associadas ao grau de conexão (ou isolamento) com os rios, ao potencial de ação do vento (fetch), à profundidade e ao regime hidrológico dos rios Paraná e Ivinheima (18). Os afluentes, da margem direita, deságuam em um conjunto de canais secundários formado pelo rio Baía, pelo canal de Curutuba e pelo baixo curso do rio Ivinheima.

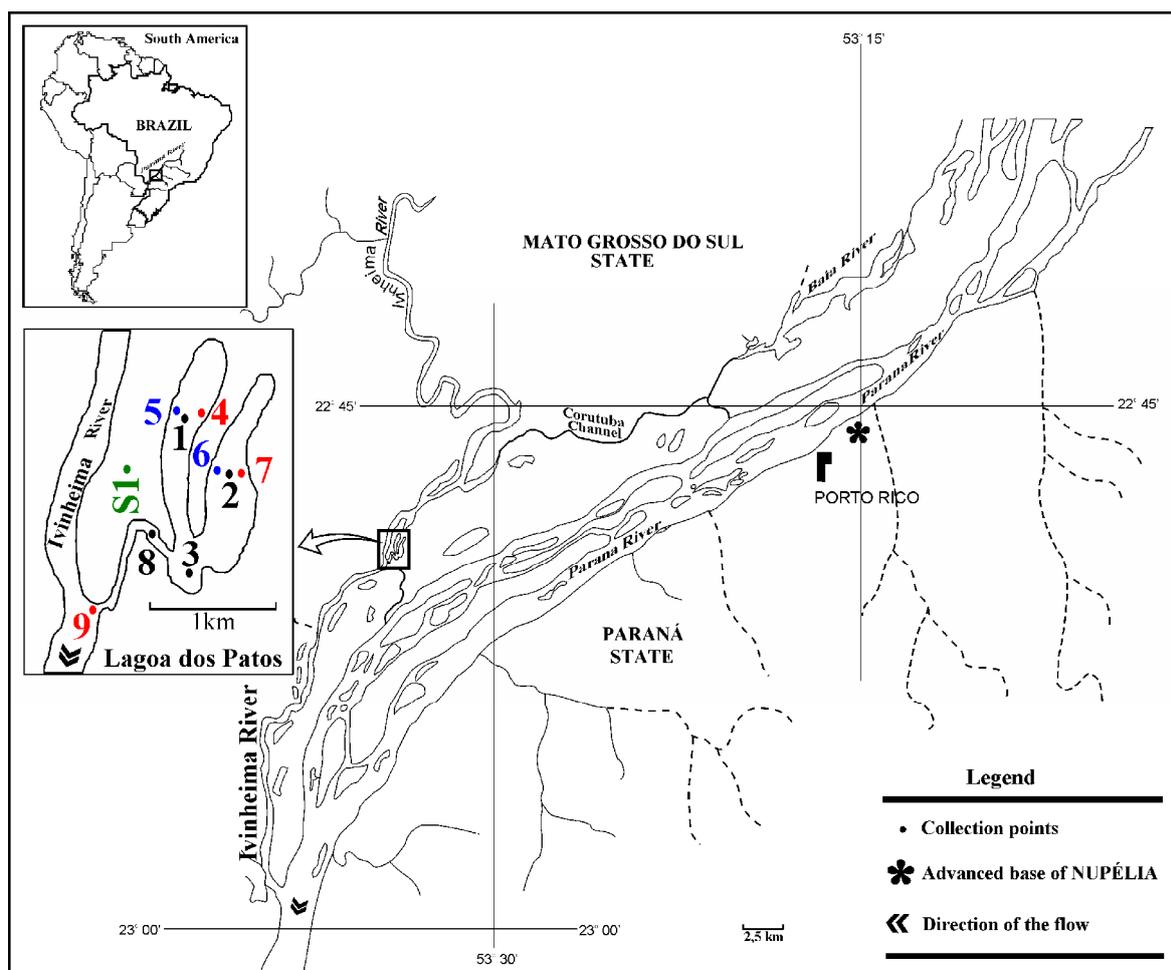


Figura 1 – Localização da Lagoa dos Patos/MS. Amostragens nos pontos centrais (1, 2 e 3), nas margens (4, 5, 6 e 7), no canal (8), na entrada da lagoa (9) e no solo (S1).

O rio Ivinheima apresenta profundidade média de 3,9 m, tem um curso perpendicular ao rio Paraná até sua entrada na planície, onde apresenta uma inflexão de noventa graus e passa a correr paralelamente ao Rio Paraná. As ligações entre o complexo secundário e o canal principal funcionam como canais contribuintes e distribuintes, de acordo com a diferença de nível entre os diversos rios em comunicação. Este rio apresenta vegetação diferenciada em suas margens que vai desde a herbácea até a formação de extensas áreas com mata ripária em diferentes estágios de regeneração. As amostras foram coletadas na lagoa dos Patos/Ms, a qual apresenta uma profundidade média de 3,50 m, área de aproximadamente 113,8 ha, comprimento de 2.065,6 m e perímetro de 14.783,8 m. Distancia-se do rio Ivinheima por 10m, com um dique de apenas 0,5 m de altura, e sua conexão com o rio é realizada através de canal com 8m de largura (19).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sedimento foram coletadas em jul/02 (P04 e P08) e jan/03 nos pontos do centro (P1 ao P3), nas margens (P4 ao P7), no canal de comunicação da lagoa dos Patos, com o rio Ivinheima (P8) e na entrada do canal (P9), na profundidade de 20 cm, com draga de Petersen modificada, homogeneizada e transferida para os sacos de amostragem Whirl Pack, que foram vedados e preservados a -20°C. As amostras de solo (S1) foram coletadas (jul/02 e jan/03) na área que separa o rio Ivinheima da lagoa dos Patos – MS e a amostra de água (P1) foi coletada em jan/03.

