



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA



ADNÍVIA SANTOS COSTA MONTEIRO

Especiação de Chumbo e Cádmio: desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a avaliação da influência da matéria orgânica natural e substâncias húmicas

Araraquara
2017

ADNÍVIA SANTOS COSTA MONTEIRO

Especiação de Chumbo e Cádmio: desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a avaliação da influência da matéria orgânica natural e substâncias húmicas

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
doutora em Química.

Orientador: Prof.Dr. André Henrique Rosa
Co-orientador: Prof. Dr. José Paulo S. Pinheiro

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

M772e Monteiro, Adnivia Santos Costa
Especiação de cádmio e chumbo: desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a avaliação da influência da matéria orgânica natural e substâncias húmicas / Adnivia Santos Costa Monteiro. – Araraquara : [s.n.], 2017
120 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: André Henrique Rosa
Coorientador: José Paulo Soares Pinheiro

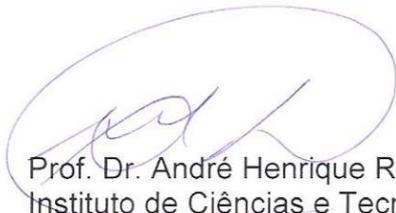
1. Especiação (Química). 2. Análise eletroquímica.
3. Ultrafiltração. 4. Matéria orgânica. 5. Substâncias húmicas.
I. Título.

ADNÍVIA SANTOS COSTA MONTEIRO

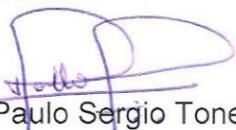
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 07 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. André Henrique Rosa (Orientador)
Instituto de Ciências e Tecnologia – UNESP, Sorocaba - SP



Prof. Dr. Paulo Sergio Tonello
Instituto de Ciências e Tecnologia – UNESP, Sorocaba - SP

Profª Drª Marcia Cristina Bisinoti
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto - SP

Profª Drª Maria Olimpia de Oliveira Resende
Instituto de Química – USP, São Carlos -SP



Prof. Dr. Wander Gustavo Botero
Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Arapiraca - AL

DADOS CURRICULARES

1 IDENTIFICAÇÃO

1.1 Nascimento: 24 de Agosto de 1987

1.2 Nacionalidade: Brasileira

1.3 Naturalidade: Itabaiana-Sergipe

1.4 Filiação: Josefa Júlia dos Santos
Antonio Paz da Costa

Nome em citações bibliográficas: COSTA, A. S.; Costa, Adnivia Santos; MONTEIRO, A.S.C.; MONTEIRO, ADNÍVIA SANTOS COSTA; MONTEIRO, ADNÍVIA S.C.;

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Graduação em Química Bacharelado

Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil.

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Uso de espectroscopia de fluorescência na caracterização das fontes de matéria orgânica dissolvida no estuário do Rio Piauí.

Período: 2005 - 2008

Orientador: José do Patrocínio Hora Alves

2.2 Mestrado em Química

Universidade Federal de Sergipe, UFS, Brasil.

Título: Caracterização da matéria orgânica dissolvida das bacias hidrográficas do Estado de Sergipe.

Período: 06/2009- 06/2011

Orientador: José do Patrocínio Hora Alves

3 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigos publicados no período do doutorado

1. WATANABE, C.H.; GONTIJO, E.S.J.; **MONTEIRO, A.S.C.**; LIRA, V.S.; KUMAR, N.T.; BUENO, C.C.; FRACÁCIO, R.; ROSA, A.H. Toxicity assessment of arsenic and cobalt in the presence of aquatic humic substances of different molecular sizes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 139, p. 1-8, 2017.
2. **MONTEIRO, A. S. C.**; PARAT, C.; ROSA, A. H., PINHEIRO, J. P. "Towards field trace metal speciation using electroanalytical techniques and tangential ultrafiltration". *Talanta*, v.152, p. 112-118, 2016.
3. GONTIJO, E. S. J.; WATANABE, C. H.; **MONTEIRO, A. S. C.**; TONELLO, P. S.; SILVA, G.A.; ROESER, H. M. P.; FRIESE, K.; ROSA, A. H. Distribution and bioavailability of arsenic, aluminium and iron in natural waters of a mining area in the Quadrilátero Ferrífero (Brazil) studied by ultrafiltration and diffusive gradients in thin films. *Chemosphere*, v. 164, p. 290-298, 2016.
4. SOUZA, S.O.S.; **MONTEIRO, A.S.C.**; ÁVILA, D.V.L.; CORREIA, F.O.; GARCIA, C.A.B.; ALVES, J.P.H.; ARAÚJO, R.G.O. Optimization of analytical method for the simultaneous determination of thorium and uranium in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Doi. 0103 – 5053. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.27, p. 799-806, 2016.

3.2 Artigos submetidos

1. PINHEIRO, J.P.; **MONTEIRO, A.S.C.**; JANOT, N.; GROENENBERG, B.J.; ROSA, A.H. Especificação termodinâmica de metais traço com substâncias húmicas: o modelo Nica-Donnan. Submetido na revista *Química Nova* em janeiro 2017.
2. ARGUELHO, M.L.P.M.; ALVES, J.P.H.; **MONTEIRO, A.S.C.**; GARCIA, C.A.B. Characterization of dissolved organic matter in an urbanized estuary located in Northeastern Brazil. Submetido no *Journal Environmental Monitoring and Assessment* em 2016

3.3 Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

1. GONTIJO, E.S.J.; **MONTEIRO, A.S.C.**; WATANABE, C.H.; TONELLO, P.S.; DA SILVA, G. A.; ROESER, H.M.P.; FRIESE, K.; ROSA, A.H. Effect of humic substances and iron on the complexation of arsenic in aquatic systems. In 18th Meeting of International Humic Substances Society (IHSS), período de 11 a 16 setembro 2016, Kanazawa-Japão. (Oral)

2. **MONTEIRO, A. S. C.**; GONTIJO, E. S. J.; WATANABE, C. H.; SANTOS, F.F.; PINHEIRO, J. P.; ROSA, A. H. Speciation of Cd, Pb and Zn in Aquatic Systems by Ultrafiltration and ICP OES. In 9th Symposium for European Freshwater Sciences, período de 05 a 10 julho de 2015, Geneva - Switzerland. (Pôster)
3. **MONTEIRO, A. S. C.**; PINHEIRO, J. P.; PARAT, C.; ROSA, A. H. Especificação de metais por técnicas eletroanalíticas e ultrafiltração tangencial. In XI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, período de 19 a 23 de outubro de 2015, São Carlos-SP. (Pôster)
4. **MONTEIRO, A. S. C.**; BUENO, C.C.; GONTIJO, E.S.J.; SANTOS, F.F.; ROSA, A. H. Distribuição de Cd e Pb nas diferentes frações de ácidos fúlvicos aquáticos. In XI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, período de 19 a 23 de outubro de 2015, São Carlos-SP. (Pôster)
5. **MONTEIRO, A. S. C.**; PINHEIRO, J. P.; PARAT, C.; ROSA, A. H. Towards on-site free metal determination in natural waters using tangential ultrafiltration with electrochemical detection. In 8^o Congresso Analítico da Argentina, período de 03 a 06 de novembro de 2015, La Plata – Argentina. (Pôster)
6. **MONTEIRO, A. S. C.**; PINHEIRO, J. P.; PARAT, C.; ROSA, A. H. Análise “on-site”: uma nova abordagem para o monitoramento de espécies metálicas em ambientes aquáticos. In 2^o Congresso Internacional RESAG (Gestão da água e monitoramento ambiental), período de 09 a 11 de dezembro de 2015, Aracaju – SE. (Pôster)
7. GONTIJO, E. S. J.; WATANABE, C. H.; **MONTEIRO, A. S. C.**; TONELLO, P. S.; SILVA, G.A.; ROESER, H. M. P.; FRIESE, K.; ROSA, A. H. Análise da distribuição de metais e metaloides e o papel da matéria orgânica natural utilizando análise multivariada. In XI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, período de 19 a 23 de outubro de 2015, São Carlos-SP. (Pôster)
8. WATANABE, C.H.; GONTIJO, E.S.J.; **MONTEIRO, A.S.C.**; ROSA, A.H.; FRACÁCIO, R. Avaliação ecotoxicológica de arsênio em frações de substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares. In XI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, período de 19 a 23 de outubro de 2015, São Carlos-SP.
9. SILVA, E.V.; **MONTEIRO, A.S.C.**; SANTOS, M.S.; ALVES, J.C.; COSTA, S.S.L.; GARCIA, C.A.B.; ALVES, J.P.H.; ARAÚJO, R.G.O. Identificação das fontes emissoras de metais traço em material particulado atmosférico total e inalável de uma área urbana usando análise de componentes principais. In V Workshop de Quimiometria, período de 09 a 11 de abril de 2014, em Arembepe-Ba. (Pôster)

10. **MONTEIRO, A.S.C.**; GONTIJO, E. S. J.; WATANABE, C. H.; PINHEIRO, J.P. ROSA, A. H.; Fractionation and characterization of dissolved organic matter from Sorocabinha and Itapanhaú rivers (SP/Brasil). In: 17th Meeting of International Humic Substances Society (IHSS), período de 1 a 5 de setembro de 2014, Ioannina, Grécia. (Pôster)
11. WATANABE, C.H.; ROSA, A.H.; FRACÁCIO, R.; LIRA, V.S.; SÁ, T.R.; GONTIJO, E.S.J.; **MONTEIRO, A.S.C.**; Cobalt and aquatic humic substances: complexation assays and ecotoxicology tests with *Ceriodaphnia dubia*. In: 17th Meeting of International Humic Substances Society (IHSS), período de 1 a 5 de Setembro de 2014, Ioannina, Grécia. (Pôster)
12. GONTIJO, E.S.J.; **MONTEIRO, A.S.C.**; FERNANDES, M.L.; REIS, D.A.; DOMINGUES, M.T.; WATANABE, C.H.; TONELLO, P.S.; ROESER, H.M.P.; FRIESE, K.; ROSA, A.H.; Use of Ultrafiltration and Diffusive Gradients in Thin Films to Evaluate the Influence of the Dissolved Organic Matter in the Arsenic Speciation. In: 17th Meeting of International Humic Substances Society (IHSS), 1 a 5 setembro 2014, Ioannina, Greece. (Pôster e oral)
13. GOVEIA, D.; **MONTEIRO, A.S.C.**; JUIZ, C.O.; ROSA, A.H.; PINHEIRO, J.P.S.; Complexação de cd(II) e pb(II): interação com nanopartículas e a matéria orgânica. VII encontro de química ambiental (ENQAmb), período de 6 a 9 de outubro de 2014, Brasília (DF). (Pôster)
14. **MONTEIRO, A. S. C.**; GONTIJO, E. S. J.; WATANABE, C. H.; PINHEIRO, J. P.; ROSA, A. H. Molecular size fractionation, optical properties and characterization of dissolved organic matter. In I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental, período de 26 a 28 de novembro de 2014, Sorocaba (SP). (Pôster)
15. GONTIJO, E. S. J.; **MONTEIRO, A. S. C.**; WATANABE, C. H.; ALMEIDA DOS REIS, D., SANTOS, F. F.; DOMINGUES, M. T.; OLIVEIRA, E. G., NASCIMENTO, L. P.; TONELLO, P. S.; ROESER, H. M. P.; ROSA, A. H. Study of the effects of natural organic matter on aluminium, arsenic and iron speciation. In I Simpósio em Tecnologia, Inovação e sustentabilidade Ambiental, período de 26 a 28 de novembro de 2014, Sorocaba (SP). (Pôster)
16. SOUZA, S.O.S.; **MONTEIRO, A.S.C.**; ÁVILA, D.V.L.; CORREIA, F.O.; GARCIA, C.A.B.; ALVES, J.P.H.; ARAÚJO, R.G.O. Otimização de método analítico para a determinação simultânea de Tório e Urânio em fertilizantes minerais por ICP OES. In 17^o Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), período de 06 a 09 de outubro de 2013, Belo Horizonte, MG. (Pôster)

Trabalhos premiados

1. WATANABE, C.H.; **MONTEIRO, A.S.C.**; GONTIJO, E. S. J.; ROSA, A.H.; LIRA, V.S.; BUENO, C.C.; KUMAR, N.T.; FRACÁCIO, R.; ROSA, A.H. Eco-toxicological assessment of arsenic and cobalt in fractions of aquatic humic substances of different molecular sizes. Este trabalho recebeu o prêmio de Travel Award como um dos melhores trabalhos apresentado na forma oral e pôster no 18th International Conference of International Humic Substances Society (IHSS) realizado no período de 11 a 16 de setembro de 2011, Kanazawa-Japão.
2. BUENO, C.C.; GONTIJO, E.S.J.; **MONTEIRO, A.S.C.**; DOMINGUES, M.T.; RANGEL, E.C.; ROSA, A.H.; Arsenic and cadmium removal efficiency by magnetic Zea mays husk biochar. In **I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental**, realizado no período de 26 a 28 de novembro de 2014, em Sorocaba-SP. Este trabalho recebeu Menção Honrosa por ter sido classificado entre os três apresentados na forma oral.

4 Participação em eventos

1. 8º Congresso Analítico da Argentina, período de 03 a 06 de novembro de 2015, La Plata – Argentina. (congresso)
2. Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, período de 19 a 23 de outubro de 2015, São Carlos-SP. (congresso)
3. Workshop in Environmental Nanotechnology. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PGCA), UNESP campus Sorocaba, período de 24 - 25 de junho de 2015. (outra)
4. I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental, realizado nos dias 26, 27 e 28 de novembro de 2014, em Sorocaba-SP. (congresso)
5. 17th Meeting of International Humic Substances Society (IHSS), período de 1 a 5 de Setembro de 2014, Ioannina, Grécia. (congresso)

5. Formação e atividade complementar

1. Palestra “Especiação de Metais em Ambientes Aquáticos” ministrada durante a Disciplina de Poluição Ambiental ofertada pelo curso de Engenharia Ambiental da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Sorocaba /SP, em 06 de maio de 2015, às 08:15h, com duração de 2 (duas) horas/aula.
2. Participação no Curso de Química Forense oferecido pela Renova Cursos e Eventos, Ribeirão Preto, 12 de abril de 2015, com carga horária de 9 horas.

3. Participação em minicurso: Methods to investigate the nanoparticles in environmental. Workshop in Environmental Nanotechnology. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PGCA), UNESP – campus Sorocaba, 24 de junho 2015, com carga horária de 3 horas.
4. Participação no Workshop in Environmental Nanotechnology. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PGCA), UNESP campus Sorocaba, período de 24 - 25 de junho de 2015.
5. Participação em minicurso: SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: UM NOVO OLHAR, que fez parte da programação do XI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, entre os dias 20 e 21 de outubro de 2015, com carga horária de 4 horas.
6. Participação em minicurso: Avances tecnológicos e técnicas cromatográficas y em detección elemental mediante fluorescência de rayos X. 8º Congresso Analítico da Argentina, 04 de novembro de 2015, La Plata - Argentina.
7. Participação no treinamento de Configuração e Instalação do equipamento VA Stand 663 e IME 663. (Carga horária: 16h). Universidade Federal de Alagoas – Arapiraca / AL, no período de 13 e 14 de janeiro de 2015.
8. Participação em minicurso: Técnicas de Análises Inorgânicas por via úmida – Uma abordagem ambiental. I Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental, realizado nos dias 26, 27 e 28 de novembro de 2014, em Sorocaba-SP.
9. Participação no treinamento de Configuração e Instalação do equipamento VA Stand 663 e IME 663. (Carga horária: 16h). Universidade Federal de Alagoas - Arapiraca/ AL, no período de 13 e 14 de janeiro de 2015.

1. Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Participação em banca de Mayra Luna Favero. Análise da germinação e do crescimento da *Crotalaria Juncea* em solo degradado incorporado em rejeitos da mineração de fosfato. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àquela que me amou com minhas imperfeições, medo e inseguranças.

Mãe dedico a senhora (In Memoriam) porque mesmo não estando mais aqui, ainda é a minha motivação, exemplo de mulher guerreira, mãe e amiga. Sonhamos e esperamos juntas por esse momento, faltando tão pouco Deus te colheu do meu jardim e sei que a senhora é a flor mais linda e graciosa do céu, um dia nos reencontraremos e agradecerei, por todo amor, paciência, pelo colo sempre que voltava pra casa e principalmente por sempre acreditar e lutar por mim quando já não me achava capaz. Você faz muita falta, pois sempre foi meu porto seguro, te amo hoje muito mais que ontem! Nunca te esquecerei...

Amo você!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente, por ser meu refúgio, minha esperança e perseverança, pela saúde e por ter tornado tudo possível. Meu Deus eu creio, adoro e espero sempre em Ti.

A minha mãe Josefa Júlia (in memoriam), meu pai Antonio Paz (meu maior incentivador) e minha irmã Adnycleive que são e sempre serão minha inspiração para vencer. O amor e a confiança que sentem por mim, me fazem vencer todos os obstáculos. Amo muito vocês, vocês são tudo pra mim.

Ao meu esposo Denyson, por estar sempre ao meu lado e por não me deixar desistir, por sempre apoiar meus sonhos, por compartilhar os momentos difíceis, por isso, digo que se amor é decisão eu decidi amar Você. Te amo!

À minha bisavó Maria pequena que sempre me apoiou desde o primeiro dia em que decidi viver esse sonho, sendo meu anjo protetor, sempre com palavras de motivação e amor.

Aos meus familiares, tios, tias, primos, avós, amigos de Carira e Aracaju por acreditar, incentivar e sempre me oferecerem palavras de conforto. Principalmente pelo apoio no período de enfermidade e falecimento de minha mãe.

Ao meu orientador Dr. André Henrique Rosa por ter me acolhido em seu laboratório, obrigada pelos ensinamentos, confiança e por todas as oportunidades.

Ao Dr. Paulo Pinheiro por ter sido além de um co-orientador, um professor amigo, muito paciente e sempre prestativo, obrigada pelo conhecimento compartilhado. Muito obrigada por tudo!

À Cláudia Watanabe que desde que cheguei em Sorocaba foi uma amiga-companheira de todos os momentos, sempre disposta a ajudar, ensinar e por ter uma excelente qualidade: a de saber ouvir! Obrigada por todas as vezes que me ouviu e me aconselhou.

A Erik Sartori por todo suporte experimental, construção dos mapas, discussões de resultados e parceria nos artigos, além da ajuda de sempre.

A Carol Bueno amiga de uma espiritualidade enorme agradeço por sempre me ensinar a observar o lado bom das situações. Obrigada pela amizade e conselhos.

Aos demais amigos do laboratório (Ignácio Montero, Ely e Minéia) pela amizade, momentos compartilhados e pela ajuda de sempre. Aos amigos da UNESP Araraquara principalmente Ariane e Felipe por me acolherem tão bem e serem solícitos sempre que eu preciso. Aos amigos anjos Rennan Geovanny e Wander Botero pela disponibilidade de sempre.