Esta lagoa foi escolhida por apresentar uma influência direta do rio Ivinheima, o qual não é represado, apresentando assim grandes quantidades de material particulado pedogênico, o qual é arrastado para dentro da lagoa.

As análises espectroscópicas foram realizadas, nas soluções preparadas em triplicata, das SHs extraídas (AF e AH). A variação da concentração, em termos de carbono orgânico dissolvido (COD), foi de 3,5 até 35 mg L<sup>-1</sup> para o AF e de 3,5 até 25 mg L<sup>-1</sup> para o AH. O estudo da variação do pH foi realizado, em triplicata, em meio ácido (pH 4,0), próximo ao neutro (pH = 7,0) e em meio básico (pH = 10,0). Os espectros da

absorvância foram obtidos no espectrofotômetro Cary 50 da Varian e as análises de fluorescência no equipamento Fluorescence Spectrophotometer F-4500 Hitachi. Foram obtidos espectros de emissão (□Exc de 314 e 370 nm), de excitação (emissão em 520 nm) e de varredura sincronizada (□□ = 18 nm). Todos os espectros de fluorescência foram obtidos aplicando-se 240 nm min<sup>-1</sup>, fenda de 5 nm, cubeta de quartzo de 1 cm e água Milli-Q como branco. Os espectros das amostras foram subtraídos do espectro da água Milli-Q (branco). Os dados foram avaliados através da regressão linear para a variação da concentração e a variação do pH foi avaliado através do Teste t, verificando possíveis diferenças entre as médias das análises das soluções preparadas em triplicatas.

Os ácidos fúlvico (AF) e húmico (AH) foram extraídos, segundo o método de Thurman e Malcolm (20), de 150 L de água filtrada (0,45 □m), coletada em jan/03 no ponto P1, denominado de LP. Do sedimento e do solo, as substâncias húmicas foram extraídas de acordo com o método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) (21).

### *Extração das substâncias húmicas do sedimento e do solo*

A Figura 2, apresenta o esquema simplificado do método de extração aplicado. Das amostras de sedimento e do solo foram retiradas às folhas, galhos e raízes. Em 100 g da amostra foi adicionado HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> até pH 1. A seguir, foi adicionado HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, mantendo a razão de 10 mL de HCl por grama da amostra. A suspensão foi agitada por 1 h e o sobrenadante separado por centrifugação. Este sobrenadante foi denominado “ácido fúlvico I (AF-I)”. O precipitado foi neutralizado com NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> a pH 7. A seguir, foi adicionado NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, até obter a razão de 10mL de NaOH/g da amostra. A extração foi realizada com agitação intermitente por uma noite, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. O sobrenadante foi separado por centrifugação, descartando-se o resíduo (humina). O sobrenadante foi acidificado até pH 1,0 com HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> com agitação constante e repouso por uma noite. Novamente a separação foi realizada por centrifugação, separando o precipitado (ácido húmico - AH) do sobrenadante, que foi denominado de “ácido fúlvico II (AF-II)”.

O AF-I foi percolado em uma coluna contendo resina DAX-8, na vazão de 15 vezes o volume da resina por hora. O efluente foi descartado e a coluna foi lavada com água deionizada, na quantidade de 0,65 volumes da coluna. O ácido fúlvico foi removido por retro-eluição, com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, adicionando a quantidade equivalente a um volume da coluna, seguido de 2 a 3 volumes da coluna, de água deionizada. Acidificou-se imediatamente a solução com HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> até pH 1,0. Em seguida, adicionou-se HF até uma concentração final de 0,30 mol L<sup>-1</sup>.

O mesmo procedimento do AF-I foi aplicado ao sobrenadante denominado AF-II.

Os eluatos obtidos foram misturados e passados novamente pela coluna com resina DAX-8. A coluna foi lavada com água deionizada, na quantidade de 0,65 volumes da coluna. O ácido fúlvico foi removido, por retro-eluição, com adição de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> na quantidade equivalente a 1 volume da coluna. Em seguida, foram adicionados 2 volumes, da coluna, de água deionizada. O eluato final foi passado por uma coluna contendo uma resina catiônica forte na forma H<sup>+</sup>, usando três vezes o número de moles de íons Na<sup>+</sup> contido na solução. O eluato, contendo o ácido fúlvico, foi seco por liofilização (Christ, modelo Alpha 1-2 LD).

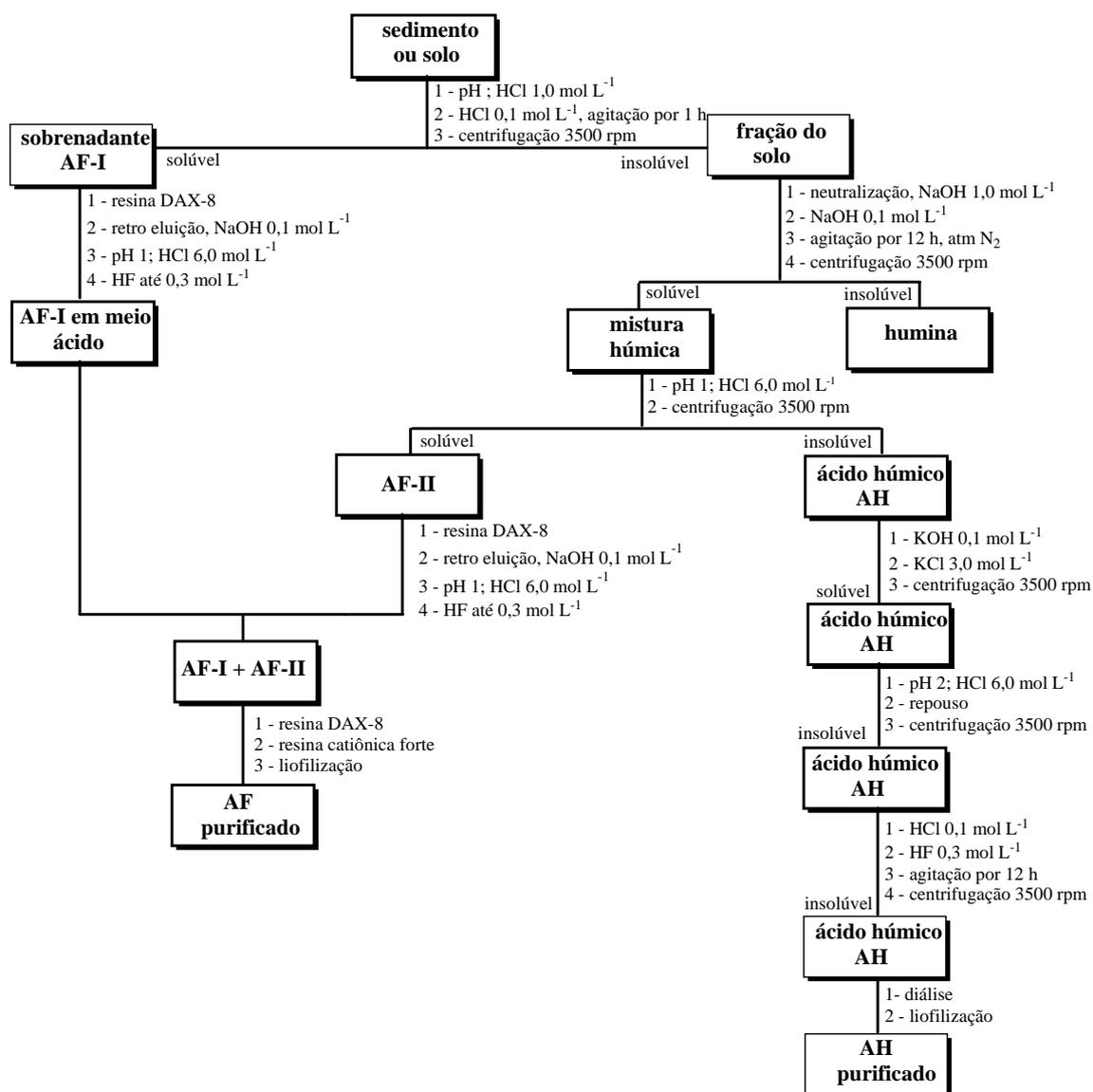


Figura 2 – Fluxograma empregado na extração das substâncias húmicas dos sedimentos e do solo (IHSS).

O precipitado de ácido húmico (AH) foi dissolvido em KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> sob atmosfera de N<sub>2</sub> e adicionado KCl sólido até a concentração final de 0,3 mol L<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>. A mistura foi centrifugada para remover sólidos suspensos. O AH foi precipitado com adição de HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> até pH 2, com agitação constante, e deixou-se em repouso por uma noite. O ácido húmico foi separado por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (AH) transferido para recipiente plástico onde foram adicionados HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> + HF 0,3 mol L<sup>-1</sup>, com agitação por uma noite. Este procedimento foi repetido e o sobrenadante foi separado do AH por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o resíduo (AH) purificado em tubo de diálise (faixa de corte de 12000 daltons) com água deionizada até a obtenção de teste negativo para o cloreto (três meses). A amostra de ácido húmico foi seca por liofilização.

#### Extração das substâncias húmicas da água da lagoa

A amostra de água foi filtrada com membrana 0,45 μm, em seguida, a amostra foi acidificada, até pH 2,0 com HCl. Pela ação da gravidade, os 150 L de água foram passados na coluna contendo a resina DAX-8, na vazão de 15 vezes o volume da resina por hora. O eluato foi descartado e a coluna foi lavada com água deionizada, na quantidade de 0,65 volume da coluna. As substâncias húmicas foram removidas por retro-eluição com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O eluato foi misturado, acidificado com HCl e percolado novamente na coluna DAX-8. As substâncias húmicas foram removidas por retro-eluição com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A amostra foi acidificada com HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> e centrifugada, sendo o resíduo composto de AH e o sobrenadante por AF. O AF foi percolado novamente, na coluna DAX-8 e realizada a retro-eluição. O AH e AF foram purificados por meio do procedimento descrito anteriormente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível

A Figura 3 apresenta os espectros, em diferentes concentrações, do ácido fúlvico (AF-LP) extraído da água da lagoa dos Patos. Os demais espectros dos AFs foram semelhantes a este, variando somente sua absorvância. Para os ácidos fúlvicos (Figura 3A) a

absorvância em 254 nm é linear com a variação da concentração, independente da amostra de AF extraído (Figura 3B). Foi observada a variação da absorvância específica (L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) em função do tipo de AF (Tabela 1), sendo o AF extraído do solo (AF-S2) o que apresenta maior absorvância específica. Esta diferença é proveniente da maior quantidade de anéis aromáticos e de grupos substituintes nestes anéis aromáticos existentes nas SHs, que foram confirmados pelo teste t e pelas análises espectroscópicas de NMR (13C e 1H), espectroscopia de infravermelho, matriz excitação-emissão de fluorescência e pelas análises de termogravimétrica realizadas nestas SHs (dados não mostrados).