Aos queridos Sr. Oswaldo e Sra. Lídia pelos 3 anos que me receberam em sua casa, pelo carinho, atenção, orações e ensinamentos. Às meninas que passaram pela pensão (Andréia, Nat, Elaine, Carol) que fizeram minha estadia muito mais alegre.

À toda equipe de profissionais da UNESP- Sorocaba, principalmente a Letícia e Suzan pela disponibilidade e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida (processo 2013/14122-0) e apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Os estudos de especiação em águas naturais são a chave para a compreensão do comportamento e destino dos íons metálicos no ambiente, uma vez que estes elementos podem ser encontrados em diversas formas químicas (livres ou complexados). A mobilidade, biodisponibilidade e transporte desses íons podem ser influenciados pela presença da matéria orgânica natural (MON) e as substâncias húmicas aquáticas (SHA), principais ligantes presente no ambiente aquático. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver métodos eletroanalíticos utilizando a cronopotenciometria de redissolução anódica (SCP) e a técnica de redissolução nernstiana na ausência de gradientes (AGNES) capazes de determinar a concentração de cádmio total (CdT) e livre (CdL), respectivamente, diretamente em amostras de águas dos rios Itapanhaú (RI) e Sorocabinha (RS) localizados no estado de São Paulo, que possibilitem uma futura aplicação on-site. E avaliar a influência da MON e SHA extraídas desses rios nas interações com o Cd(II) e/ou Pb(II). Para investigar o efeito da sazonalidade foram coletadas amostras de água no março e novembro de 2014, as quais foram caracterizadas através de parâmetros de qualidade da água, carbono orgânico dissolvido (COD), espectroscopia UV/Vis e concentrações de metal total, dissolvido e “livre” (ultrafiltrado em 1kDa com fluxo tangencial - UFT). As SHA e suas frações (ácido húmico (AH) e fúlvico (AF) foram caracterizadas por meio da análise elementar, RMN ¹³C e fracionadas através da UFT com membranas de 100, 30,10, 3 e 1 kDa. Os métodos desenvolvidos de SCP (determinação do CdT) e de AGNES (determinação do CdL) aplicados nas amostras de águas *in natura* e ultrafiltradas em 1kDa, foram validados por comparação com a espectroscopia de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF-AAS). Os resultados encontrados revelaram que as principais diferenças entre as águas dos RI e RS estão associadas possivelmente à maior influência da água do mar e da sazonalidade no RS. A composição estrutural das SHA e AF apresentou maior predominância de compostos alifáticos. A distribuição do COD após o fracionamento molecular mostrou que as frações predominantes nas SHA e AF estiveram entre 10 e 1 kDa, enquanto que para os AH, 50% do COD é maior que 100kDa. Os resultados de SCP (LD de $1,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹) e AGNES (LD de $1,9 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹) revelaram o seu potencial na quantificação do Cd(II) total e livre, respectivamente, nas amostras estudadas. Os estudos da interação de Cd(II) e Pb(II) com os AF e AH revelaram que ambos os materiais dos RI e RS apresentaram maior complexação com Pb(II), e a complexação aumenta com o aumento do pH.

Palavras-chave: Ácidos fúlvicos. Ácidos húmicos. SCP. AGNES.

ABSTRACT

The study of speciation in natural waters are crucial to understand the behaviour and fate of metal ions in the environment, since these elements can be found in different chemical forms (complexed or free). The mobility, bioavailability and transport of these ions can be influenced by natural organic matter (NOM) and aquatic humic substances (AHS), which are the main ligands in aquatic environments. The objective of this thesis was to develop electroanalytical methods using the techniques stripping chronopotentiometry (SCP) and absence of gradients and nernstian stripping (AGNES), which are able to determine the concentration of total (TCd) and free (FCd) cadmium directly in water samples from the rivers Itapanhaú (RI) and Sorocabinha (RS), located in the state of São Paulo. It would make possible a future *on-site* measurement applications. This study also aimed to evaluate the influence of NOM and AHS extracted from these rivers in the interactions with Cd(II) and Pb(II). Water samples were taken in march and november/2014 in order to investigate the effect of seasonality. These samples were characterised using water quality parameters, dissolved organic carbon (DOC), UV/VIS spectroscopy and concentrations of total, dissolved and free metal (ultrafiltered through 1 kDa membrane with tangential flow- TUF). AHS and their fractions (humic, HA, and fluvic acid, FA) were characterised by elemental analysis, NMR ¹³C. They were fractionated through TUF through membranes 100, 30, 10, 3 and 1 kDa. The methods developed of SCP (TCd determination) and AGNES (CdL determination) applied in the *in natura* and ultrafiltered (1 kDa) samples were validated using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The results showed that the main differences between the waters from RI and RS are related probably to the influence of seawater and seasonality. The structural composition of AHS and FA presented higher content of aliphatic compounds. The distribution of DOC after size fractionation showed that the predominant fractions in the AHS and FA were between 10 and 1 kDa. On the other hand, 50% of the material was higher than 100 kDa in the HA. The results of SCP (LoD: 1.6×10^{-9} mol L⁻¹) and AGNES (LoD: 1.9×10^{-9} mol L⁻¹) revealed their potential in quantification of total and free Cd(II), respectively, in the samples analysed. The study of interactions of Cd(II) and Pb(II) with FA and HA showed that both materials from RI and RS presented higher complexation with Pb(II). The complexation increases with the pH for both materials.

Keywords: fluvic acids, humic acids, SCP, AGNES.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Exemplo de curva de SSCP na (•) ausência do ligante, M, e (Δ) na presença do ligante, M+L, indicando a variação do potencial de deposição, $E_{d,1/2}$ e tempo limite, τ43
- Figura 2-** Mapa do Estado de São Paulo indicando a localização dos pontos de amostragem os rios Sorocabinha e Itapanhaú.51
- Figura 3-** Pontos de amostragem (a) rio Itapanhaú e (b) rio Sorocabinha.....52
- Figura 4-** Sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial utilizado para obtenção da fração dos metais livres (M).55
- Figura 5-** Ilustração da extração das substâncias húmicas das águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú.58
- Figura 6-** Procedimento de extração e purificação dos ácidos fúlvicos e húmicos presentes nas substâncias húmicas aquáticas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú. ..59
- Figura 7-** Esquema do fracionamento molecular dos extratos de SHA, AF e AH dos rios Itapanhaú e Sorocabinha.....62
- Figura 8-** Sistema utilizado para a realização dos experimentos eletroquímicos.62
- Figura 9-** Exemplo do eletrodo de trabalho impressos/serigrafados (screen-printed) de carbono utilizado neste trabalho.....64
- Figura 10-** Pré-tratamento eletroquímico do eletrodo impresso de carbono.....64
- Figura 11-** Resultado do teste cinético para obtenção do tempo de equilíbrio representativo dos experimentos realizados com as amostras de SHA, AF e AH (100 mg L^{-1}) nas condições de pH e força iônica natural das águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú.68
- Figura 12-** Curva de temperatura de pirólise (curva à esquerda) e de atomização (curva à direita) para solução aquosa de $\text{Cd(II)} 4,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ 70
- Figura 13-** Descrição da metodologia de especiação de Cd(II) em águas naturais por AGNES, UF-SCP e UF-GF-AAS proposta por este trabalho.....71
- Figura 14-** Definição operacional das frações do metal total, dissolvido e livre.....78
- Figura 15-** Dendograma: cálculo da distancia Euclidiana e método de ligação Ward's para as variáveis: metal total, metal dissolvido e metal livre em águas coletadas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú, Estado de São Paulo.79

Figura 16- Dendograma: calculo da distancia Euclidiana e método de ligação Ward's para as amostras de água em relação aos meses de março (período chuvoso) e novembro (período seco) de 2014 coletadas nos rios Sorocabinha e Itapanhaú, Estado de São Paulo.....	80
Figura 17- Distribuição dos íons metálicos nas frações livres, complexada e particulada encontrados no rio Sorocabinha no período chuvoso e seco.	84
Figura 18- Distribuição dos íons metálicos nas frações livre, complexada e particulada encontrados no rio Itapanhaú no período chuvoso e seco.	85
Figura 19- Espectros de RMN para as amostras de SHA e AF dos rios Itapanhaú e Sorocabinha nos períodos estudados.	88
Figura 20- Distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Itapanhaú na coleta 2 comparando-as com a amostra in natura (novembro/2014).	92
Figura 21- Distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Sorocabinha na coleta 2 comparando-as com a amostra in natura (novembro/2014).	93
Figura 22- Comparação da distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Sorocabinha e Itapanhaú (novembro/2014).	94
Figura 23- Distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Itapanhaú (a) e Sorocabinha (b) da coleta 2 (novembro/2014).	95
Figura 24- Distribuição dos metais Zn, Cu, Fe, Al presentes originalmente nas frações do COD das amostras de AF e AH dos rios Sorocabinha (a e b) e Itapanhaú (c e d) extraídos da coleta 2.	96
Figura 25- Comparação do metal total adicionado com os resultados de metal das amostras ultrafiltradas medidas por SCP e com o metal livre medido diretamente por AGNES nas amostras do rio Itapanhaú (a) e Sorocabinha (b).	102
Figura 26- Curvas de $Kx C_{M,T}$ (obtidas por meio da AGNES) para o ácido fúlvico do rio Itapanhaú período chuvoso (AF RI-02), comparando as diferenças de complexação do Cd(II) (pH 7) e Pb(II) (pH 6,5) e força iônica $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	106

Figura 27- Comparação das curvas de $Kx C_{M,T}$ (obtidas por meio da AGNES) para o AF e AH do rio Itapanhaú período chuvoso, experimentos realizados com Cd(II) em pH 7 (a) e Pb(II) em pH 6,5 (b), força iônica 0,01mol L ⁻¹	107
Figura 28- Influência do pH na complexação do Cd(II) (pH 6, 7 e 8) (a), e do Pb(II) em pH (5, 5,5 e 6,5 (b), com o AF do rio Itapanhaú.	108
Figura 29- Influência da origem do material extraído na complexação do Cd AF RS e AF RI-02 (pH 6, 7 e 8) (a), e do Pb AF RS-02 e AF RI-02 em pH (5, 5,5 e 6,5) (b).109	109
Figura 30- Influência da sazonalidade na complexação do Cd e AF RI (pH 6, 7 e 8) (a) e do Pb AF RI em pH (5, 5,5 e 6,5) (b), para os períodos chuvoso (01) e seco (02).....	110
Figura 31- Curvas de SSCP experimental e teórica para o Cd (a) e Pb (b) com a SHA extraída do rio Sorocabinha a pH 6.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de constantes de velocidade de perda da molécula de água da esfera interna de coordenação para o Al, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn.	37
Tabela 2- Características e condições operacionais utilizadas no ICP OES com vista axial para a análise multielementar de Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn nas amostras após digestão ácida.	56
Tabela 3- Valores dos limites de detecção e de quantificação para os metais Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn analisados por ICP OES.	57
Tabela 4- Informações sobre a concentração dos ligantes utilizados nos experimentos de e AGNES em função do pH.	73
Tabela 5- Parâmetros eletroquímicos utilizados nos experimentos para Cd(II) e Pb(II).	73
Tabela 6- Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras coletadas no rio Itapanhaú e Sorocabinha em dois períodos de amostragem no ano de 2014.	74
Tabela 7- Comparação das médias de carbono orgânico dissolvido encontradas neste trabalho com outros rios nacionais e internacionais.	76
Tabela 8- Resultados de MT, MD, MP, ML, MC, determinados nas águas do rio Sorocabinha coletadas na coleta 1 (março/2014) e coleta 2 (novembro/2014).	81
Tabela 9- Resultados de MT, MD, MP, ML, MC, determinados nas águas do rio Itapanhaú coletadas no período chuvoso (março/2014) e no período seco (novembro/2014).	82
Tabela 10- Resultados da composição elementar livre de cinzas das SHA e AF extraídos das amostras de água coletadas nos rios Itapanhaú (SHA RI) e (AF RI) e Sorocabinha (SHA RS) e (AF RS) nos dois períodos estudados.	87
Tabela 11- Valores de porcentagens relativas de diferentes grupos de carbono presentes nas amostras de SHA e ácidos fúlvicos extraídos dos rios Itapanhaú (SHA RI) e (AF RI) e Sorocabinha (SHA RS) e (AF RS) em março/2014 em novembro/2014.	87
Tabela 12- Resultados das distribuições do COD (%massa) das amostras extraídas dos rios Itapanhaú (SHA, AF, AH RI) e Sorocabinha (SHA, AF, AH RI) em março (01) e novembro (02) /2014.	91

Tabela 13- Comparação dos resultados da determinação de Cd total por SCP e GF-AAS nas amostras coletadas nos rios Sorocabinha e Itapanhaú em novembro/2014.99

Tabela 14- Comparação dos resultados da determinação de Cd livre nas amostras ultrafiltradas acidificadas por SCP e GF-AAS. 100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácidos fúlvicos.
AGNES	Do inglês, <i>absence of gradients and nernstian equilibrium stripping</i> , redissolução nernstiana na ausência de gradientes.
AH	Ácidos húmicos.
ANOVA	Análise de variância.
AM	Amazonas
ASV	Do inglês <i>anodic stripping voltammetry</i> , voltametria de redissolução anódica.
Cd(II)	Espécie livre do cádmio.
CdT	Concentração de cádmio total.
CdL	Concentração de livre.
CLE – SV	Do inglês <i>competitive ligand exchange–stripping voltammetry</i> , voltametria de redissolução competitiva por troca de ligante.
COD	Carbono orgânico dissolvido.
CONAMA	Conselho nacional de meio ambiente.
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio.
DC-SV	Do inglês <i>direct current stripping voltammetry</i> , voltametria de redissolução de corrente contínua.
DGT	Do inglês <i>diffusive gradient in thin films</i> , gradiente difusivo em filmes finos.
DMT	Do inglês <i>donnan membrane technique</i> , técnica de membrana Donnan.
DP-SV	Do inglês <i>differential pulse stripping voltammetry</i> , voltametria de pulso diferencial.
DTA	Análise térmica diferencial.
EDTA	Do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , ácido etilenodiamino tetraacético
EIS	Eletrodo de íons seletivo.

FM	Fracionamento molecular.
FT	Fósforo total.
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite.
GIME-VIP	Do inglês <i>gel integrated microelectrode</i> , microeletrodo integrado a gel.
HCA	Do inglês <i>hierarchical cluster analysis</i> , análise de agrupamento hierárquico.
HMDE	Do inglês <i>hanging mercury drop electrode</i> , eletrodo de gota de mercúrio convencional.
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.
IHSS	Do inglês <i>international humic substances society</i> , sociedade internacional de substâncias húmicas.
IS	Do inglês <i>inner sphere</i> , esfera interna.
kDa	Unidade de massa atômica
M	Metal livre.
ML	Metal complexado.
LOD	Limite de detecção.
LOQ	Limite de quantificação.
MD	Metal dissolvido.
MES	Ácido 2-N- morfolinoetanosulfônico.
MFE	Do inglês <i>mercury film electrode</i> , eletrodo de filme de mercúrio.
ML	Metal complexado.
MOD	Matéria orgânica dissolvida.
MON	Matéria orgânica natural.
MOP	Matéria orgânica particulada.
MOPs	Ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico.
MP	Metal particulado.
M-SHA	Complexo metal-substância húmica aquática.
MT	Metal total.

NT	Nitrogênio total.
OD	Oxigênio dissolvido.
OS	Do inglês <i>outher sphere</i> , esfera externa.
Pb(II)	Espécie livre do chumbo.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PLM	Do inglês <i>Permeation Liquid Membrane</i> , permeação em membrana líquida.
RI	Rio Itapanhaú.
rpm	Rotação por minuto.
RMN	Ressonância magnética nuclear.
RS	Rio Sorocabinha.
SCP	Do inglês <i>stripping chronopotentiometry</i> , cronopotenciometria de redissolução anódica.
SHA	Substâncias húmicas aquáticas.
SSCP	Do inglês <i>Scanned deposition potential</i> , varredura de potencial de deposição.
SW-SV	Do inglês <i>Direct current stripping voltammetry</i> , voltametria de onda quadrada.
TG	Termogravimétrica.
UFT	Ultrafiltração em fluxo tangencial.
UV-VIS	Ultravioleta-visível.
VRA	Voltametria de redissolução anódica.

LISTA DE SÍMBOLOS

AgCl	cloreto de prata.
Ag	prata
As	arsênio.
Au	ouro
Al	alumínio
C	carbono
Cd	cádmio
Cl ⁻	cloreto.
Cr	cromo
Cu	cobre.
$C_{L,t}$	concentração total do ligante.
$C_{M,T}$	concentração do metal na solução.
C_L	concentração do ligante livre na solução.
C_{ML}	concentração do complexo na solução.
$C_{M,T}^*$	concentração do metal livre no interior da solução.
C_L^*	concentração do ligante livre no interior da solução.
$C_{M,amalg}$	concentração de íon metálico amalgamado.
C_M^*	concentração de íon metálico no interior da solução.
dt/dE	inverso do tempo e a derivada do potencial.
E	potencial.
E_d	potencial de deposição.
E^0	potencial de redução padrão do metal.

E_1	potencial de deposição aplicado ao eletrodo.
F	constante de Faraday.
Fe	ferro.
h	constante de proporcionalidade.
HCl	ácido clorídrico.
H_3PO_4	ácido fosfórico
Hg	mercúrio.
I_S	corrente de reoxidação.
I_d^*	corrente de deposição.
k_a	constante de velocidade de formação do complexo.
k_d	constante de velocidade de dissociação do complexo.
K	constante de estabilidade.
K_a^{os}	constante de formação para o complexo de esfera externa.
K_d^{os}	constante de dissociação para o complexo de esfera externa.
K_a^{is} e K_d^{is}	constantes de velocidade para a substituição da molécula de H_2O por L^- no complexo da esfera interna.
k_w	constante de velocidade de perda da molécula de água da esfera interna.
m	inclinação (slope) da curva de calibração.
n	número de elétrons envolvidos no processo de redução/oxidação.
Mn	manganês.
Ni	níquel.
Pb	chumbo.
Pt	platina.
Q_{Hg}	carga associada com o Hg depositado.