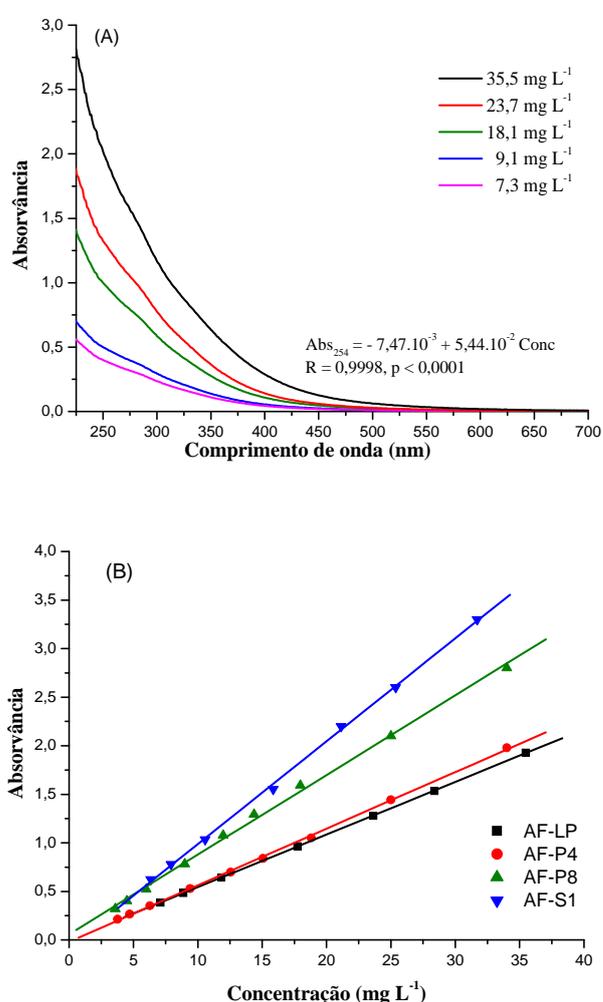


Figura 3 – (A) Espectros da absorvância na região do ultravioleta e visível, do ácido fúlvico extraído da água da lagoa dos Patos/MS, em diferentes concentrações; (B) Regressão linear da variação da concentração de AF extraído da água (AF-LP), do sedimento (P4 e P8) e do solo (S1).

Na Figura 4A, constam os espectros, em diferentes concentrações, do ácido húmico

(AH-LP) extraído da água da lagoa dos Patos. Os demais espectros dos AHs foram semelhantes a este, variando somente sua absorvância. Para os ácidos húmicos foi observado que a absorvância em 254 nm é linear com a variação da concentração para todos os AH's extraídos (Figura 4B). As diferenças (Tabela 1), na absorvância específica ( $L\ g^{-1}\ cm^{-1}$ ), estão relacionadas com o grau de humificação das substâncias ou o grau de substituintes existentes nos anéis aromáticos das SHs. Os espectros de absorvâncias na região do ultravioleta, das SH's, são, principalmente, provenientes dos

sinais dos cromóforos que apresentam ligação pi ( $\pi$ ), principalmente dos anéis aromáticos (3,22).

A Figura 5 apresenta o efeito da variação do pH nos espectros da absorvância das SHs extraídos da água da lagoa. Tanto o AF (Figura 5A) como o AH (Figura 5B) apresentaram uma pequena variação da absorvância na região do visível ( $\lambda > 300\ nm$ ), com o aumento do pH, proveniente da alteração dos grupos cromóforos da região visível, como grupos quinonas.

Tabela 1 – Valores médios (N = 6) da absorvância específica ( $L\ g^{-1}\ cm^{-1}$ ) das substâncias húmicas extraídas da água, solo e sedimento.

Local	Ácido	Média	Desvio padrão
Água	AF-LP	54,29	0,15
	AH-LP	44,02	0,42
Solo	AF-S1	100,43	2,97
	AH-S1	61,53	0,48
Ponto 8	AF-P8	88,69	1,20
	AH-P8	71,20	0,85
Ponto 1	AH-P1	79,29	1,26
Ponto 4	AF-P4	56,15	0,36
Ponto 5	AH-P5	35,65	1,06

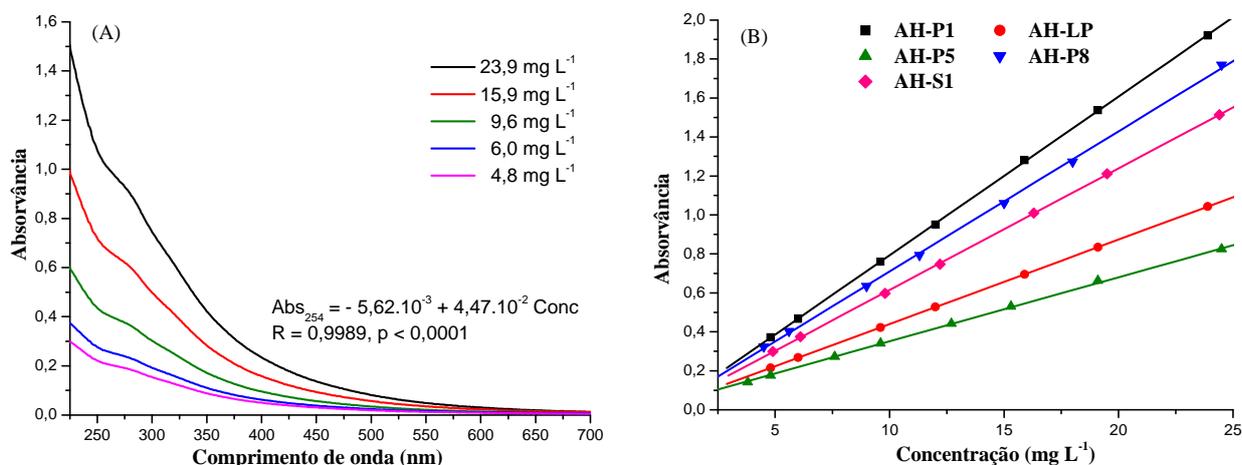


Figura 4 – (A) Espectros da absorvância na região do ultravioleta e visível do ácido húmico extraído da água da lagoa dos Patos/MS em diferentes concentrações; (B) Regressão linear da variação da concentração de AH extraído da água (AH-LP), do sedimento (pontos P1, P5 e P8) e do solo (S1).

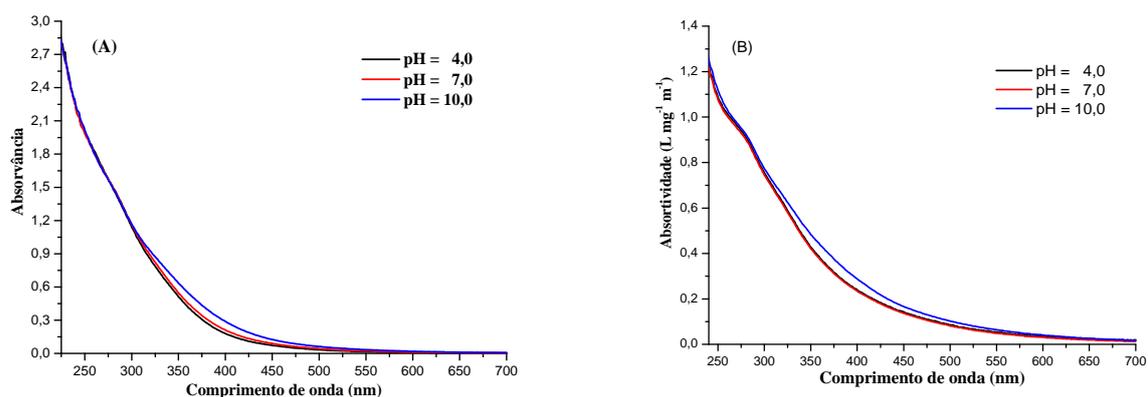


Figura 5 – Variação da absorvância na região do ultravioleta e visível, em três níveis de pH, das SHs extraídas da água da lagoa dos Patos/MS. (A) ácido fúlvico e (B) ácido húmico.

### Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Os espectros de fluorescência convencionais (emissão ou excitação) apresentam limitadas aplicações para polímeros complexos, como as SH's. Já a técnica, de emissão de fluorescência, de varredura sincronizada, apresenta a vantagem de maior sensibilidade, melhor resolução e detalhes em seus espectros (13). Os espectros sincronizados são obtidos através da varredura simultânea da emissão e excitação, fixando a diferença entre o comprimento de onda de emissão e excitação ( $\Delta\lambda = \lambda_{Em} - \lambda_{Ex}$ ). Estudos têm aplicado diferentes variações entre os  $\lambda_{Ex}$  e  $\lambda_{Em}$  ( $\Delta\lambda$ ), tornando assim mais difícil à comparação entre os resultados. Esta variação ( $\Delta\lambda$ ) provoca deslocamento do pico, alteração na sua forma e na intensidade de fluorescência (Figura 6). Alguns autores empregam:  $\Delta\lambda = 18$  nm (13,23-25);  $\Delta\lambda = 20$  nm (14),  $\Delta\lambda = 25$  nm (26) e  $\Delta\lambda = 30$  nm (27). Miano e Senesi (13) e Senesi *et al.* (23) consideram que a variação

de 18 nm, entre  $\lambda_{Ex}$  e  $\lambda_{Em}$ , resulta em espectro com melhor resolução para estudar a matéria orgânica natural.

Na Figura 6 constam os espectros sincronizados, para diferentes valores de  $\Delta\lambda$ , para o ácido fúlvico (Figura 6A) e ácido húmico (Figura 6B). Este mesmo efeito na variação de  $\Delta\lambda$  foi observado por Miano e Senesi (13), corroborando com os resultados obtidos para as substâncias húmicas extraídas da Lagoa dos Patos/MS.

O espectro do AF (Figura 6) apresentam dois picos distintos, principalmente para menores variações de  $\Delta\lambda$ , indicando a presença de fluoróforos similares aos dos AFs pedogênicos. Apesar dos espectros de ácido fúlvico apresentar bandas largas, a IF próxima de 440 nm pode ser atribuído a polifenóis, e a banda de 440 a 480 nm indica a presença de compostos com alto peso molecular ou policondensados (14).

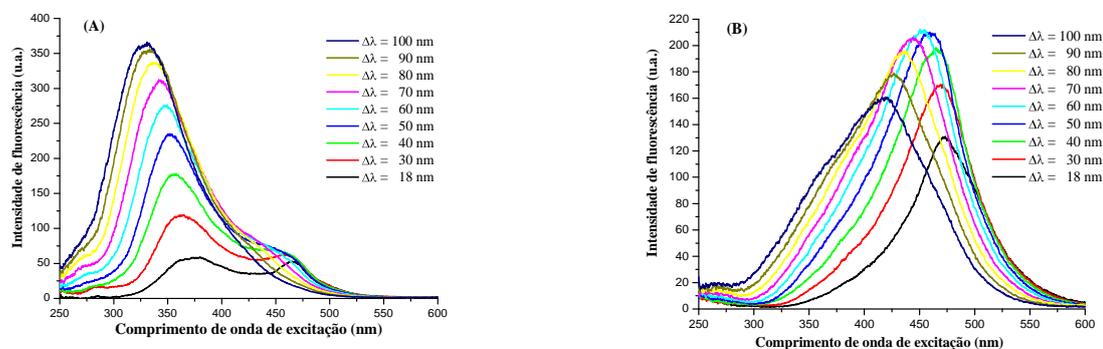


Figura 6 – Variação da diferença entre o comprimento de onda de excitação e emissão ( $\Delta\lambda$ ), nos espectros sincronizados das substâncias húmicas: (A) ácido fúlvico e (B) ácido húmico extraído da água da lagoa dos Patos/MS.