R	constante dos gases.
S_y	desvio padrão dos ruídos.
τ	tempo de transição.
t	tempo.
T	temperatura.
t_d	tempo de deposição
U^{os}	energia da interação eletrostática adimensional.
v	taxa de varrimento/ varredura.
Y	ganho ou fator de pré-concentração.
α	constante de proporcionalidade.
Zn	zinco.
x	metal ausente na fração.
<	os valores após os símbolos correspondem aos valores do limite de detecção obtidos por ICP OES.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
2. REVISÃO DA LITERATURA	32
2.1. Matéria orgânica natural, substâncias húmicas e sua interação com espécies metálicas	32
2.2. Descrição da complexação de metais traço com ligantes em sistemas aquáticos	34
2.2.1. Mecanismo de Eigen	36
2.3. Técnicas analíticas para análise de especiação	38
2.3.1. Técnicas eletroanalíticas de redissolução	39
2.3.1.1. Cronopotenciometria de redissolução (SCP)	39
2.3.1.2. Técnica de redissolução nernstiana na ausência de gradientes (AGNES).....	43
2.4. Ultrafiltração em fluxo tangencial (UFT)	45
2.5. Cádmio e chumbo no ambiente	46
2.5.1. Cádmio	47
2.5.2. Chumbo	47
3. OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo geral.....	49
3.2. Objetivos específicos	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1. Área de estudo e amostragem.....	51
4.2. Caracterização das águas <i>in natura</i> dos rios	53
4.2.1. Qualidade da Água	53
4.2.2. Determinação do carbono orgânico dissolvido (COD)	53
4.2.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	54
4.2.4. Determinação das frações do metal total, dissolvido e livre presentes originalmente nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú.....	54
4.2.5. Análise exploratória dos dados	57
4.3. Extração das substâncias húmicas aquáticas presentes nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú	57
4.3.1. Extração e purificação das frações (ácidos húmicos e fúlvicos) presentes no extrato das substâncias húmicas aquáticas	59
4.4. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas e suas frações	60

4.4.1. Composição Elementar.....	60
4.4.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ¹³ C)	60
4.4.3. Análise Térmica	61
4.5. Fracionamento molecular das substâncias húmicas aquáticas e suas frações	61
4.6. Experimentos Eletroquímicos	62
4.6.1. Produção do eletrodo de trabalho.....	63
4.6.2. Desenvolvimento da metodologia eletroanalítica utilizando as técnicas SCP e AGNES para determinação de cádmio total e livre nas amostras de água dos rios Itapanhaú e Sorocabinha, que possibilite uma futura aplicação on-site.....	65
4.6.2.1. Experimentos de cronopotenciometria de redissolução (SCP) em meio ácido (metal total nas amostras <i>in natura</i> e ultrafiltradas acidificadas)	66
4.6.2.2. Experimentos de AGNES: determinação do Cd(II) livre nas amostras <i>in natura</i>	66
4.6.2.3. Experimentos de ultrafiltração com membranas de 1kDa para a validação da metodologia proposta	67
4.6.2.4. Determinação do Cd(II) por GF-AAS	69
4.6.3. Estudo das interações do Cd(II) e Pb(II) com os ácidos fúlvicos e húmicos utilizando AGNES.....	72
4.7. Descarte de resíduos.....	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1. Caracterização das amostras de águas “<i>in natura</i>” dos rios Sorocabinha e Itapanhaú	74
5.2. Influência da matéria orgânica natural na especiação dos metais originalmente presentes nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú	77
5.3. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas e suas frações.....	86
5.4. Fracionamento molecular das substâncias húmicas aquáticas e suas frações	90
5.5. Desenvolvimento da metodologia eletroanalítica utilizando as técnicas SCP e AGNES para determinação de cádmio total e livre nas amostras de água dos rios Itapanhaú e Sorocabinha, que possibilite uma futura aplicação on-site	97
5.5.1. Determinação de cádmio total na amostra <i>in natura</i> por SCP	97
5.5.2. Determinação de cádmio total nas amostras ultrafiltradas (<1 kDa).....	99
5.5.3. Determinação de cádmio livre na amostra <i>in natura</i> por AGNES	101

5.6. Estudo das interações do Cd(II) e Pb(II) com os ácidos fúlvicos e húmicos purificados dos rios Itapanhaú e Sorocabinha em diferentes estações utilizando AGNES.....	104
6. CONCLUSÃO.....	112
7. TRABALHOS FUTUROS	114
REFERÊNCIAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

A crescente industrialização e expansão demográfica têm, inevitavelmente, introduzido poluentes no ambiente, ocasionando, por exemplo, a degradação dos recursos hídricos (KAUSHIK et al., 2009; OTERO et al., 2015). Um dos poluentes mais comuns encontrados em ambientes aquáticos são os metais traço (DANG, et al., 2015). O termo “metais traço” tem sido utilizado para definir elementos químicos que em baixas concentrações no ambiente podem vir a constituir uma fonte potencial para a poluição ambiental (MARTINS et al., 2011). Os metais traço desempenham um papel muito importante no ambiente, pois em sua maioria são essenciais à vida em concentrações moderadas e tóxicos em concentrações elevadas.

Sendo assim, a importância do estudo desses metais nos ambientes aquáticos está relacionada aos riscos de contaminação dentro da cadeia trófica, visto que os organismos aquáticos tendem a acumular metais em seus tecidos, mesmo quando a água possui níveis desses compostos abaixo da concentração máxima tolerada pelas legislações vigentes, como por exemplo, a resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). E geralmente são considerados persistentes, bioacumulativos e não degradáveis.

Os metais traço podem ser encontrados no ambiente aquático em uma variedade de formas (livres (M) ou complexados (ML)). Na coluna d'água, os íons metálicos podem estar associados ao material particulado (partículas orgânicas ou inorgânicas em suspensão, adsorvido ou assimilado por organismos vivos) e à fração dissolvida na forma de íons livres hidratados e complexados a ligantes orgânicos (macromoléculas ou ligantes coloidais, por exemplo, aminoácidos, carboidratos, substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos)) e inorgânicos (HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- , OH^-) (BUFFLE, 1988).

Os íons metálicos livres e/ou ligados fracamente aos compostos orgânicos e/ou inorgânicos presentes na fração dissolvida tem uma biodisponibilidade superior do que os presentes no material particulado e formando complexos estáveis, e, portanto, apresentam uma maior toxicidade (MONTEIRO, et al., 2016). E em função da forma química como ele está presente nessa fração, das quais nem todas são igualmente tóxicas, tem-se uma maior ou menor absorção por parte da biota (TEMPLETON et al., 2000).

O conhecimento convencional, em estudos toxicológicos é de que as espécies que controlam a biodisponibilidade do metal traço são os cátions livres hidratados (MOREL;HERING, 1993; TORO et al., 2001), porém, devido às águas naturais apresentarem uma multiplicidade de ligantes capazes de fazer ligações com íons metálicos, apenas uma pequena parte do metal total dissolvido existe como cátions livres hidratados (BUFFLE, 1988).

Nesse contexto, podemos concluir que a biodisponibilidade dessas espécies metálicas é influenciada pela sua forma encontrada na natureza e não só pela sua concentração total (JAMALIA, et al., 2009; MOREL;HERING, 1993). E assim surge o interesse nos estudos em especiação química de metais traço.

Especiação química, de acordo com a união internacional de química pura e aplicada (IUPAC do inglês, *international union of pure and applied chemistry*), consiste na distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema. Em outras palavras, é a distribuição das diferentes espécies de um dado elemento químico numa amostra, considerando as espécies complexadas e não complexadas e a distinção entre os diferentes estados de oxidação. A análise de especiação é descrita como procedimentos analíticos de identificação e/ou medida quantitativa de uma ou mais espécies químicas presentes em uma amostra.

A análise de especiação de metais traço em águas naturais é complicada, uma vez que a tese de um sistema natural em equilíbrio químico não é normalmente válida no meio ambiente, pois cada uma das espécies metálicas pode se comportar de maneira diferente em termos de mobilidade e reatividade, estando ainda sujeitas às mudanças de condições da matriz (temperatura, pH e força iônica). Por outro lado assumir que apenas o íon metálico livre é tóxico traduz uma simplificação enorme de um sistema muito complexo.

Sendo assim, os modelos e experimentos de especiação química de metais traço com diferentes superfícies/agentes complexantes em águas naturais são a chave para a compreensão da biodisponibilidade, transporte e mobilidade dos metais traço no ambiente. Para responder a este desafio têm sido desenvolvidas plataformas de modelos de especiação termodinâmica (por exemplo, Visual Minteq (GUSTAFSSON, 2006), ECOSAT (KEIZER; VAN RIEMSDIJK, 1995) e/ou ORCHESTRA (MEEUSSEN, 2003) além de técnicas e métodos analíticos capazes de medir a concentração de íons metálicos livres e de realizar estudos de especiação dinâmica aos níveis de concentrações de metais traço em águas

naturais (TOWN; VAN LEEWEN, 2001; TOWN; VAN LEEUWEN 2003), uma vez que as quantidades de metais traço presentes em águas naturais são difíceis de medir e determinar, os cátions livres é ainda mais desafiador, visto que a sua concentração muitas vezes é encontrada no intervalo inferior ou igual a nanomolar (MONTEIRO et al., 2016).

Frente ao exposto, este trabalho apresenta o desenvolvimento de métodos usando técnicas eletroanalíticas, como a cronopotenciometria de redissolução anódica (SCP) e a técnica de redissolução nernstiana na ausência de gradientes (AGNES) em conjunto com a ultrafiltração em fluxo tangencial (UFT) com posterior detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF-AAS) para a determinação da concentração do cádmio total e livre em amostras de águas naturais dos rios Itapanhaú (RI) e Sorocabinha (RS), testando a viabilidade do método proposto para futuras aplicações *on-site*. Além disso, nesse trabalho também foi avaliado às interações de Pb(II) e Cd(II) (determinados usando AGNES) com os ácidos fúlvicos e húmicos extraídos a partir das águas naturais destes dois rios RS e RI de características diferentes e em duas estações do ano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Matéria orgânica natural, substâncias húmicas e sua interação com espécies metálicas

A matéria orgânica natural (MON) consiste em toda matéria orgânica presente nos ecossistemas naturais, diferindo da matéria orgânica viva e dos compostos de origem antropogênica. Encontrada em águas naturais, é constituída de uma mistura complexa de vários compostos, sendo que, a sua maior parte (~80%) ainda possuem estrutura química indefinida (BUFFLE, 1988) com tempo de permanência mais longo no ambiente e relativamente resistente à degradação. Os outros 20% da MON correspondem aos compostos com estrutura química definida, tais como carboidratos e aminoácidos (ROSA et al., 2004). A composição desta mistura pode estar relacionada à sua origem.

Quanto a sua distribuição no ambiente aquático, pode ser encontrada como matéria orgânica dissolvida (MOD) ou como matéria orgânica particulada (MOP). A MOD ou carbono orgânico dissolvido (COD) é definida operacionalmente como a fração que atravessa uma membrana de porosidade 0,45 μm e geralmente constitui a maior parte da matéria orgânica presente em água de rios. Por sua vez, a MOP é aquela que fica retida na membrana de 0,45 μm (THURMAN, 1981).

Estima-se que cerca de 50% do COD em águas superficiais consiste de matéria orgânica refratária do tipo substâncias húmicas aquáticas (SHA). SHA são definidas como macro-moléculas complexas, constituídas de diferentes estruturas aromáticas e alifáticas, ricas em grupos funcionais, contendo oxigênio, como por exemplo, ácidos orgânicos polares. As SHA são de ocorrência natural (biogênicas), heterogêneas, apresentam coloração escura, com diferentes massas molares e tamanhos provenientes da composição de resíduos animais e vegetais bem como, pela atividade de síntese de microrganismos (ROCHA; ROSA, 2003).

Estas substâncias são transportadas para as águas naturais (rios, lagos e oceanos) por meio de processos de lixiviação e/ou erosão dos solos, sendo estas de origem alóctone, como também podem ser produzidas diretamente no meio aquático por decomposição de constituintes celulares de organismos aquáticos nativos, sendo estas de origem autóctone (ROMÃO et al., 2003).

As substâncias húmicas aquáticas (SHA) podem ser extraídas utilizando diferentes metodologias. A extração das SHA é operacional, podendo-se ainda, dependendo do estudo, realizar o fracionamento das SHA para a obtenção de frações com propriedades físico-químicas similares em função do pH, por exemplo, em humina (insolúvel), ácidos fúlvicos (fração solúvel) e ácidos húmicos (solúvel em meio alcalino e insolúvel em pH menor que 2) (ROCHA; ROSA, 2003; ROSA et al., 2005).

As SHA foram extraídas, pela primeira vez, de uma fonte na Suécia, por Berzelius (1806). Já a denominação “ácido fúlvico” foi introduzida por Oden (1919), em um trabalho sobre a origem da cor nas águas naturais (STEVENSON, 1994). Além disso, as SHA podem ser classificadas como substâncias de coloração escura, de natureza heterogênea, estrutura complexa e indefinida (STEVENSON, 1994; ABATE; MASINI, 2002).

Desde que foi isolada a primeira amostra de substâncias húmicas, é comum aparecerem grandes interrogações sobre sua gênese, sua estrutura química e sua representatividade. Estas questões estão intimamente ligadas não só à complexidade própria das substâncias húmicas, mas também à variabilidade resultante das diferentes origens e distintas técnicas de extração e purificação. A criação e estabelecimento de uma estrutura molecular para as substâncias húmicas é tema controverso.

Um novo modelo para as SHA foi proposto por Piccolo (2007) no qual estas substâncias são descritas como associações supramoleculares de moléculas heterogêneas relativamente pequenas, associadas por interações mais fracas como as de Van der Waals, $\pi - \pi$, CH- π e pontes de hidrogênio e não por ligações covalentes. Segundo o mesmo autor, os ácidos húmicos (AH) são originados, principalmente, pela associação de compostos hidrofóbicos, que são estáveis em pH neutro devido às forças dispersivas hidrofóbicas (Van der Waals, $\pi - \pi$, CH- π). Com a diminuição do pH, ocorre aumento progressivo da estrutura molecular dos AH, através das interações por pontes de hidrogênio, até ocorrer sua floculação em baixos valores de pH. Já os ácidos fúlvicos (AF), são originados, principalmente, pela associação de pequenas moléculas hidrofílicas que apresentam grupos funcionais ácidos, os quais mantêm seus constituintes solúveis em qualquer faixa de pH.

As SHA representam a principal classe de complexantes naturais e devido à complexidade da MON, os estudos de complexação com íons metálicos têm sido conduzidos especialmente com as SHA, por estas serem capazes de alterar sua mobilidade, biodisponibilidade e consequente toxicidade (ROCHA; ROSA, 2003, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; TONELLO et al., 2007; ELBISHLAWI; JAFFE, 2015).

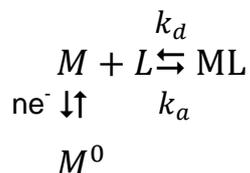
Essa afinidade das SHA por metais traço se deve ao fato dessas substâncias serem constituídas por diversos sítios ionizáveis provenientes de grupos químicos como fenólicos e ácidos carboxílicos, os quais são considerados os principais sítios de complexação nos ácidos húmicos e fúlvicos. Vale a pena ressaltar que o comportamento da MON/SHA com os metais traço depende da estabilidade do complexo formado, quando são complexos de ligações fortes, por exemplo, não exerce nenhuma toxicidade. Essa estabilidade, depende do número de átomos que formam a ligação com o metal, a natureza e a concentração do íon metálico, concentração da MON, pH e tempo de complexação (ROCHA; ROSA, 2003).

Considerando o amplo conjunto de fatores (pH, força iônica, temperatura, tipo e concentração de ligantes, potencial redox, etc) que exercem influência sobre a matéria orgânica natural e as SHA e o quão complexa e variável pode ser sua composição, o entendimento dos mecanismos pelos quais estas interferem nos ciclos e destinos finais dos poluentes tem sido foco de diversos estudos em ambientes aquáticos (ROCHA; ROSA., 2003; 2004; OLIVEIRA et al., 2006; ELBISHLAWI; JAFFE, 2015; MONTEIRO et al., 2016).

2.2. Descrição da complexação de metais traço com ligantes em sistemas aquáticos

Como descrito anteriormente, o íon metálico pode formar ligações com diversos tipos de ligantes, conhecer a natureza de sua complexação em solução, com especial atenção à cinética das reações é interessante para um maior entendimento do seu comportamento e distribuição na coluna d'água.

Considerando que um íon metálico M pode: (i) se associar reversivelmente com um ligante L para formar um complexo ML eletroativo e (ii) ser reduzido a M^0 , em um eletrodo, teremos o seguinte esquema:



onde k_a e k_d são as constantes de velocidade de formação e dissociação do complexo, respectivamente, e as cargas das espécies foram omitidas para simplificar. O equilíbrio termodinâmico em solução entre o metal e o ligante é descrito pela constante de estabilidade, K:

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{c_{ML}}{c_M c_L} \quad \text{Equação 1}$$

Em matrizes ambientais, é comum considerar a situação de excesso de ligante, isto é, a condição em que a concentração total de ligante é muito superior à concentração total do metal (BUFFLE, 1988). Isso decorre do fato, de que as soluções/amostras de interesse, geralmente apresentam concentrações de metais a nível traço. A aproximação será que $c_{L,T} \gg c_{M,T}$ levando à $c_L \gg c_{ML}$ logo $c_L \approx c_{L,T}$ tanto no volume da solução ou na superfície do eletrodo. Neste caso, podemos considerar a concentração do ligante constante e definir uma nova constante de ligação como:

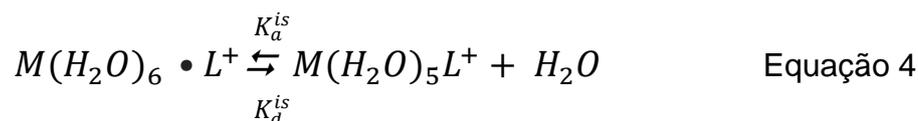
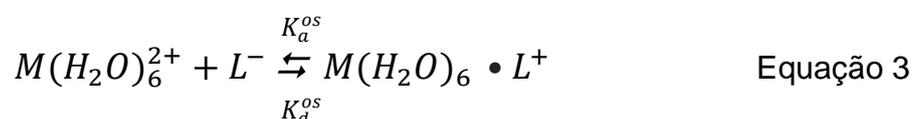
$$K' = K c_{L,t} = \frac{c_{ML}}{c_M} \quad \text{Equação 2}$$

onde, $c_{L,t}$ e $c_{M,T}$ representa a concentração total do ligante e do metal na solução respectivamente e:

- c_L é a concentração do ligante livre na solução;
- c_M é a concentração do metal livre na solução;
- c_{ML} é a concentração do complexo na solução;
- t o tempo.

2.2.1. Mecanismo de Eigen

Os íons metálicos são um caso particular dentro da cinética química, pois é regido por um mecanismo característico designado por mecanismo de Eigen (EIGEN; TAMM, 1963). Este vem sendo utilizado por mais de meio século, para descrever a cinética de complexação dos íons metálicos em sistemas aquosos sendo composto por duas etapas principais: (i) formação de um complexo precursor na esfera externa de coordenação (do inglês, *outher sphere* (os)); (ii) posterior liberação da molécula de água da esfera interna (do inglês, *inner sphere* (is)) com entrada do íon metálico, para formar uma ligação de coordenação com o ligante, como descrito nas equações 3 e 4.



onde K_a^{os} e K_d^{os} são as constantes de formação e de taxa de dissociação para o complexo de esfera externa, $M(H_2O)_6 \cdot L^+$; K_a^{is} e K_d^{is} são as constantes de velocidade para a substituição da molécula de H_2O por L^- no complexo da esfera interna, e vice-versa, respectivamente.