Estudos têm demonstrado também que a intensidade de fluorescência é sensível a fatores ambientais, tais como: tipo de solvente, pH, força iônica, temperatura, potencial redox, interações com metais pesados e substâncias orgânicas (9-12). Estes efeitos são pouco conhecidos e alteram a IF e o comprimento de onda de emissão.

A variação da intensidade de fluorescência emitida com a variação do pH, das soluções de AH e AF, está relacionada com a presença de grupos funcionais (ácidos ou básicos) nos compostos aromáticos. Esta variação está particularmente relacionada com os grupos fenólicos, que sofrem ionização progressiva com o aumento do pH, causando rompimento das ligações de pontes de hidrogênio inter e intramolecular, alterando a conformação da molécula e tornando-a mais aberta (13). Provenzano et al. (28) trabalharam com polímeros, sintetizados por fungos, com grupos funcionais semelhantes às

SHs, verificando que a variação do pH muda a intensidade de fluorescência pela alteração dos grupos funcionais ácidos, configuração das ligações inter e intramoleculares e do rearranjo das estruturas.

Na Figura 7 constam os espectros sincronizados das substâncias húmicas em função da variação do pH. Observa-se neste caso que ocorreu uma pequena diminuição da intensidade de fluorescência emitida pelo ácido fúlvico e um pequeno deslocamento para comprimentos de onda mais longos, no caso do ácido húmico. Segundo Miano e Senesi (13), o ácido fúlvico, extraído da terra roxa, não apresenta diminuição significativa da intensidade de fluorescência com o aumento do pH, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, pois não foi observada grande variação nos espectros, principalmente da intensidade máxima de emissão.

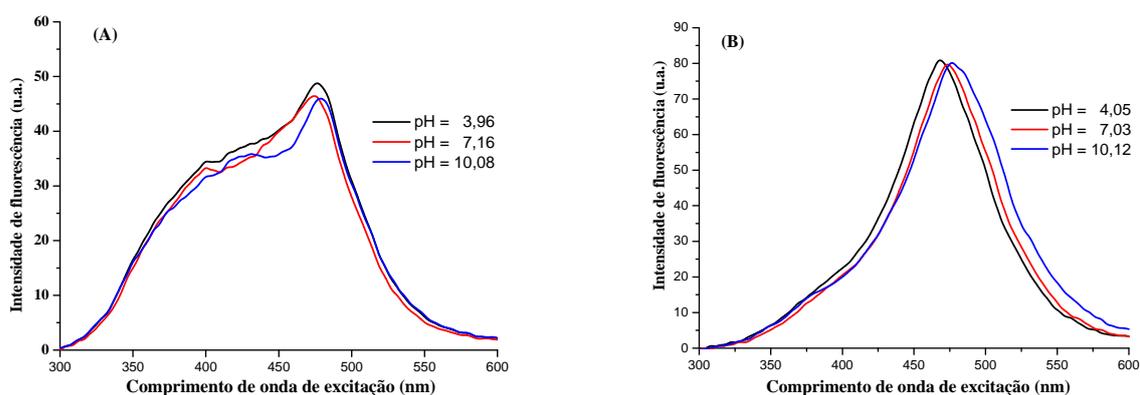


Figura 7 – Espectros sincronizados, em três níveis de pH, das SHs extraídas da água da lagoa dos Patos/MS. (A) ácido fúlvico e (B) ácido húmico.

Segundo Miano et al. (1988) e Stewart e Wetzel (1980), a intensidade de fluorescência também é alterada pelo aumento da massa molecular do soluto, ocorrendo deslocamento do pico para comprimentos de onda mais longos e diminuição da intensidade emitida. Isto ocorre, provavelmente, devido à aproximação dos cromóforos aromáticos, aumentando assim a desativação do estado excitado pela supressão ou absorção, por outros cromóforos, da energia emitida (14,15).

Para baixas concentrações de fluoróforos, a intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à

concentração. Quando  $\square_{bc}$  aumenta, a relação entre a intensidade de fluorescência emitida e a concentração, em termos de carbono orgânico deixa de ser linear (10). Miano e Senesi (13) estudaram o efeito do aumento da concentração de SH's (AF e AH) padrão IHSS e o extraído do solo de terra roxa. Para o AF observaram o aumento da intensidade da fluorescência emitida em função da concentração, até 120 mg L<sup>-1</sup>. Já para o AH ocorre aumento da intensidade de fluorescência até a concentração de 70 mg L<sup>-1</sup>. Para concentrações mais altas de AH, observa-se diminuição da intensidade de fluorescência e alteração de alguns picos,

causados pelo efeito da conversão interna e colisões entre as moléculas.

Os espectros de emissão de fluorescência (excitação de 370 nm) com variação da concentração, em termos de COD, são mostrados na Figura 8, os quais são

semelhantes aos espectros obtidos por Senesi (10), Chen et al (14) e Miano et al (15). Para as amostras de SH's extraído do solo, sedimento e da água da lagoa, foi observado que a IF emitida é diretamente proporcional à concentração de COD ( $\text{mg L}^{-1}$ ), tanto para o AF (Figura 8A) como para o AH (Figura 8B).