A etapa limitante da velocidade para a formação do complexo de esfera interna $M(H_2O)_6 \cdot L^+$ é a perda de uma molécula de água da esfera interna. A constante de velocidade é geralmente nomeada como k_w e assim, $K_a^{is} = k_w$. O valor de k_w é independente do ligante L e a Tabela 1 mostra alguns valores de metais que podem ser encontrados na literatura (MARGERUM et al., 1978).

Tabela 1- Valores de constantes de velocidade de perda da molécula de água da esfera interna de coordenação para o Al, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn.

Íon Metálico	k_w (s ⁻¹)	Faixa de valores
Pb ²⁺	7×10 ⁹	
Hg ²⁺	2×10 ⁹	
Cu ²⁺	1×10 ⁹	(0,2-5)×10 ⁹
Ca ²⁺	6×10 ⁸	(0,5-9)×10 ⁸
Cd ²⁺	3×10 ⁸	(1-5)×10 ⁸
Zn ²⁺	7×10 ⁷	(3-50)×10 ⁷
Mn ²⁺	3×10 ⁷	(0,4-5)×10 ⁷
Fe ²⁺	4×10 ⁶	(1-4)×10 ⁶
Co ²⁺	2×10 ⁶	(0,2-2)×10 ⁶
Ni ²⁺	3×10 ⁴	(1-4)×10 ⁴
Fe ³⁺	2×10 ²	(2-200)×10 ²
Al ³⁺	1	0,2-16
Cr ³⁺	5×10 ⁻⁷	(4-6)×10 ⁻⁷

Na formação sucessiva de complexos $M(H_2O)_4L_2$ etc., o valor de k_w torna-se dependente da natureza do ligante e geralmente aumenta com a diminuição do número de moléculas de água presentes na esfera interna (MARGERUM et al., 1978).

Por outro lado, a formação dos complexos de esfera externa é puramente eletrostática sendo que as constantes de velocidade para a formação/dissociação do complexo na esfera externa são procedentes de U^{os} (energia da interação eletrostática adimensional) e das mobilidades do $M(H_2O)_6^{2+}$ e L^- , representadas por seus respectivos coeficientes de difusão (MARGERUM et al., 1978).

Como k_w é geralmente muito menor que K_d^{os} a constante global, k_a , para a formação do complexo de esfera interna a partir de $M(H_2O)_6$ e L^- pode ser escrita como:

$$k_a = K^{os} k_w \quad \text{Equação 5}$$

2.3. Técnicas analíticas para análise de especiação

Em paralelo ao desenvolvimento teórico em especiação de metais traço foi observado nos últimos anos um progresso em relação ao desenvolvimento de métodos e técnicas analíticas que possibilitassem a separação e quantificação das espécies de interesse, ou ainda técnicas que permitissem a especiação direta nas amostras de águas. A escolha do método ou técnica adequada ao estudo em especiação deve levar em consideração alguns critérios como: interferência da matriz, sensibilidade, tempo de análise, disponibilidade de equipamento, exatidão e/ou precisão e custo.

Pesavento et al. (2009) apresentaram uma revisão sobre métodos/técnicas analíticas de determinação de concentração de íons metálicos livres, fração de espécies lábeis e capacidade de complexação em águas naturais. Esta revisão separa as técnicas que permitem a separação das espécies para posterior quantificação, como exemplo, as técnicas de gradiente difusivo em filmes finos (do inglês, *Diffusive Gradient in Thin Films-DGT*), de membrana Donnan (do inglês, *Donnan Membrane Technique-DMT*) e permeação em membrana líquida (do inglês, *Permeation Liquid Membrane-PLM*), das técnicas eletroanalíticas que compreendem a voltametria de redissolução anódica (do inglês, *Anodic Stripping Voltammetry-ASV*), voltametria de redissolução competitiva por troca de ligante (do inglês, *Competitive Ligand Exchange-Stripping Voltammetry- CLE-SV*), cronopotenciometria de redissolução (do inglês, *Stripping Chronopotentiometry-SCP*), redissolução nernstiana na ausência de gradientes (do inglês, *Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping-AGNES*) e microeletrodo integrado a gel (do inglês, *Gel Integrated Microelectrode-GIME-VIP*), e ainda técnicas cromatográficas como a cromatografia de troca iônica e o emprego de resinas complexantes.

No entanto, a maioria das técnicas apresentadas nesta revisão precisa de algum tratamento prévio (eliminar a matéria orgânica e/ou pré-concentrar as espécies), para a posterior quantificação das espécies, o qual pode ocasionar alterações na representatividade da amostra original.

Neste trabalho optou-se em utilizar para os estudos de especiação os métodos eletroanalíticos porque estes apresentam requisitos como sensibilidade e seletividade adequada e custo moderado.

2.3.1. Técnicas eletroanalíticas de redissolução

Análise de redissolução é um método analítico que utiliza uma etapa de eletrolise no interior da solução para redução (pré-concentração) de um metal a partir da solução para o pequeno volume de um eletrodo (uma gota pendente ou um filme fino) de mercúrio. Após esta etapa de deposição, o metal é reoxidado a partir do interior do eletrodo, sendo a sua quantificação efetuada utilizando uma técnica eletroquímica adequada. Se as condições hidrodinâmicas durante a etapa de pré-eletrólise forem mantidas constantes e efetuando uma calibração adequada, este conjunto de técnicas pode ser usado para determinar concentrações de metais em soluções com limites de detecção muito baixos, da ordem de nmol L^{-1} (MOTA et al., 1995).

A grande vantagem do método, em comparação com a análise voltamétrica direta na solução original, é a pré-concentração do material a ser analisado sobre ou no interior do eletrodo (por fatores de 100 a > 1000), de modo que a corrente de redissolução é menos perturbada pelas cargas ou correntes de impurezas residuais. A técnica é especialmente útil para a análise das soluções muito diluídas ($< 10^{-7}$ até $10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$).

O eletrodo de mercúrio utilizado em análise de redissolução pode ser um eletrodo de gota de mercúrio convencional (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*) ou um eletrodo de filme de mercúrio (MFE, do inglês, *Mercury Film Electrode*). Uma vez que o MFE tem um volume muito menor e uma área maior do que o HMDE apresenta uma sensibilidade mais elevada. Além dos eletrodos de mercúrio, eletrodos sólidos (por exemplo, Pt, Ag, C) são usados com menor frequência, sem mercúrio para íons que não podem ser determinados pelo mercúrio (por exemplo, Ag e Au).

2.3.1.1. Cronopotenciometria de redissolução (SCP)

A literatura revela que a voltametria de redissolução anódica (VRA) é uma excelente técnica para determinar as concentrações de metais traço em solução, porém, na presença de agentes complexantes orgânicos podem sofrer interferências que dificultam a análise (BUGARIN et al., 1994).

As medidas em VRA são sensíveis à adsorção de substâncias orgânicas podendo afetar significativamente o sinal dos íons metálicos. A magnitude deste efeito varia de acordo com o parâmetro de escala de tempo relevante (como derivados de taxa de varredura e/ou frequência de modulação nas seguintes técnicas: voltametria de redissolução de corrente contínua (do inglês, *Direct Current Stripping Voltammetry*- DC-SV); voltametria de pulso diferencial (do inglês, *Differential Pulse Stripping Voltammetry*- DP-SV) e a voltametria de onda quadrada (do inglês, *Direct Current Stripping Voltammetry*- SW-SV)), sendo que os modos de escala mais curtos de tempo (DP e SW) são mais fortemente afetados.

Inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas para resolver a interferência de adsorção, as mais comuns envolvem alguma modificação da superfície do eletrodo, tipicamente a aplicação de um revestimento de polímero (por exemplo, Nafion[®]). No entanto, é muito difícil de modificar a superfície do eletrodo, de forma reproduzível e bem caracterizado. Procedimentos de troca de meio também têm sido testados, mas na prática é extremamente difícil obter dados confiáveis e reproduzíveis com esta abordagem. Outro fator que complica é a avaliação experimental da extensão da labilidade dos complexos, exigindo uma variação eficaz da escala de tempo da técnica muitas vezes longa.

Para resolver muitos destes problemas, foi desenvolvida a cronopotenciometria de redissolução (SCP, do inglês, *stripping chronopotentiometry*) que tem a mesma etapa de deposição descrita para a voltametria de redissolução anódica (VRA), mas a quantificação do metal acumulado é feita através da aplicação de uma corrente de reoxidação constante, I_s , e o sinal analítico é o tempo necessário para a reoxidação (o tempo de transição, τ) (TOWN; VAN LEEWEN, 2001).

Assim, para um dado tempo de deposição, o sinal pode ser aumentado por utilização de uma corrente de reoxidação menor. O limite para este aprimoramento vai ser, no entanto, determinado na prática pela presença de impurezas redox ativas, tais como o oxigênio.

O sinal analítico em SCP é uma variação do potencial, E , em função do tempo. O declive desta curva, na ausência de um processo faradaico, é determinado pela capacitância do eletrodo de camada dupla, este declive é modificado na presença de espécies adsorvidas. Logo, a forma correta é

determinar os tempos de deposição da área sob os picos no plot entre dt/dE versus E . Usa-se a notação dt/dE para denotar o inverso do tempo e a derivada do potencial (que é o sinal medido).

- SCP: a importância da depleção completa

Uma das características mais interessantes da SCP é utilizar uma corrente de reoxidação suficientemente pequena para obter a depleção completa na etapa da reoxidação. Isto permite simplificar o tratamento teórico (pois não existe camada de difusão dentro do eletrodo) e evitar muitos dos problemas de adsorção de matéria orgânica à superfície do eletrodo que tendem a distorcer os sinais das técnicas voltamétricas (TOWN; VAN LEEWEN, 2002).

Deste ponto de vista os eletrodos de filme fino de mercúrio (MFE) são muito atrativos para usar com estas técnicas, pois neste eletrodo, o metal é transportado rapidamente para a superfície durante a reoxidação, de maneira que as medidas são realizadas quase sempre em condições de depleção completa.

Do ponto de vista teórico as equações durante a deposição e o número de mols dos íons metálicos amalgamados são dadas (TOWN; VAN LEEWEN, 2001). por:

$$n. \text{ mol depositado} = I_d^* \tau_d / nF \quad \text{Equação 6}$$

E o número de mols reoxidados é dado por:

$$n. \text{ mol reoxidado} = I_s \tau^* / nF \quad \text{Equação 7}$$

onde I_s é a corrente de redissolução/reoxidação τ^* é o valor limite para o tempo de transição obtido por potenciais de deposição muito maiores que o potencial padrão, $E_d \gg E^0$. No modo da depleção o número de mols depositado é igual ao número de mols reoxidados e o tempo de transição limite é dado por:

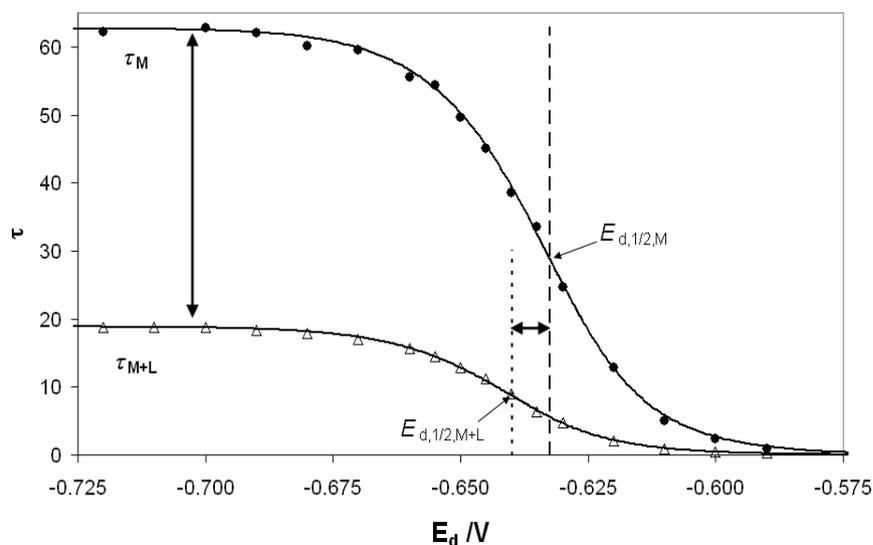
$$\tau^* = I_d^* t_d / I_s \quad \text{Equação 8}$$

representando o balanço de carga para a depleção completa.

Teoricamente, τ deveria aumentar continuamente à medida que I_s diminui. No entanto, quanto menor for I_s maior será a competição por agentes oxidantes presentes na solução como o oxigênio. Monteiro et al., (2016) utilizando um eletrodo MFE (área superficial de 9,6 mm), corrente de redissolução de $2,5 \times 10^{-6} \text{A}$, e tempo de deposição 45s encontraram $1,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, como a concentração mínima detectável de Cd total em amostras de águas naturais de rios, que é similar ao encontrado em medidas feitas com DP-SV seguindo a mesma metodologia.

Um seguimento natural do desenvolvimento de SCP foi a aplicação de SCP por etapas, isto é, a SCP para a varredura de potencial de deposição (SSCP, do inglês *scanned deposition potential*), como uma abordagem para a determinação dos parâmetros de especiação de metais, além de ser capaz de fornecer informação tanto sobre a natureza dinâmica, quanto sobre a heterogeneidade dos complexos metálicos (TOWN; VAN LEEWEN, 2003). As curvas de SSCP são construídas a partir de uma série de experimentos a diferentes potenciais de deposição, E_d e representando os tempos de transição em função dos potenciais de deposição (“pseudopolarograma”). A principal vantagem da utilização da SSCP é a possibilidade de determinar as constantes de associação/dissociação do sistema em estudo, contanto que o coeficiente de difusão do ligante seja conhecido.

A Figura 1 exemplifica duas curvas de SSCP, uma onde só existe o íon metálico (τM) e outra em presença de ligantes complexantes ($\tau M+L$). Pode-se observar que a presença dos ligantes ocasiona um decréscimo na intensidade do sinal do íon metálico. Esse decréscimo varia de acordo com a afinidade dos ligantes pela espécie metálica e das condições experimentais (pH, força iônica e concentração e tipo do ligante, por exemplo).



Fonte: Paulo Pinheiro

Figura 1- Exemplo de curva de SSCP na (•) ausência do ligante, M, e (Δ) na presença do ligante, M+L, indicando a variação do potencial de deposição, $E_{d,1/2}$ e tempo limite, τ .

2.3.1.2. Técnica de redissolução nernstiana na ausência de gradientes (AGNES)

AGNES é uma técnica eletroquímica de redissolução utilizada para a determinação direta da concentração de metal livre, consistindo em duas etapas sequenciais: a primeira etapa é a deposição e a segunda é a reoxidação do metal.

Na etapa de deposição se aplica um potencial próximo do potencial de redução padrão do metal e espera-se até atingir o equilíbrio termodinâmico entre o metal amalgamado e o interior da solução (a concentração acumulada depende apenas de c_M^* (concentração de íon metálico no interior da solução) e é independente de qualquer outra característica do meio, como a complexação ou adsorção eletrolítica (assumindo a existência de uma quantidade suficientemente grande de eletrólito de fundo amortecendo a força iônica, de modo que as atividades e concentrações são sempre proporcionais), por causa do equilíbrio de Nernstian prescrito pela Eq. (9). No fim da etapa de deposição, obtém-se a razão entre o metal amalgamado e em solução segundo a equação (GALCERAN, et al., 2004):

$$Y = \frac{c_{M,amalg}}{c_M^*} = \exp \left[\frac{-nF(E_1 - E^0)}{RT} \right] \quad \text{Equação 9}$$

onde Y representa o ganho (ou fator de pré-concentração), $c_{M,amalg}$ é a concentração de metal amalgamado, c_M^* é a concentração de íon metálico no interior da solução, E^0 é o potencial de redução padrão do metal e E_1 o potencial de deposição aplicado ao eletrodo, R é a constante dos gases, F a constante de Faraday, n é o número de elétrons envolvidos no processo de redução/oxidação e T a temperatura.

Na segunda etapa se reoxida o metal amalgamado com intuito de medi-lo e o tempo de reoxidação (τ) é diretamente proporcional a $c_{M,amalg}$. Nesta etapa, o metal amalgamado é quantificado usando uma cronopotenciometria de redissolução anódica tendo E_1 como potencial inicial (PARAT et al., 2011), que resulta no sinal obtido que é diretamente proporcional à concentração de íon metálico no interior da solução:

$$\text{Sinal} = Y \cdot c_M^* \quad \text{Equação 10}$$

Dessa forma, AGNES funciona de uma forma análoga a um eletrodo de íons seletivo (EIS) permitindo a determinação direta do valor do íon metálico livre na solução, mas com um limite de detecção da ordem de nM (para tempos de deposição de 1 a 2 min em eletrodos de filme de Hg) característico das técnicas eletroquímicas de redissolução anódica (GALCERAN, et al., 2004; PARAT et al., 2011). Além disso, conhecendo o valor do metal livre na solução e o balanço de massa para o metal é simples obter o valor da constante de estabilidade K .

Esta técnica já foi aplicada com bons resultados, por exemplo, na modelagem de chumbo (Pb^{2+}) com a matéria orgânica isolada de sistemas aquáticos urbanos (PERNET et al., 2011) mas é especialmente interessante para medidas de zinco (Zn), metal para o qual não existe um EIS comercial (CHITO et al., 2012).

Como vantagens, AGNES apresenta uma boa seletividade, um baixo limite de detecção ($nmol L^{-1}$) e é indiferente à adsorção de matéria orgânica na superfície do eletrodo, porém, poucos metais formam amálgama com o mercúrio (cobre,

cádmio, chumbo, zinco, índio, tálio, bismuto, estanho). A principal desvantagem da AGNES é o tempo de duração da etapa de deposição necessário para atingir o equilíbrio, que pode requerer tempos de análise muito elevados até se atingir o equilíbrio na etapa de deposição (de minutos a horas) com a diminuição da concentração (GALCERAN et al, 2004), no entanto, isto pode ser atenuado pelo uso de um eletrodo de filme fino de mercúrio.

Outra abordagem utilizada para estudar a especiação de metais traço em águas naturais é a ultrafiltração em fluxo tangencial, descrita a seguir.

2.4. Ultrafiltração em fluxo tangencial (UFT)

A ultrafiltração em fluxo tangencial (UFT) é uma técnica que permite separar compostos em função do tamanho molecular. E é um dos métodos citados na literatura capaz de discriminar a concentração do “metal livre” (M), para isso, o procedimento é geralmente realizado com uma membrana de pequena porosidade, como por exemplo, 1 kDa, para distinguir a espécie livre das coloidais (substâncias dissolvidas com tamanhos maiores que 1kDa retidas na membrana, por exemplo as substâncias húmicas). As espécies metálicas quantificadas no ultrafiltrado, fração (<1kDa), são geralmente definidas como “livres”, embora os cátions metálicos presentes nesta fração possam também estar complexados à pequenos ligantes orgânicos ou inorgânicos que apresentam tamanho suficientemente pequeno para atravessar a membrana (BURBA et al., 1994; MONTEIRO, et al., 2016).

A UFT é uma técnica atrativa por ser simples, dispensar o uso de reagentes, minimizando, assim, possíveis contaminações e alterações na representatividade original da amostra, e de baixo custo (ROMÃO; ROCHA, 2005). Além disso, a UFT pode ser utilizada também em estudos de fracionamento molecular das diversas matrizes (MON, SHA, ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF)) (SARGENTINI et al., 2001; WATANABE et al., 2017).

Como estas matrizes podem ser constituídas por diferentes compostos de diferentes tamanhos, o fracionamento molecular que é um procedimento baseado no tamanho molecular (com uso de membranas de diversos tamanhos, variando de 100 a 1 kDa) permite diminuir a heterogeneidade e a complexidade da matéria

orgânica, facilitando, assim, a compreensão do comportamento e distribuição dos íons metálicos nessas matrizes a partir de suas frações (SARGENTINI et al., 2001; ROCHA; ROSA, 2003).

Os resultados obtidos por Sargentini e colaboradores (2001) demonstraram que o fracionamento possibilitou separar e concentrar as SHA extraídas de amostras de águas coletadas no rio Negro-AM em seis frações com diferentes tamanhos moleculares: F1: >100, F2: 50-100, F3: 30-50, F4: 10-30, F5: 5-10 e F6 < 5 kDa. Sendo a distribuição de carbono encontrada descrita como F6 > F2 > F3 > F1 > F4 > F5 e a maior porcentagem dos íons metálicos originalmente presentes nas SHA esteve complexada na fração F2.

Vale ressaltar que a ultrafiltração é um método de separação e que para a determinação das espécies livres de interesse no ultrafiltrado se faz necessário uma técnica analítica para esse fim, que pode ser tanto uma espectroanalítica (espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF AAS) e/ou espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)) ou uma eletroanalítica, logo o limite de detecção estará relacionado à técnica escolhida.

2.5. Cádmio e chumbo no ambiente

Sabe-se que íons metálicos como cobre, ferro, manganês e zinco são micronutrientes essenciais em processos de função fisiológica para a maioria dos seres vivos (OTERO et al., 2015). Já os elementos considerados mais perigosos para a saúde humana e meio ambiente são o chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio. Estes íons têm sido amplamente estudados e os seus efeitos nos humanos regularmente revistos por órgãos internacionais como a organização mundial de saúde (OMS) (JARUP, 2003).

Neste trabalho, os estudos de especiação e interação com a matéria orgânica serão realizados com o cádmio e chumbo. Estes metais traço foram escolhidos particularmente, por serem considerados elementos potencialmente tóxicos ao meio ambiente, seres humanos e animais, bem como, por não possuírem nenhuma função fisiológica no organismo, além de formarem amálgama

com os eletrodos de filme de Hg, permitindo sua detecção por AGNES e SCP (MOREIRA; MOREIRA, 2004; SHUJUN, et al., 2014).

2.5.1. Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal traço encontrado na natureza associado a sulfetos de minérios de zinco, cobre e chumbo (CETESB, 2012). É considerado um metal potencialmente tóxico, não apenas pelos altos níveis de toxicidade, mas também devido a sua ampla distribuição e aplicação industrial, podendo ser encontrado em alimentos, água e ar. Emissões de cádmio aumentaram de maneira drástica durante o século 20, pois os produtos contendo Cd são raramente reciclados, e por causa disso, muitas vezes são descartados junto com o lixo doméstico. A principal fonte de exposição ao cádmio em seres humanos é o tabagismo, bem como ingestão de alimentos contaminados por fertilizantes agrícolas, esgotos e deposição atmosférica (JARUP et al., 2000; KIPPLER et al., 2012).

O Cd(II) pode bioacumular em plantas aquáticas, invertebrados, peixes e mamíferos causando danos renais e aos ossos, sendo considerado cancerígeno pela agência internacional de pesquisa em câncer (CETESB, 2012). Estes danos à saúde são ocasionados devido à afinidade do cádmio por estruturas biológicas contendo grupos tióis, como por exemplo, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (MERCÊ et al., 2003).

Os valores máximos permitidos de Cd total em água potável e águas doces estabelecidos pela legislação brasileira (Portaria 2914/2011 e CONAMA nº 357/2005), são 0,005 e 0,001-0,01 mg L⁻¹, respectivamente.

2.5.2. Chumbo

O chumbo (Pb) é um elemento de ocorrência natural geralmente associado à minérios, principalmente àqueles que contêm zinco, sendo amplamente utilizado pelas indústrias de baterias, tintas, corantes e cosméticos (CETESB, 2012). A sua presença em ambientes aquáticos é proveniente da deposição atmosférica, da lixiviação do solo e do descarte direto do contaminante (JARUP, 2003).

O Pb é considerado um metal potencialmente tóxico na sua forma dissolvida, principalmente na forma iônica, Pb(II), pois assim encontra-se mais disponível para ser assimilado pela biota aquática, mesmo quando encontrado em baixas concentrações. No entanto, em sistemas aquáticos, apenas uma pequena fração do Pb está dissolvida na água, visto que a maior parte do metal encontra-se particulado e ligado a outros compostos, como por exemplo, às substâncias húmicas. Este fato confere ao Pb pouca mobilidade e biodisponibilidade (NORDEC, 2003).

O efeito do chumbo na saúde humana depende da intensidade e duração da exposição. As principais vias de exposição da população geral ao chumbo são oral e inalatória (CETESB, 2012). As concentrações máximas estabelecidas pela legislação brasileira de Pb em água potável e águas doces, são de 0,01 e 0,01 a 0,033 mg L⁻¹, respectivamente (Portaria 2914/2011 e CONAMA nº 357/2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver métodos eletroanalíticos utilizando as técnicas SCP e AGNES capazes de determinar a concentração total e livre de cádmio diretamente em amostras de águas naturais dos rios Sorocabinha e Itapanhaú, que possibilitem uma futura aplicação on-site. E avaliar a influência das substâncias húmicas aquáticas extraídas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú nas interações do Cd(II) e Pb(II) utilizando AGNES.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar as amostras de águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú coletadas em duas estações do ano (seca e chuvosa) em 2014, em função dos parâmetros de qualidade de água, quantidade e qualidade do carbono orgânico dissolvido e metais originalmente presentes, para identificar as principais diferenças entre os dois rios;
- Extrair as substâncias húmicas e suas frações, ácidos fúlvicos (AF) e húmicos (AH), das águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú seguindo o método recomendado pela sociedade internacional de substâncias húmicas (do inglês, *international humic substances society* – IHSS) e caracterizá-las por meio da análise elementar e RMN ^{13}C , a fim de investigar se há diferenças significativas da composição estrutural entre as substâncias húmicas e suas frações AF e AH;
- Realizar o fracionamento molecular das substâncias húmicas e suas frações (ácido húmico e ácido fúlvico) extraídas do RS e RI utilizando a ultrafiltração em fluxo tangencial com membranas de tamanhos de 100, 30, 10, 3 e 1 kDa e comparar com o fracionamento da sua amostra *in natura* correspondente,

além de avaliar a distribuição do carbono orgânico e dos metais originalmente presentes nessas amostras, nas diferentes frações obtidas;

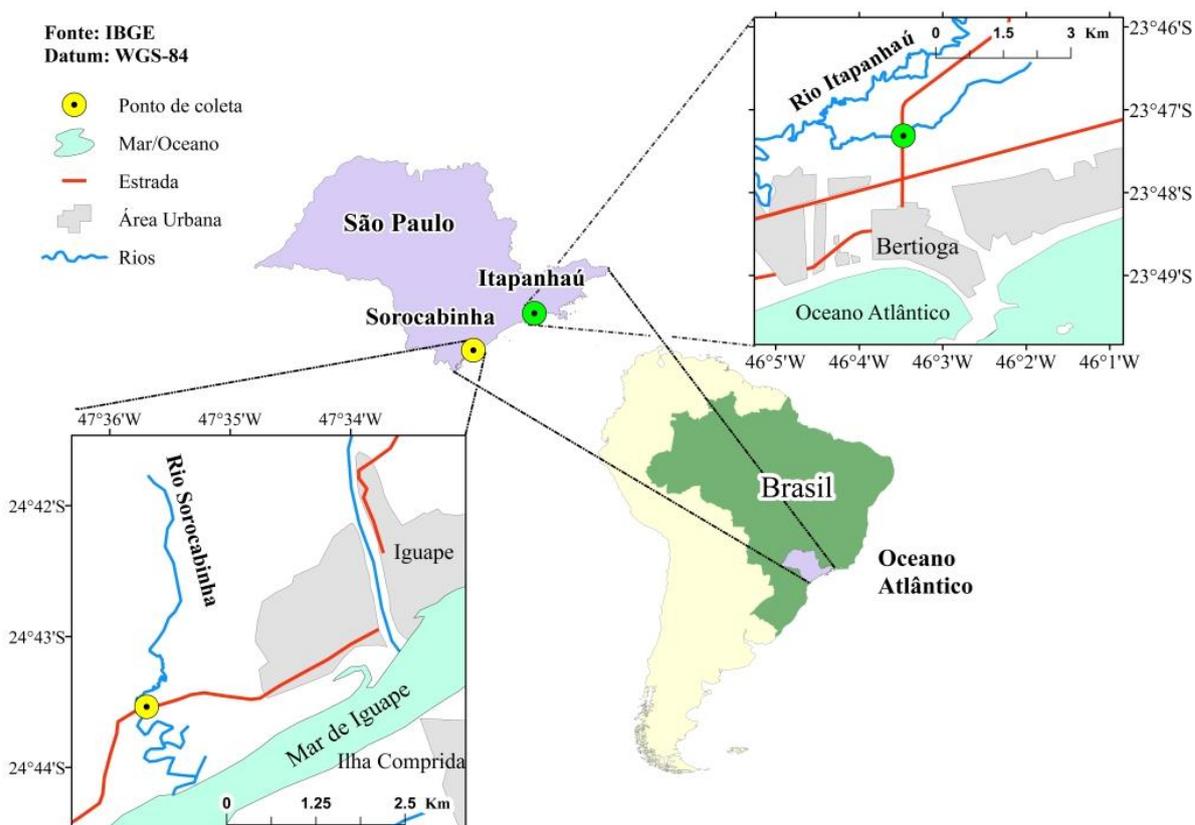
- Validar o método de AGNES proposto para a quantificação de cádmio livre nas amostras e água *in natura* através de experimentos usando a ultrafiltração em fluxo tangencial com membrana de 1kDa e o método de SCP proposto para a quantificação do cádmio total diretamente nas amostras de águas *in natura* e ultrafiltradas acidificadas dos rios Itapanhaú e Sorocabinha, com os resultados obtidos por GF-AAS;

- Avaliar as principais diferenças das interações de Cd(II) e Pb(II) determinados por AGNES, com os ácidos fúlvicos e húmicos extraídos das águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú levando em consideração fatores como origem do material, sazonalidade e diferentes condições de pH.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e amostragem

Duas áreas de estudo, rio Itapanhaú (latitude $24^{\circ}41'59''$ e longitude $47^{\circ}35'43.68''$) e Sorocabinha (latitude $23^{\circ}50'23''$ e longitude $46^{\circ}08'21''$) (Figura 3), foram escolhidas a fim de investigar e comparar a influência de ambientes diferentes, na formação da matéria orgânica natural (MON) e sua interação com o Cd(II) e Pb(II). Afim de avaliar a influência da sazonalidade na MON nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú foram coletados (~200 L) de amostras de águas naturais em duas estações do ano, uma no período chuvoso (março/ 2014) e outra no período seco (novembro/ 2014).



Fonte: Autoria própria

Figura 2- Mapa do Estado de São Paulo indicando a localização dos pontos de amostragem nos rios Sorocabinha e Itapanhaú.

O rio Itapanhaú está localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, situando-se na 7ª Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos, município de Bertioga-SP e exerce papel fundamental no desenvolvimento econômico das comunidades locais (atividades de pesca), no turismo e na agricultura (GOVEIA et al., 2011).

O rio Sorocabinha situa-se no município de Iguape-SP, e é um dos afluentes do rio Ribeira de Iguape, localizado próximo à Estação Ecológica da Jureia, situando-se na 11ª Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos - Ribeira do Iguape-litoral Sul (GOVEIA et al., 2011).

Esses rios foram escolhidos por apresentar altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD), o que pode ser observado pela coloração amarela-castanho das águas coletadas na Figura 3. Uma das principais características que difere um ambiente do outro é que o rio Sorocabinha sofre influência da maré por estar mais próximo ao mar (1,49 Km - distância em linha reta até o mar) comparado com o rio Itapanhaú que está a 2,9 Km (distância em linha reta até o mar), valores aproximados.



Fonte: autoria própria.

Figura 3- Pontos de amostragem (a) rio Itapanhaú e (b) rio Sorocabinha.

As amostras foram coletadas na camada superficial, utilizando recipientes de polietileno de 50 L previamente limpos. Antes da coleta os recipientes foram lavados duas a três vezes com a água a ser amostrada, após coleta estas amostras foram levadas ao laboratório, armazenadas a 4°C até a análise. Todos os procedimentos de coleta, conservação e análise obedeceram às metodologias descritas no standard methods (AMERICAN, 2005).

4.2. Caracterização das águas *in natura* dos rios

4.2.1. Qualidade da Água

A qualidade da água foi avaliada a partir das medidas *in situ*, de pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD), utilizando uma sonda multiparâmetro da marca Hanna modelo HI9829, previamente calibrada, bem como, por meio das análises de fósforo total (PT), nitrogênio total (NT), cloreto (Cl⁻), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), turbidez e cor (todas realizadas em laboratório e em triplicata). A análise de PT e Cl⁻ foram realizadas seguindo procedimento do método 4500-P e 4500 Cl⁻B, descritos no standard methods (AMERICAN, 2005). O NT foi determinado por meio do método 10071 (digestão com persulfato- Kit da marca Hach). A DBO₅ foi obtida pela diferença entre o OD inicial medido *in situ* e o OD realizado no laboratório após 5 dias da coleta. A turbidez e a cor foram medidas em um turbidímetro e medidor de cor da marca Quimis, respectivamente.

4.2.2. Determinação do carbono orgânico dissolvido (COD)

Para a determinação do carbono orgânico dissolvido (COD), as amostras foram previamente filtradas em membranas de nitrato de celulose da marca Millipore de 0,45 µm, acidificadas com H₃PO₄, armazenadas em frascos âmbar e deixadas sob refrigeração. As concentrações do COD foram medidas em triplicata, pela combustão da amostra à 800°C em um analisador de carbono da marca Analytik Jena Multi modelo N/C 3100.

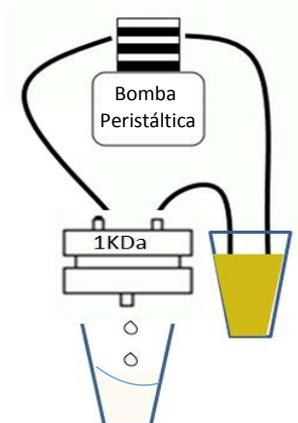
4.2.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As medidas de absorvâncias nos comprimentos de onda 254 e 436 nm foram realizadas no espectrofotômetro da marca Varian modelo Cary 50 usando cubetas de quartzo de 1 cm, nas amostras filtradas em membranas de nitrato de celulose da marca Millipore de 0,45 µm. A água ultrapura (18,2 MΩ.cm, Millipore) foi utilizada como branco (ELBISHLAWI; JAFFE, 2015).

4.2.4. Determinação das frações do metal total, dissolvido e livre presentes originalmente nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú

As frações do metal total e dissolvido originalmente presentes nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú, foram obtidas após a digestão ácida (em triplicata), das amostras *in natura* bruta (representando a concentração do metal total - MT) e das amostras previamente filtradas em membranas de nitrato de celulose de 0,45 µm, para obtenção da concentração dos metais dissolvidos (MD), seguindo o procedimento descrito no método 3005A da agência de proteção ambiental do Estados Unidos (do inglês, *US Environmental Protection Agency* - USEPA, 1992). Os ácidos HNO₃ (65%) e HCl (37%) utilizados na digestão foram previamente purificados usando um destilador *sub-boiling*. Como alguns metais podem encontrar-se a nível de traços as amostras foram pré-concentradas, com fator de pré-concentração de 6, para posterior determinação quantitativa.

Para a obtenção da fração dos metais livres (M) foram realizados experimentos utilizando um sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial (UFT) feito de teflon, com uma membrana de celulose regenerada de 1 kDa de 76 mm de diâmetro, da marca Millipore, acoplado a uma bomba peristáltica da marca Gilson Minipuls 3, com tubulação de tygon da marca Agilent (Figura 4). Após cada experimento, a limpeza do sistema e da membrana era realizado usando 50 mL de NaOH (0,1 mol L⁻¹) e 50 mL de HCl (0,009 mol L⁻¹). Após cada etapa, o sistema foi exaustivamente lavado com água ultrapura (18,2 MΩ.cm, Millipore), e as membranas foram estocadas em solução de etanol 10% na geladeira.



Fonte: Autoria própria.

Figura 4- Sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial utilizado para obtenção da fração dos metais livres (M).

Neste sistema, cerca de 200 mL das amostras previamente filtradas em membranas de 0,45 μm foram recirculados no sistema por aproximadamente 30 minutos para a ambientação das amostras no sistema. Após esse tempo, alíquotas de 2 mL foram recolhidas, acidificadas com HNO_3 1,0 mol L^{-1} e refrigeradas para posterior determinação da “fração livre”. Vale ressaltar, que inicialmente foram realizadas otimizações para estabelecimento das condições ideais de trabalho com os sistemas de UFT a fim de minimizar e evitar possíveis vazamentos. Para isso, as variações do fluxo de recirculação (2 mL min^{-1}) e vazão da gota entre 9-11s foram ajustadas e a velocidade da bomba peristáltica fixada em 6 rpm, para não haver variação da pressão interna no sistema.

A quantificação dos metais nas frações total, dissolvida e livre foi realizada utilizando o ICP OES (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado) com vista axial da marca Agilent Technologies modelo 700 series. O método otimizado no ICP OES permitiu a determinação multielementar de Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn. A Tabela 2 exhibe as condições operacionais utilizadas no ICP OES durante as determinações.

Tabela 2- Características e condições operacionais utilizadas no ICP OES com vista axial para a análise multielementar de Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn nas amostras após digestão ácida.

Parâmetros	Valores		
Potencia de radiofrequência (W)	1100		
Vazão de gás no plasma (L min ⁻¹)	15,0		
Vazão de gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5		
Vazão do gás nebulizador (L min ⁻¹)	0,6		
Tipo de nebulizador	Concêntrico (tipo Sea Spray)		
Câmara de pulverização	Tipo ciclone		
Linhas de Emissão (nm)	Al	Cu	Pb
	(237,312)	(327,395)	(220,353)
	Cd	Fe	Zn
	(214.439)	(238.204)	(213.857)
	Co	Mn	
	(228,615)	(257,610)	
	Cr	Ni	
	(267,716)	(231,604)	

A Tabela 3 mostra sumariamente os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados para as frações do metal total, dissolvido e livre, usando ICP OES. O LD foi calculado usando a recomendação da União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC) como $(3 \times SD_{\text{branco}} / \text{Inclinação da curva})$ e o $LQ = (10 \times SD_{\text{branco}} / \text{Inclinação da curva})$, sendo SD_{branco} o desvio padrão de dez medidas das intensidades de emissão das soluções do branco do método (água ultrapura + HCl + HNO₃).