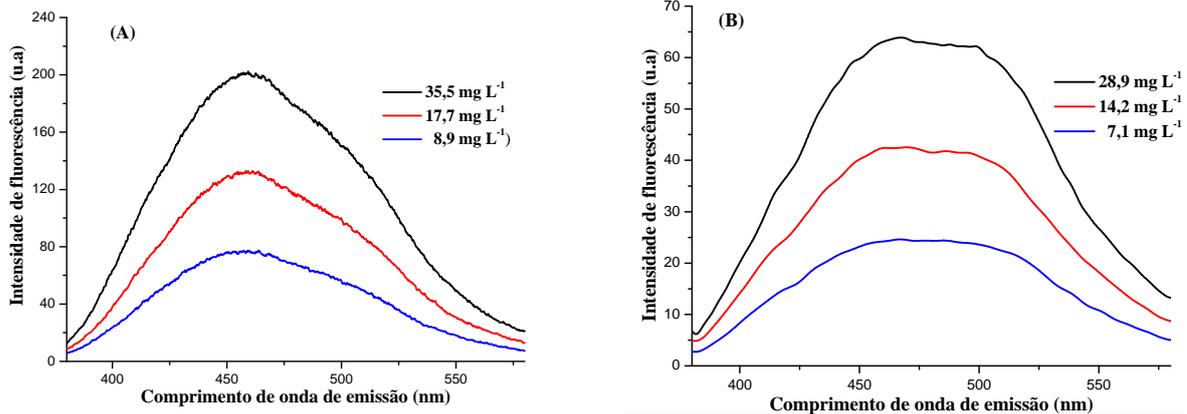


Figura 8 – Variação da intensidade de fluorescência emitida (excitação de 370 nm) em três concentrações diferentes de ácido fúlvico (A) e; ácido húmico (B).

Na Figura 9 constam os gráficos da variação da IF (emissão 450 nm, excitação 370 nm) em função da concentração de COD. Os coeficientes de correlação linear dos ácidos fúlvicos variaram de 0,99031 a 0,99791 (Figura 9A) e para os ácidos húmicos variaram de 0,90843 a 0,9909 (Figura 9B). Foi observado que os coeficientes de correlação linear obtidos nos espectros de absorvância na região do ultravioleta e visível para os ácidos fúlvicos (variaram de 0,99886 a

0,99993, Figura 3B) e ácidos húmicos (variaram de 0,99972 a 0,99991, Figura 4B) são melhores que os obtidos na técnica de emissão de fluorescência. Esta menor linearização da intensidade de fluorescência com o COD está relacionada com o fato da técnica de fluorescência sofrer maior influência de fatores como pH, salinidade e características estruturais (14,15).

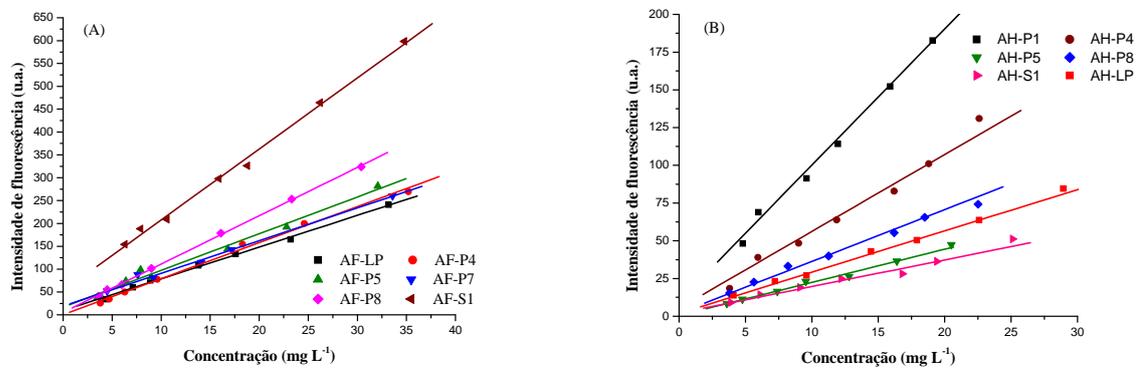


Figura 9 – Regressão linear entre a intensidade de fluorescência emitida e a concentração da substância húmica em termos de COD: (A) ácidos fúlvicos (emissão em 450 nm) extraídos da água (LP), do sedimentos (P4, P5, P7 e P8) e do solo (S1); (B) ácidos húmicos (emissão em 500 nm) extraídos da água (LP), do sedimentos (P1, P4, P5 e P8) e do solo (S1)

## CONCLUSÃO

Os resultados das análises espectroscópicas, UV-Vis e fluorescência, confirmam que estas técnicas podem ser empregadas para analisar substâncias húmicas. O que deve ser levado em conta, principalmente para a análise de emissão de fluorescência, são os efeitos que a estrutura molecular do composto húmico podem causar na sua intensidade emitida. Para estes compostos húmicos estudados, não foram observadas variações significativas na intensidade de fluorescência emitida ou do deslocamento do pico de máxima emissão, com a variação do pH. Já em termos de concentração, observou-se uma linearização entre a variação da concentração, em termos de COD, e a intensidade de fluorescência emitida para o ácido fúlvico e ácido húmico, mas não sendo possível fixar o comprimento de onda de máxima emissão para ambas substâncias, pois estes ácidos apresentam máxima emissão em comprimentos de onda diferentes. Para o ácido fúlvico o pico máximo de emissão é próximo de 450 nm e para os ácidos húmicos é próximo de 500 nm.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo suporte financeiro. Ao Prof. PhD Jorge Nozaki (1940-2006), pela sua amizade e orientação.