Tabela 3- Valores dos limites de detecção e de quantificação para os metais Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn analisados por ICP OES.

Concentrações em ($\mu\text{g L}^{-1}$) das frações do metal						
	Total (MT)		Dissolvido (MD)		Livre (M)	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
Al	38,3	127,8	30,0	92,3	11,0	36,9
Cd	1,0	3,2	0,5	1,8	0,1	0,3
Co	1,1	3,8	1,5	4,9	0,3	1,0
Cr	0,7	2,5	0,5	3,0	0,2	0,8
Cu	0,5	1,7	0,9	3,0	0,2	0,8
Fe	76,1	243,5	28,8	95,9	0,9	3,0
Mn	0,4	1,4	0,5	1,8	0,1	0,5
Ni	3,5	11,8	6,0	19,9	0,1	3,3
Pb	15,4	51,3	15,4	51,5	1,0	3,3
Zn	13,1	43,5	10,5	34,9	2,6	8,5

4.2.5. Análise exploratória dos dados

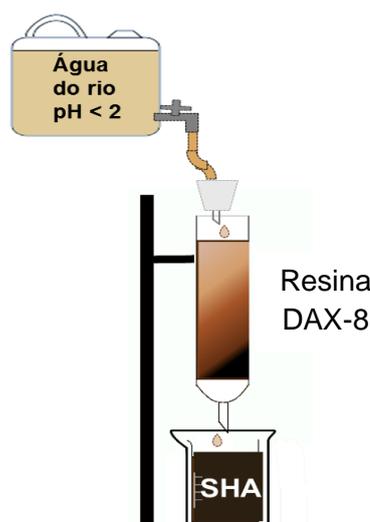
O software Statistica 6.0 foi usado para aplicação da análise de componentes hierárquicos (HCA) aos resultados obtidos das concentrações dos metais (total, dissolvido e livre). E a análise de variância (ANOVA) de fator único, no intervalo de 95 % de confiança, calculada no Excel, foi aplicada ao conjunto dos dados obtidos através dos espectros de RMN ^{13}C .

4.3. Extração das substâncias húmicas aquáticas presentes nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú

O método de cromatografia de adsorção em coluna foi escolhido para a extração das SHA do rio Sorocabinha e Itapanhaú. Este procedimento foi proposto por Thurman et al. (1981) e é recomendado pela IHSS. O método para extração possui três etapas: (1) montagem/empacotamento das colunas; (2) passagem das amostras pelas colunas e (3) eluição das substâncias húmicas retidas na coluna. O sistema montado para a extração está ilustrado na Figura 5.

O preenchimento da coluna cromatográfica foi feito com a resina DAX 8 que foi previamente purificada para a retirada de possíveis grupos hidrofílicos retidos. A purificação da resina consistiu em deixá-la imersa sob agitação em temperatura ambiente em soluções de metanol por 20 minutos, HCl 0,1 mol L⁻¹ (24 horas) e NaOH 0,1 mol L⁻¹ (24 horas). Após cada etapa, a resina foi exaustivamente lavada com água ultrapura (18,2 MΩ.cm, Millipore). Com a resina purificada, as colunas foram preenchidas até cerca de 50 a 60 % da sua capacidade, o restante foi preenchido com água ultrapura. Após o empacotamento da resina, 100 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ foi percolado através da coluna para otimização do processo de fixação das SHA na resina.

Antes de iniciar a etapa 2, cerca de 150 L das amostras de água dos rios Sorocabinha e Itapanhaú foram acidificadas com HCl 6 mol L⁻¹ até pH inferior a 2 para que as substâncias húmicas pudessem ser adsorvidas pela resina DAX-8. Em seguida, foi montado um sistema com fluxo de 15 mL min⁻¹ descendente por gravidade. Após a saturação da resina, foi realizada a eluição do material retido com NaOH 0,1 mol L⁻¹, para a obtenção do extrato contendo as SHA o qual teve o seu pH ajustado para o pH da amostra original, entre 5,5 - 6,5 para os extratos do RS e 6,0 - 6,5 para os extratos do (RI). Os extratos foram mantidos sob refrigeração e em frascos âmbar, estas amostras foram nomeadas como substâncias húmicas aquáticas (SHA) e é constituída de ácido húmico e fúlvico.

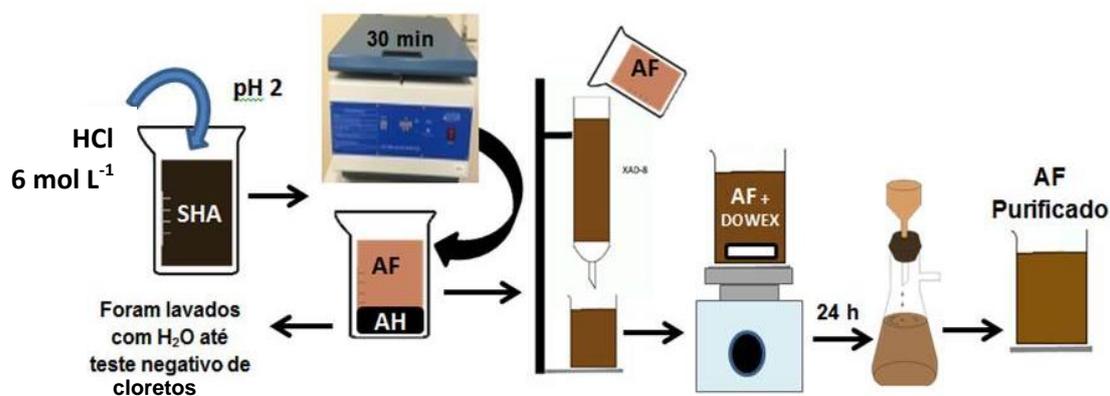


Fonte: Autoria Própria.

Figura 5- Ilustração da extração das substâncias húmicas das águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú.

4.3.1. Extração e purificação das frações (ácidos húmicos e fúlvicos) presentes no extrato das substâncias húmicas aquáticas

As SHA obtidas na etapa anterior foram mantidas sob refrigeração e em frascos âmbar. Parte desse extrato foi acidificado até pH 2 com HCl 6 mol L⁻¹ e em seguida, centrifugado por 30 minutos a 2500 rpm, em centrífuga de bancada, marca Nova, para a separação dos ácidos fúlvicos (AF) fração solúvel, dos ácidos húmicos (AH). Em seguida, o AF foi percolado novamente através da coluna preenchida com a resina DAX-8, para pré-concentração e eluído novamente com o NaOH 0,1 mol L⁻¹. O AF eluído foi colocado em contato com uma resina catiônica Dowex por 24 horas, para a remoção dos possíveis íons presentes ou incorporados durante o processo. Os AH foram lavados exaustivamente com água ultrapura (18,2 MΩ.cm, Millipore), até o teste negativo para cloretos utilizando nitrato de prata. A Figura 6 ilustra a etapa desse procedimento também recomendado pela IHSS. Posteriormente uma alíquota do AF e AH foi enviada para a análise do COD.



Fonte: Autoria Própria

Figura 6- Procedimento de extração e purificação dos ácidos fúlvicos e húmicos presentes nas substâncias húmicas aquáticas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú.

4.4. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas e suas frações

4.4.1. Composição Elementar

A composição elementar das amostras de SHA foi determinada em relação ao conteúdo de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio (CHNO). Os extratos foram secos a 40°C em estufa com renovação de ar e enviadas para análise no departamento de química da Universidade Federal de Sergipe. A análise elementar dos materiais foi realizada no equipamento LECO modelo CHN628 e os resultados foram tratados com CHN628 software versão 1,30. O equipamento operou com hélio (99,995%) e oxigênio (99,99%) com temperatura do forno e pós-queima a 950 e 850°C, respectivamente. O equipamento foi calibrado com padrão EDTA de (41,0% C, 5,5% H e 9,5% N) utilizando uma faixa de massa entre 10 - 200 mg. O padrão e as amostras foram analisados utilizando 100 mg para amostras em folha de estanho.

Os valores de C, H e N foram corrigidos pelo teor de cinzas, utilizando as informações obtidas pelos dados da análise termogravimétrica. O percentual de (% O) foi determinado conforme descrito na equação:

$$\% O = [100 \% - (\% C + \% H + \% N + \% S)] \quad \text{Equação 11}$$

As razões atômicas foram calculadas da seguinte forma: $C/H = \frac{\%C/12}{\%H/1}$;

$$C/N = \frac{\%C/12}{\%N/14} \text{ e } O/C = \frac{\%O/16}{\%C/12}.$$

4.4.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ¹³C)

As análises de RMN ¹³C foram realizadas no instituto de química da UNESP-Araraquara, em um espectrômetro da marca Bruker modelo Avance III 400 MHz WB operando na frequência de 100,61 MHz. As amostras secas a 40°C em estufa com renovação de ar, foram acondicionadas em um rotor de 4 mm e posteriormente analisadas nas seguintes condições experimentais: banda espectral para polarização cruzada de 20 kHz, pulso de preparação do próton de 3,8 μs, tempo de contato de 1 ms, tempo de aquisição de 12,8 ms e tempo de espera para

relaxação de 500 ms. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (GOVEIA et al., 2011)

4.4.3. Análise Térmica

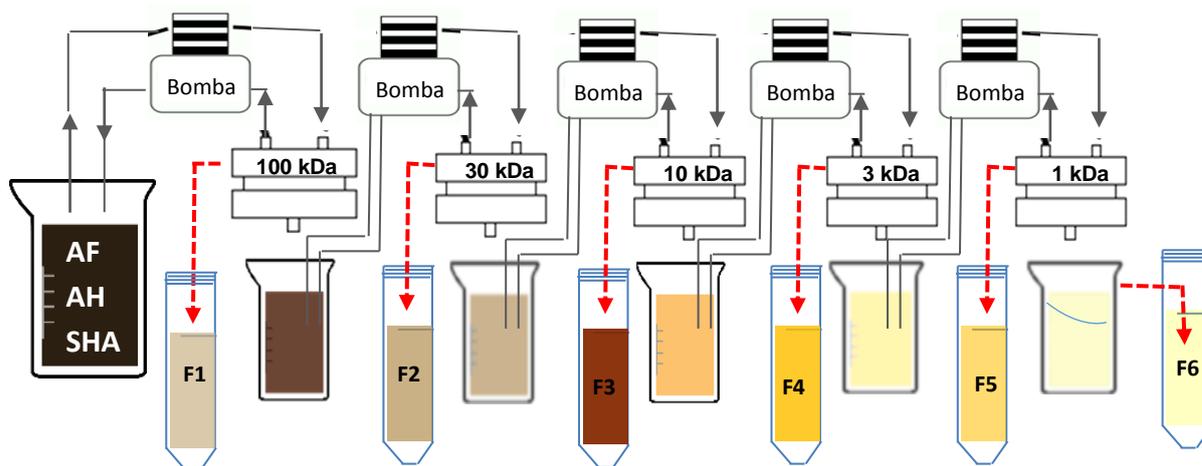
Para a análise termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA) 2 mg das amostras de SHA e AF previamente secas em estufa a 40 °C, foram analisadas sob atmosfera de ar, com aquecimento de 25 a 1000 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹. As curvas de TG e DTA foram registradas simultaneamente usando o TGA-DTA-DSC simultâneo da marca TA Instruments modelo Q600.

4.5. Fracionamento molecular das substâncias húmicas aquáticas e suas frações

O fracionamento molecular foi realizado nas amostras de SHA, AF e AH extraídas das amostras de água provenientes dos rios Sorocabinha e Itapanhaú coletadas nos períodos seco e chuvoso. A concentração de todas as amostras fracionadas foi fixada em 250 mg L⁻¹ de COD e o pH entre 5,5 e 6, para fins comparativos.

O procedimento consistiu na passagem de 150 mL das amostras, por meio do sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial (detalhado na seção 4.2.4) com membranas de celulose regenerada de tamanhos moleculares de 100, 30, 10, 3 e 1 kDa com 76 mm de diâmetro. As frações obtidas foram avolumadas quando necessário para 35 mL em tubo falcon com água ultrapura (18,2 MΩ.cm, Millipore). Todo procedimento foi realizado com a velocidade da bomba em 6 rpm, controle de pressão/vazão recirculação da amostra foi fixado em 2 mL min⁻¹ e separadamente, apesar da Figura 7 o mostrar em série.

Em cada fração foi determinada a concentração de carbono e de metais totais. Para a determinação do metal total nas frações obtidas, as amostras foram acidificadas com HNO₃ 1 mol L⁻¹ até pH entre 2 e 3.

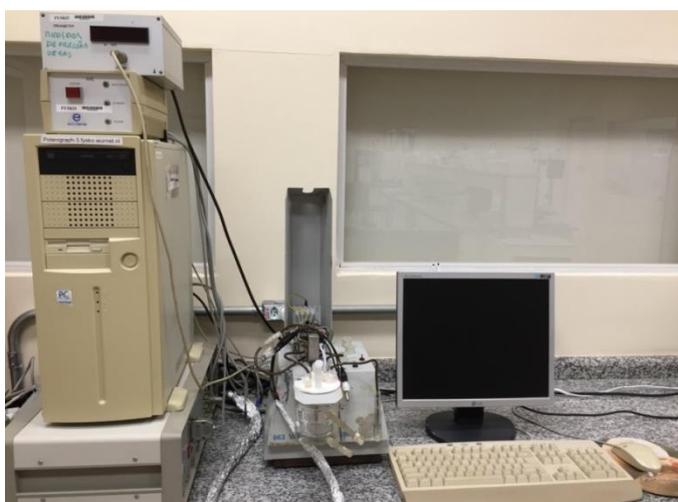


Fonte: Autoria Própria.

Figura 7- Esquema do fracionamento molecular dos extratos de SHA, AF e AH dos rios Itapanhá e Sorocabinha.

4.6. Experimentos Eletroquímicos

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um potenciostato Ecochemie da marca Autolab modelo PGSTAT10 acoplado ao Metrohm 663 VA Stand e a um computador utilizando o software GPES 4.8 (Eco Chemie) ilustrado na Figura 8, com uma configuração de três eletrodos: o eletrodo de filme fino de Hg depositado no eletrodo de carbono, um eletrodo auxiliar (carbono vítreo) e um eletrodo de referência (Ag/AgCl) da marca Metrohm.



Fonte: Autoria Própria.

Figura 8- Sistema utilizado para a realização dos experimentos eletroquímicos.

Todas as medidas de AGNES e SCP foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente (23 - 26°C). A solução foi purgada durante 15 min no início de cada experiência e a célula eletroquímica foi continuamente purgada com o gás nitrogênio durante as medidas. As amostras foram acondicionadas em copos descartáveis de poliestireno de 40 mL.

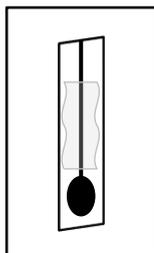
A calibração foi realizada diariamente antes, utilizando concentrações conhecidas de metais. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados a partir das curvas de calibrações usando a seguinte equação:

$$LX = kS_y/m \quad \text{Equação 12}$$

sendo, $k = 3$ para LD e $k = 10$ para LQ, S_y é a média do desvio padrão dos ruídos e m é a inclinação (slope) da curva de calibração.

4.6.1. Produção do eletrodo de trabalho

Neste trabalho foram utilizados eletrodos de carbono impressos/serigrafados (screen-printed) como eletrodo de trabalho (Figura 9), produzidos por Corine Parat na Universidade de Pau et des Pays de l'Adour, França da seguinte maneira: inicialmente, os eletrodos foram impressos em suporte de poliestireno para serigrafia (Sericol) usando tintas específicas e adequadas como as adquiridas em Acheson Colloids. Em seguida, foram secos à temperatura ambiente por 1 hora e deixados na estufa à 60°C por 1 hora, finalizando o processo de impressão. Após esta etapa, espalhou-se manualmente uma camada de isolante sobre as vias condutoras deixando disponível uma área circular de 9,6 mm (PARAT et al., 2011; MONTEIRO et al., 2016). Esse é o primeiro trabalho realizado no Brasil que utiliza este tipo de eletrodo, para estudos de Cd(II) e Pb(II) com as substâncias húmicas aquáticas.

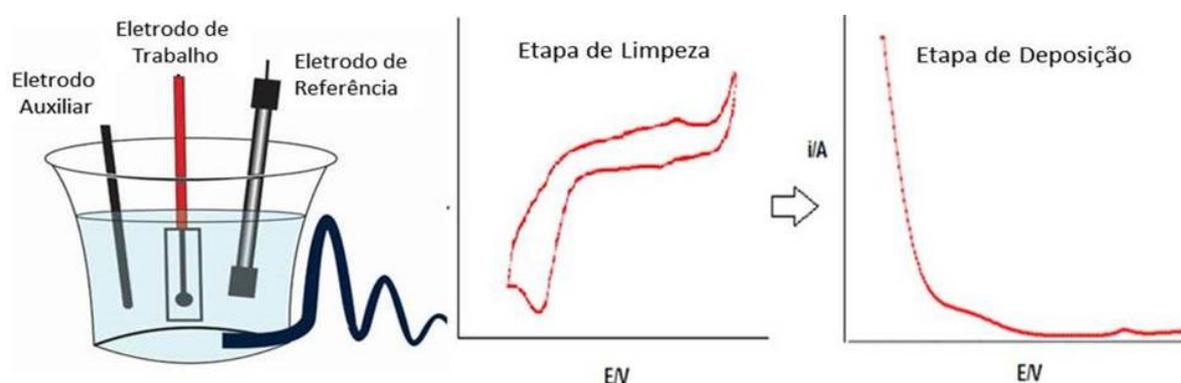


Fonte: Autoria Própria.

Figura 9- Exemplo do eletrodo de trabalho impressos/serigrafados (screen-printed) de carbono utilizado neste trabalho.

Para os experimentos com o Cd(II) e Pb(II), foi necessária a deposição diária do filme de Hg no eletrodo de carbono. Anterior a esta etapa, o eletrodo foi condicionado usando um pré-tratamento eletroquímico (Figura 10): cinquenta sucessivas varreduras de voltametria cíclica entre -0,8 e +0,8 V a $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ em uma solução de acetato de amônio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COOH}$ $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) em HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (MONTERROSO et al., 2004). O filme fino de Hg foi preparado ex-situ (fora da célula) em $0,24 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrato de Hg(II) em ácido nítrico $0,73 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 1,9) e depositado no eletrodo por eletrodeposição a -1,3 V por 700s usando uma velocidade de rotação do agitador de 1000 rpm.