Júlio César Azevedo  
Mariana Carolina Teixeira  
Jorge Nozaki

*Endereço para correspondência: Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná,  
Departamento de Química e Biologia.  
Av. Sete de Setembro, 3165  
CEP – 80230-901  
Centro – Curitiba, Paraná – Brasil  
e-mail: jcravevedo@hotmail.com*

*Recebido em 08/10/06*

*Revisado em 07/11/06*

*Aceito em 28/11/06*

## REFERÊNCIAS

- (1) AIKEN, G.; COTSARIS, E. Soil and Hydrology: their effect on NOM. **J. AWWA**, January, p. 36-45, 1995.
- (2) WESTERHOFF, P.; ANNING, D. Concentration and characteristics of organic carbon in surface water in Arizona: influence of urbanization. **Journal of Hydrology**, 236, p. 202-222, 2000.
- (3) CHEN, J.; GU, B.; LEOEUF, E. J.; PAN, H.; DAI, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. **Chemosphere**, 48, p. 59 –68, 2002.
- (4) FRIMMEL, F. H. Characterization of natural organic matter as major constituents in aquatic systems. **J. Contam.Hydrol.**, 35, p. 201–216, 1998.
- (5) BUFLE, J.; ZALI, O.; ZUMSTEIN, J.; VITRE, R. Analytical methods for the direct determination of inorganic and organic species: seasonal changes of iron, sulfur, and pedogenic and aquogenic organic constituents in the eutrophic Lake Bret, Switzerland. **Science of the Total Environment**, 64, p. 41-59, 1987.
- (6) ZUMSTEIN, J.; BUFLE, J., Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in an eutrophic lake. **Water Research**, 23, (2), p. 229 – 239, 1989.
- (7) WILKINSON, K.J.; JOZ-ROLAND, A.; BUFLE, J. Different roles of pedogenic fulvic acids and aquagenic biopolymers on colloid aggregation and stability in freshwaters. **Limnol. Oceanogr.**, 42 (8), p. 1714-1724, 1997.
- (8) JONES, R. I. The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains. **Hydrobiology**, 229, p. 73-91, 1992.
- (9) CABANISS, S. E.; SHUMAN, M. S. Synchronous fluorescence spectra of natural waters: tracing sources of dissolved organic matter. **Marine Chemistry**, 21, p. 37-50, 1987.
- (10) SENESI N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. **Anal. Chim. Acta**, 232, p. 77-106, 1990.
- (11) HAUTALA, K.; PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses. **Water Research**, 34 (1), p. 246-258, 2000.
- (12) PEURAVUORI, J.; KOIVIKKO, R.; PIHLAJA, K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. **Water Research.**, 36, p. 4552-4562, 2002.
- (13) MIANO, T. M.; SENESI, M. Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry. **Science of the Total Environment**, 117/118, p. 41–51, 1992.

- (14) CHEN, J.; LEBOEUF, E. J.; DAÍ, S.; GU, B. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. **Chemosphere**, 50, p. 639–647, 2003.
- (15) MIANO, T.M.; SPOSITO, G., MARTIN, J.P. Fluorescence spectroscopy of humic substances. **Soil Science Society of America Journal**, Urbana, 52, p. 1016-1019, 1988.
- (16) STEWART, A.J.; WETZEL, R.G. Fluorescence absorbance ratios: A molecular-weight tracer of dissolved organic matter. **Limnol. Oceanogr.** 25, p. 559-564, 1980.
- (17) WANG, Z.D.; PANT, B.C.; LANGFORD, C.H. Spectroscopic and structural characterization of a Laurentian fulvic acid. Notes of the origin of the color. **Anal. Chim. Acta** 232, p. 43-49, 1990.
- (18) THOMAZ, S.M.; ROCHA, R.R.A.; PAGIORO, T.A.; ROBERTO, M.C.; CARVALHO, S.B.; NAKAMURA, A.K.S.; CARVALHO, P.; BARCEL, P.S C.; TAKA, M. Variação espacial e temporal de fatores limnológicos. In: Relatório anual. **A planície de inundação do alto rio Paraná**. Site 6 – PELD/CNPq. (Coordenação: Agostinho, A. A.; Thomaz, S. M.; Nakatani, K.). Nupélia, PEA, Maringá, 2001.
- (19) SOUZA FILHO, E.E.; STEVAUX, J.C. Geologia e geomorfologia do complexo rio Baía, Curutuba, Ivinhemima. In: Vazzole A.E.A.M., Agostinho A. A. and Hahn, N. S. **A planície de inundação do alto rio Paraná**. Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. EDUEM, Nupélia, Maringá, p. 3-46, 1997.
- (20) THURMAN, E.M.; MALCOLM, R.L. Preparative isolation of aquatic humic substances. **Environmental Science & Technology**, 4, p. 463-466, 1981.
- (21) MACHADO, P.L.O. A. Método para a extração de substâncias húmicas do solo – Ácido húmico e ácido fúlvico. **Comunicado Técnico – Embrapa Solos**, n. 1, dez., p. 1-4, 1999.
- (22) KORSHIN, G.V.; LI C. W.; BENJAMIN, M.M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. **Water Reserarch**, 31: p. 1787-1795, 1997.
- (23) SENESI, N.; MIANO, T. M.; PROVENZANO, M.R.; BRUNETTI, G. Spectroscopy and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. **Science of the Total Environment**, 81/82, p. 143-156, 1989.
- (24) MIANO, T.; SPOSITO, G.; MARTIN, J.P., Fluorescence spectroscopy of model humic acid-type polymers. **Geoderma**, 47, p. 349-359, 1990.
- (25) KALBITZ, K.; GEYER, S.; GEYER, W.A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances. **Chemosphere**, 40, p. 1305-1312, 2000.
- (26) FERRARI, G.; MINGAZZINI, M. Synchronous fluorescence spectra of dissolved organic matter of algal origin in marine coastal waters. **Mar. Ecol.: Prog. Ser.**, 125, p. 305–315, 1995.
- (27) LU, X.Q.; MAIE, N.; HANNA, J.V.; CHILDERS, D.L.; JAFFÉ, R. Molecular characterization of dissolved organic matter in freshwater wetlands of the Florida Everglades. **Water Research**, 37, p. 2599-2606, 2003.
- (28) PROVENZANO, M.R.; MIANO, T.M.; SENESI, N. Concentration and pH effects on the fluorescence spectra of humic acid-like soil fungal polymers. **Science of the Total Environment**, 81/82, p. 129-136, 1989.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.