Após cada dia de trabalho a carga associada com o Hg depositado (Q_{Hg}) foi determinada para avaliar o desenvolvimento do filme de mercúrio. Isto foi realizado por integração eletrônica da varredura linear de redissolução (do inglês, *linear sweep stripping*) do pico de Hg com uma taxa de varrimento $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ em 5 mmol L^{-1} de tiocianato de amônio (pH 3,4) usando uma etapa de redissolução de -0,15 V a +0,4 V (MONTEIRO et al., 2016).



Fonte: Autoria Própria.

Figura 10- Pré-tratamento eletroquímico do eletrodo impresso de carbono.

4.6.2. Desenvolvimento da metodologia eletroanalítica utilizando as técnicas SCP e AGNES para determinação de cádmio total e livre nas amostras de água dos rios Itapanhaú e Sorocabinha, que possibilite uma futura aplicação on-site

A metodologia proposta foi aplicada nas amostras de água dos rios Sorocabinha e Itapanhaú coletadas no período seco (novembro/2014) previamente filtradas em membranas de nitrato de celulose 0,45 μm para obtenção da fração dissolvida, nomeada de *in natura*. Para a realização dos experimentos foi necessário fazer quatro adições (spike) da solução padrão de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ $8,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com o objetivo de obter concentração total de $\text{Cd}(\text{II})$: 0,7; 1,5; 2,4 e $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ nas amostras após a filtração, uma vez que este íon metálico não estava presente originalmente nas amostras. Nessa amostra, foram aplicados três tipos de tratamentos:

- a) acidificada com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ antes de ser analisada por SCP para obter a concentração total do $\text{Cd}(\text{II})$ dissolvido: nomeada de *in natura* acidificada;
- b) analisada diretamente usando AGNES para obter a concentração de $\text{Cd}(\text{II})$ livre;
- c) ultrafiltrada em 1 kDa, e em seguida, acidificada com HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) para análise por SCP, para obter a concentração de metais, incluindo tanto o $\text{Cd}(\text{II})$ livre quanto o $\text{Cd}(\text{II})$ coordenado a ligantes com tamanho inferior a 1 kDa: nomeada de ultrafiltrada acidificada. Os resultados dessa etapa foram comparados com os obtidos por AGNES.

As amostras obtidas nos tratamentos (a) e (c) foram analisadas também por GF-AAS para a validação da metodologia.

4.6.2.1. Experimentos de cronopotenciometria de redissolução (SCP) em meio ácido (metal total nas amostras *in natura* e ultrafiltradas acidificadas)

Inicialmente foram realizados testes de otimização do método de SCP para a obtenção do potencial de deposição (E_d), tempo de deposição (t_d) e da corrente (I_S) $2,5 \times 10^{-6}$ A, de maneira a obter as condições que permitissem melhores valores de LD e mitigação da influência do oxigênio presente nas amostras. Esses testes foram realizados em 20 mL de solução de NaNO_3 com uma concentração conhecida de Cd(II) e variando-se o (E_d), o (t_d) e (I_S) aplicados.

Com as melhores condições encontradas: $E_d = -0,78$ V(vs Ag/AgCl), $t_d = 45$ s, e $I_S = 2,5 \times 10^{-6}$ A, aplicada até que o potencial de $-0,30$ V fosse alcançado, velocidade de rotação 1000 rpm (somente durante a etapa de deposição), as medidas de SCP foram realizadas em 20 mL das amostras acidificadas após a adição do Cd(II) . A acidificação da amostra foi necessária nas medidas com SCP, pois o objetivo era determinar o Cd total presente nas amostras.

O sinal da SCP é o tempo de transição característico τ^* , o qual é dado por:

$$\tau^* = \frac{I_d^* t_d}{I_S} = \frac{\alpha c_{M,T}^* t_d}{I_S} \quad \text{Equação 13}$$

onde I_d^* o limite da corrente de difusão é proporcional a concentração do metal no interior da solução $c_{M,T}^*$ e α a constante de proporcionalidade.

4.6.2.2. Experimentos de AGNES: determinação do Cd(II) livre nas amostras *in natura*

Para as medidas de AGNES foi necessário fixar o pH desejado previamente, usando o tampão MES. De acordo com Soares (1999) o tampão MES não se liga ao Cd(II) . No caso da amostra de água do rio Sorocabinha manteve-se a força iônica natural, mas para a amostra do rio Itapanhaú, a força iônica foi fixada em $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ acrescentando NaNO_3 e monitorando a condutividade da solução. Isto é necessário, uma vez que uma força iônica suficientemente elevada ($\geq 10 \text{ mmol L}^{-1}$) e um sistema bem tamponado são obrigatórios para a obtenção de resultados precisos em AGNES (AGUILAR et al., 2013).

A concentração dos íons metálicos livres foi determinada pelo método de AGNES de acordo com o procedimento desenvolvido por Parat e colaboradores (2011), onde a quantificação do metal amalgamado na etapa de equilíbrio é feita usando uma medida cronopotenciométrica. Após a escolha do E_d , foram realizadas medidas de AGNES variando os t_d (30, 45, 60, 90, 120, 240, 300 e 600 segundos) até encontrar o tempo, a partir do qual, a concentração de Cd(II) permaneceu constante e conseqüentemente já atingiu o equilíbrio termodinâmico, para obtenção de LD da ordem de 1 a 5 nMol L⁻¹.

Nesta otimização o sinal de AGNES é a carga (Q) correspondente ao metal amalgamado no eletrodo de mercúrio que é dado por:

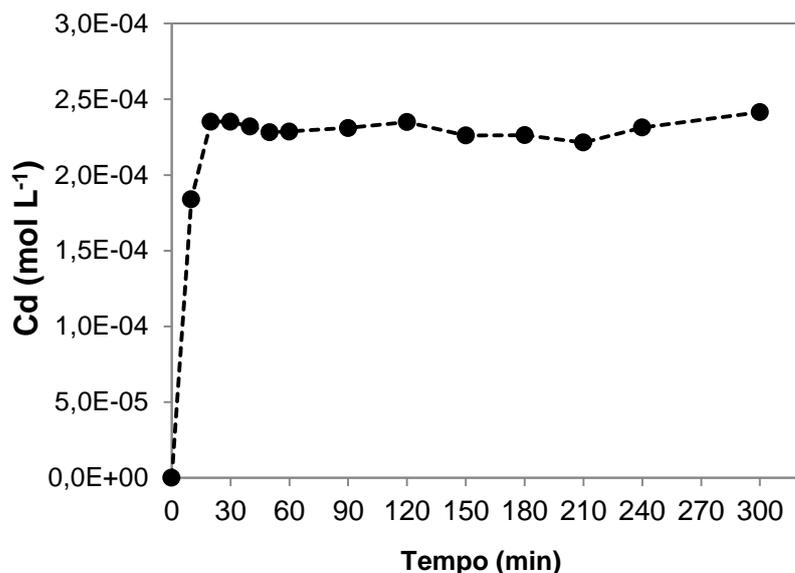
$$Q = \tau^* I_S = h c_{M,T}^* \quad \text{Equação 14}$$

onde τ^* é o tempo de reoxidação, I_S é a corrente de reoxidação aplicada na fase de redissolução, h é uma constante de proporcionalidade e $c_{M,T}^*$ é a concentração do metal livre no interior da solução.

4.6.2.3. Experimentos de ultrafiltração com membranas de 1kDa para a validação da metodologia proposta

Inicialmente foram realizados testes cinéticos para determinação do tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio dos íons Cd(II) com as amostras de SHA, AF e AH extraídas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú, no sistema de UFT com membranas de 1 kDa. Para esses experimentos, foram preparados 200 mL de soluções de SHA, AF e AH 100,0 mg L⁻¹ de COD, em seguida foi feito um spike de Cd(II) nas soluções (a partir de solução intermediária de 2,4x10⁻³ mol L⁻¹ de Cd(II)) para obter concentração final de 1,4x10⁻⁴ mol L⁻¹ de Cd(II). Os testes foram realizados no pH natural das amostras. Nesse experimento, as soluções preparadas ficaram em agitação constante. Alíquotas de 2 mL da amostra ultrafiltrada foram coletadas antes do spike e após 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 minutos após a adição do Cd(II). Depois de coletadas as amostras foram analisadas por ICP OES.

A Figura 11 representativa de todas as amostras de ambos os rios, indicou que é necessário aguardar 20 minutos para o estabelecimento do equilíbrio.



Fonte: Autoria própria.

Figura 11- Resultado do teste cinético para obtenção do tempo de equilíbrio representativo dos experimentos realizados com as amostras de SHA, AF e AH ($100,0 \text{ mg L}^{-1}$) nas condições de pH e força iônica natural das águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú.

Após esta etapa, o sistema de UFT devidamente limpo, foi ambientado por 15 minutos com um litro das amostras de águas *in natura* dos rios estudados, com o pH e força iônica natural sob agitação constante para condicionamento da membrana. Em seguida, uma alíquota de 25 mL foi retirada da amostra *in natura* e iniciado o procedimento de ultrafiltração, recolhendo-se a primeira alíquota de ultrafiltrado (25 mL).

Após essa primeira alíquota, foram realizadas quatro adições da solução padrão de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ $8,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com o objetivo de obter concentração total de Cd(II) de 0,7; 1,5; 2,4 e $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ na amostra *in natura*. Após cada adição, o pH da amostra *in natura* foi ajustado para o valor original usando NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ devido à pequena variação induzida pelo ácido presente na solução padrão de Cd(II) e em seguida, foram recolhidas alíquotas de 25 mL amostra *in natura* e após os 20 minutos do tempo de equilíbrio foram ultrafiltrados 25 mL de amostra. Todas as adições de Cd(II) foram calculadas levando-se em consideração a variação do volume na amostra *in natura*.

A quantificação do Cd(II) nas alíquotas das amostras *in natura* e ultrafiltradas (UF) após o spike foi realizada por SCP (em 20 mL das amostras após acidificação

com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e por GF-AAS (5mL das amostras sem acidificar) para validação dos resultados de SCP.

4.6.2.4. Determinação do Cd(II) por GF-AAS

O Cd(II) foi determinado em 5 mL das amostras *in natura* e ultrafiltradas (UF) após o spike, para a validação dos resultados obtidos por SCP. As condições de análise para a determinação de Cd(II) nas amostras de águas naturais por GF-AAS foram obtidas após a otimização do programa de aquecimento do tubo de grafite, utilizando soluções analíticas contendo $4,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de Cd(II) (preparado após diluição da solução padrão $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em HNO_3 2% (v/v) na presença dos modificadores químicos ($5 \mu\text{L Pd}(\text{NO}_3)_2 + 3 \mu\text{L Mg}(\text{NO}_3)_2$).

A avaliação do comportamento térmico do Cd ($\lambda = 228,8 \text{ nm}$) permitiu selecionar, respectivamente, 700 e 1600 °C como temperaturas ideais de pirólise e atomização, respectivamente (Figura 12). A curva de calibração para Cd ($0,9; 1,8; 4,4; 7,1$ e $8,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) foi realizada nas mesmas condições (preparada após diluição da solução padrão $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Quando necessário, foram realizadas diluições adequadas das amostras usando água ultrapura (18,2 M Ω .cm, Millipore). Os LD e quantificação LQ obtidos foram $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ($1,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente.

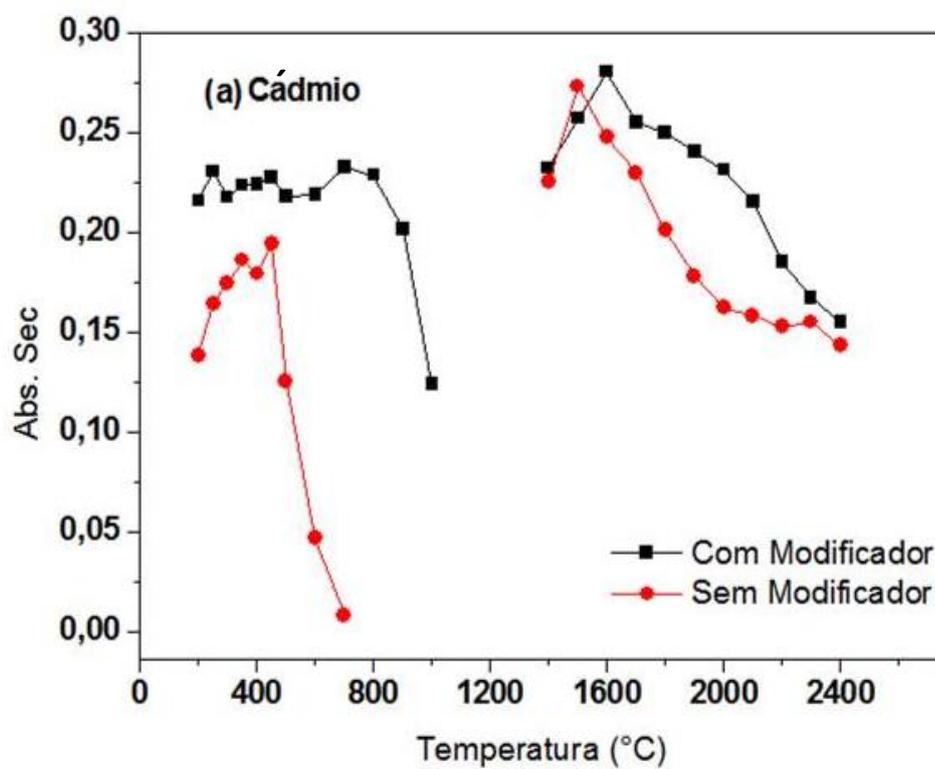
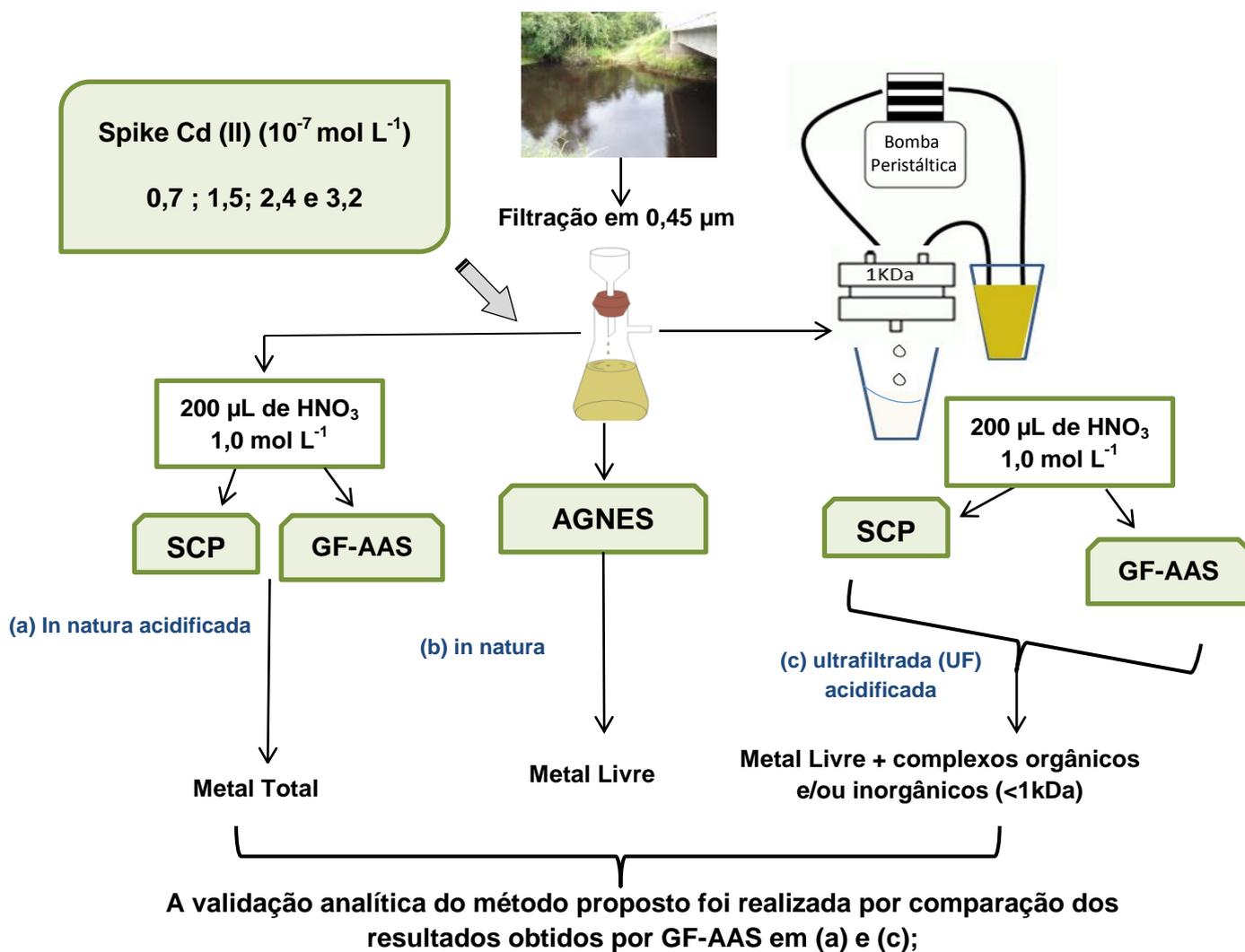


Figura 12- Curva de temperatura de pirólise (curva à esquerda) e de atomização (curva à direita) para solução aquosa de Cd(II) $4,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 13 resume a metodologia proposta neste trabalho publicado na revista *Talanta*. Esses métodos foram desenvolvidos e testados com a finalidade de uma futura aplicação *on-site*.



Fonte: adaptada de MONTEIRO et al., 2016.

Figura 13- Descrição da metodologia de especiação de Cd(II) em águas naturais por AGNES, UF-SCP e UF-GF-AAS proposta por este trabalho.

4.6.3. Estudo das interações do Cd(II) e Pb(II) com os ácidos fúlvicos e húmicos utilizando AGNES

Os experimentos de Cd(II) e Pb(II) com as amostras dos AH e AF dos rios Sorocabinha e Itapanhaú (período seco e chuvoso) foram efetuados em dias diferentes em duplicata ou triplicata e consistem em duas etapas: calibração e titulação das amostras detalhadas a seguir:

1) Calibração

As calibrações diárias de AGNES foram realizadas utilizando 20 mL de uma solução de NaNO₃ com força iônica de 0,01 mol L⁻¹ (parâmetro mantido constante durante todo o experimento).

A primeira leitura de AGNES feita nesta solução foi nomeada de branco, após a leitura do branco, foram adicionados consecutivamente 35, 37, 150 e 150 µL de uma solução de Cd(II) 3,0x10⁻⁶ mol L⁻¹, resultando na curva de calibração com concentrações finais de Cd(II) (5,0x10⁻⁹ e 1,0; 3,0 e 5,0x10⁻⁸ mol L⁻¹). As calibrações do Pb(II) foram construídas com adições de 23, 23 e 91 µL de uma solução de Pb 4,8x10⁻⁶ e 32 µL de uma solução de Pb 4,8x10⁻⁵ mol L⁻¹, resultando nas concentrações finais de Pb(II) (5,0x10⁻⁹, 1,0x10⁻⁸, 3,0x10⁻⁸ e 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹).

2) Titulações das amostras com Cd(II) e Pb(II)

Os ligantes (ácidos húmicos e fúlvicos) foram adicionados diretamente à solução presente na célula eletroquímica após o final da curva calibração, as concentrações adicionadas dos ligantes serão exibidas na Tabela 4. Após a adição do ligante a solução foi tamponada de acordo com o pH desejado.

Os experimentos foram realizados em três pH diferentes para cada metal. A escolha do pH, está relacionada ao pH natural das amostras de água coletada nos rios Sorocabinha e Itapanhaú. Para os experimentos com Cd(II), realizados em pH 6,0; 7,0 e 8,0. Os valores de pH foram ajustados utilizando o tampão MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico). Nos experimentos realizados com o Pb(II) em pH 5,0; 5,5 e 6,5 o ajuste do pH foi realizando usando o tampão MES (ácido 2-N- morfolinoetanosulfônico). Além dos tampões soluções de NaOH (0,1 mol L⁻¹) e HCl (0,1 mol L⁻¹) também foram utilizadas para o ajuste do pH quando necessário.

Feito o ajuste do pH, foram realizadas medidas de AGNES para cada adição de metal Cd ($5,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $1,5 \times 10^{-7}$, $2,0 \times 10^{-7}$, $3,0 \times 10^{-7}$, $6,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $2,0 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e Pb ($1,0 \times 10^{-7}$, $1,5 \times 10^{-7}$, $2,0 \times 10^{-7}$, $3,0 \times 10^{-7}$, $4,5 \times 10^{-7}$, $6,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $1,5 \times 10^{-6}$, $2,0 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Os parâmetros eletroquímicos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4- Informações sobre a concentração dos ligantes utilizados nos experimentos de e AGNES em função do pH.

Metals		Concentração dos Ligantes (mg L ⁻¹)
Cd ²⁺		
pH	6,0	17,0 ± 0,5
	7,0	
	8,0	
Pb ²⁺		4,5 ± 0,7
pH	5,0	
	5,5	
	6,5	

Tabela 5- Parâmetros eletroquímicos utilizados nos experimentos para Cd(II) e Pb(II).

Parâmetros Eletroquímicos	Cd ²⁺	Pb ²⁺
Potencial de deposição E _d	-0,72	-0,615
Tempo de deposição (s) duas etapas	45/90	45/90
Corrente I _s (A)	$2,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$
Tempo de medida (s)	20,0	20,0
Agitação (rpm)	1000	1000

4.7. Descarte de resíduos

O tratamento, segregação e destinação dos resíduos gerados nesse trabalho obedeceram ao estabelecido nas diretrizes básicas para o gerenciamento de resíduos na UNESP, que está disponível em <http://www.unesp.br/prad/imagens/manual-residuos.pdf>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das amostras de águas “*in natura*” dos rios Sorocabinha e Itapanhaú

Os resultados dos parâmetros utilizados para avaliação da qualidade da água e os dados do COD e absorvância em 254 e 436 nm (Tabela 6) permitiram um maior entendimento das principais diferenças das águas dos rios Sorocabinha (RS) e Itapanhaú (RI), coletadas em março/2014 (coleta 1), período de ocorrências de chuva em ambos os ambientes, denominado período chuvoso, e em novembro/2014 (coleta 2) que abrangeu um período excepcionalmente muito seco.

Tabela 6- Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras coletadas no rio Itapanhaú e Sorocabinha em dois períodos de amostragem no ano de 2014.

Parâmetros	Rio Sorocabinha		Rio Itapanhaú		
	Coleta 1		Coleta 2		
	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	
pH	5,3 ± 0,1	6,7 ± 0,03	6,1 ± 0,04	6,3 ± 0,03	
Condutividade	μS cm ⁻¹	124,0 ± 0,1	1043,0 ± 0,8	109,0 ± 0,2	189,0 ± 0,2
Nitrogênio Total	mg N L ⁻¹	3,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,22	0,9 ± 0,1
Fósforo Total	mg P L ⁻¹	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,03	0,5 ± 0,1
Cloreto	mg Cl ⁻¹ L ⁻¹	13,3 ± 0,5	30,3 ± 0,5	11,8 ± 0,39	12,8 ± 0,3
Turbidez	NTU	2,7 ± 0,2	6,0 ± 0,1	5,9 ± 0,2	3,7 ± 0,1
OD	mg O L ⁻¹	3,2 ± 0,2	1,4 ± 0,03	2,7 ± 0,17	1,8 ± 0,1
DBO ₅	mg L ⁻¹	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,05	1,2 ± 0,1
Cor	u.C	500,0 ± 0,1	280,3 ± 0,1	246,8 ± 0,19	270,8 ± 0,1
COD	mg L ⁻¹	52,5 ± 0,5	18,9 ± 0,1	16,2 ± 0,12	16,0 ± 0,1
λ 254	nm	1,0	0,8	0,8	0,8
λ 436	nm	0,06	0,1	0,1	0,07
A ₂₅₄ /A ₄₃₆		15,6	11,9	11,7	11,3

Os rios apresentaram valores de pH semelhantes que variaram de 5,3 a 6,6 no rio Sorocabinha e de 6,1 a 6,3 no rio Itapanhaú, o valor mais ácido encontrado no RS pode está associado a uma maior concentração de COD encontrado na coleta1. A condutividade elevada ($>100 \mu\text{S cm}^{-1}$) em ambos os rios permite inferir que esses ambientes apresentam muitos íons dissolvidos na água, o que pode ser comprovado com os resultados de metais (Tabela 6). O valor atípico ($1043,0 \mu\text{S cm}^{-1}$) encontrado no RS além da presença de metais pode está associado à presença de sais oriundos da água do mar (GOVEIA; ROCHA, 2011), inclusive nesse período a concentração do íon Cl^- dobrou chegando a $30,3 \text{ mg L}^{-1}$.

A presença de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) pode estar associada tanto às fontes naturais (origem alóctone, dissolução dos solos e decomposição da matéria orgânica) quanto antropogênicas (do uso de fertilizantes, despejos domésticos e industriais) e podem ser transportados para os rios em razão da drenagem das águas em áreas agrícolas e urbanas. Os maiores valores ($3,3 \text{ mg L}^{-1}$ para o RS e $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ para o RI) das concentrações de NT foram encontrados no período chuvoso, sugerindo que as chuvas, são responsáveis pelo aporte de NT de origem difusa (urbana e/ou agrícola) nesses ambientes, entretanto, todos os valores de NT estão de acordo com o especificado pelo CONAMA 357, até $3,7 \text{ mg L}^{-1}$. Já os de fósforo apresentam-se acima dos valores máximos permitidos pelo CONAMA, que estabelece o limiar de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$.

Observa-se também pela Tabela 6 que os rios possuem elevada concentração de COD. Os valores encontrados para o RS foram bem diferentes em relação aos dois períodos estudados, uma vez que no período chuvoso (coleta1) esse rio exibiu um valor de COD de $52,5 \text{ mg L}^{-1}$. Já os valores de COD do RI permaneceram praticamente constantes, porém levemente maior também na coleta 1. Os maiores valores encontrados nessa coleta podem está relacionado à contribuição da lixiviação dos solos e plantas para os rios através das chuvas, e no RS, pode ser um indicativo da contribuição de fontes antropogênicas (lançamentos de esgotos urbanos, por exemplo) para o acréscimo do valor de COD nesse período.

A Tabela 7 mostra uma comparação dos resultados de COD dos rios Sorocabinha e Itapanhaú encontrados neste trabalho com outros rios brasileiros e de outros países. Estas diferenças na quantidade de carbono em diversos ambientes dependem das condições locais, como por exemplo, contribuição

antropogênica, sazonalidade, vegetação, degradação microbiana, clima e diferenças na geomorfologia (JAFFÉ et al., 2004; GOVEIA et al., 2011; YLÖSTALO et al., 2016).

Tabela 7- Comparação das médias de carbono orgânico dissolvido encontradas neste trabalho com outros rios nacionais e internacionais.

Rio	Média COD (mg L⁻¹)	Referência
Rios no Brasil		
Rio Piauí (Sergipe)	6,0	Costa et al., 2011
Rio Niquim (Alagoas)	6,0	Botero et al., 2014
Rio Negro (Amazonas)	12,0	Júnior et al., 2001
Rio Ribeira de Iguape (São Paulo)	37,0	Goveia et al., 2011
Rios de outros países		
Rio Howjin (Taiwan)	8,3	Shiua; Leea, 2017
Rio Sagami (Japão)	1,1	Kikuchi et al., 2017
Rio Xiaoqing (China)	19,3	Jiang et al., 2017
Yeongsan River (Gwangju, Korea)	4,9	Chon et al., 2017
Este trabalho		
Rio Sorocabinha	35,7	
Rio Itapanhaú	16,0	

O parâmetro COD representa uma medida quantitativa da matéria orgânica total dissolvida na água. Ambientes com altas concentrações de carbono geralmente ocasionam baixos valores (1,4 a 3,2 mg L⁻¹) de oxigênio dissolvido (OD), como os encontrados neste trabalho (Tabela 6) nos períodos estudados, como possível consequência do aumento da atividade microbiana durante o processo de degradação da matéria orgânica.

Outra característica peculiar desses ambientes é a coloração amarela, a qual pode está associada à presença das substâncias húmicas. As medidas de UV-Vis têm sido utilizados como método semi-quantitativo para caracterizar a matéria orgânica presente em águas naturais. A absorvância em 254 nm, por exemplo, é típico de substâncias ricas em grupos aromáticos, tipo substâncias húmicas. E a

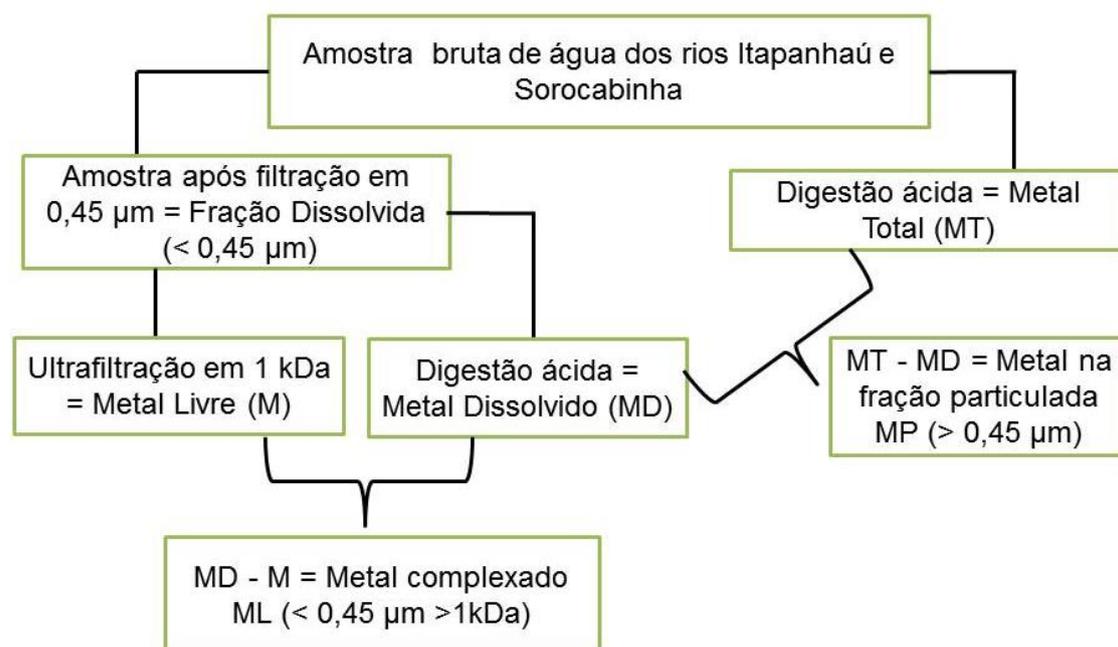
razão (A_{254}/A_{436}) é um indicador da sua origem (JAFFÉ et al., 2004; MONTEIRO et al., 2016).

Os valores dessa razão encontrados para o RS no período chuvoso foi de 15,6 e 11,9, respectivamente, no período seco. E 11,7 e 11,3 para o RI nos períodos chuvoso e seco, respectivamente (Tabela 6). Os resultados similares das amostras sugerem que a origem da MOD é possivelmente de fontes semelhantes.

Os valores no intervalo de 4,4 e 11,3 medidos nas águas da Bacia do rio Orinoco por Battin (1998) foram associados à matéria orgânica que possuem maior predominância de carbonos aromáticos, típicos de substâncias como tanino e/ou húmicas provenientes da degradação das plantas e solos, ou seja, alóctone (JAFFÉ et al., 2004). Logo, pode-se inferir que a fonte da MOD dos ambos os rios estudados é semelhante e predominantemente alóctone, porém no período chuvoso, além da degradação das plantas e solos, fontes antropogênicas (esgotos urbanos e/ou agrícolas) podem ter contribuído para o acréscimo dos valores de COD e da razão (A_{254}/A_{436}) encontrados para o rio Sorocabinha, nesse período.

5.2. Influência da matéria orgânica natural na especiação dos metais originalmente presentes nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú

Os resultados das concentrações de metal total (MT), metal dissolvido (MD), metal particulado (MP), “metal livre” (M) e metal complexado (ML) encontrados nos rios Sorocabinha e Itapanhaú após detecção por ICP OES estão exibidos nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. O fluxograma apresentado na Figura 14 exibe a definição operacional das frações dos metais adotadas neste trabalho.



Fonte: Autoria própria.

Figura 14- Definição operacional das frações do metal total, dissolvido e livre.

Inicialmente foi aplicada aos dados pré-processados usando autoescalamento, a análise de agrupamento hierárquico, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA), que permite a visualização de dados multidimensionais em duas ou três dimensões e, ainda, a determinação de grupos de elementos (ou de amostras) com comportamentos semelhantes (HORTELLANI et al., 2008). Foi construída uma matriz (14x6) de dados usando as concentrações dos Al, Cu, Co, Cr, Fe, Mn e Zn determinados nas amostras de água coletadas nos meses de março e novembro/2014 como linhas, e as concentrações de metal total (MT), metal dissolvido (MD) e metal livre (M) para os Rios Sorocabinha (RS) e Itapanhaú (RI) como colunas.

Para o cálculo das distâncias interpontos foi usada a medida Euclidiana e para ligação (a geração dos grupos) foi aplicado o método Ward's. O gráfico resultante que ilustra os agrupamentos formados é chamado de dendograma (HORTELLANI et al., 2008).

A Figura 15 mostra o dendograma obtido entre as variáveis das concentrações do MT, MD e M. Pode-se observar a formação de dois grupos com dissimilaridade de 45% entre as concentrações dos íons metálicos dos dois rios. No entanto, percebe-se que há um agrupamento entre as formas de metal

dissolvido e livre em ambos ambientes. Para o metal total verificou-se uma associação entre as similaridades de 90% entre o grupo formado pelas descrições MT-RS, MD-RS e MD-RI e 55% entre M-RS, M-RI e MT-RS, talvez relacionadas à maior variância nas concentrações dos metais entre os meses de março e novembro/2014.

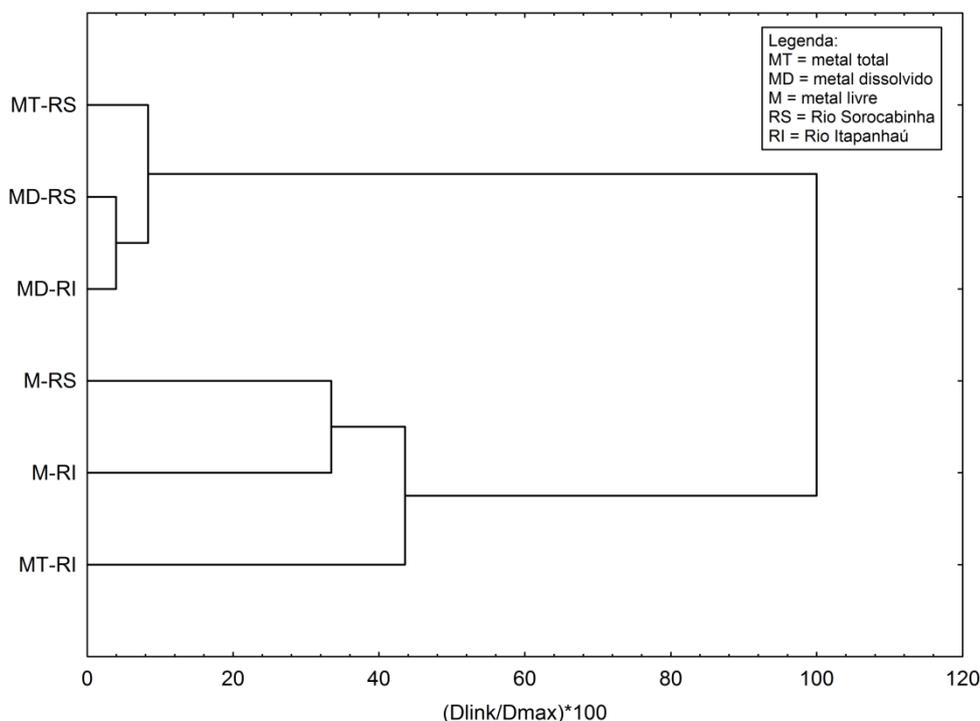


Figura 15- Dendrograma: cálculo da distância Euclidiana e método de ligação Ward's para as variáveis: metal total, metal dissolvido e metal livre em águas coletadas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú, Estado de São Paulo.

A Figura 16 ilustra o dendrograma entre os metais e as duas campanhas. Pode-se verificar uma similaridade para todos os metais em ambas as ocasiões de amostragem. Porém, na distância escalonada em 66%, pode estabelecer uma similaridade entre os três grupos dos metais. O primeiro, formado pelos metais Fe e Al, que são elementos provenientes principalmente do intemperismo dos rios, apresentaram em geral as maiores concentrações de MT (Tabelas 8 e 9) durante todo o período em estudo para ambos os rios, inclusive acima dos valores máximos (100,0 e 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) permitidos pela resolução nº 357/2005 do CONAMA para águas doces de Classe 2.

A predominância do manganês no segundo grupo, com aproximadamente 65% de dissimilaridade, difere dos demais grupos possivelmente devido ao Mn está predominantemente presente nesses rios em sua forma livre e/ou hidratada ou ainda complexado a compostos inorgânicos com tamanho <1kDa. Por fim, o grupo 3, formado pelos elementos Co, Cu, Cr e Zn, representam os microelementos pois estes apresentaram concentrações a nível de traços ($\mu\text{g L}^{-1}$) em relação ao máximo estabelecido pela Resolução nº 357/2005 do CONAMA para águas doces de Classe 2 (ver tabelas 8 e 9), apresentou-se em dois subgrupos, relacionando-se Cr, Co e Cu com concentrações obtidas como uma ordem de grandeza menor do que o Zn, provavelmente pelo o último ser um dos elementos mais utilizado em materiais do nosso dia a dia.

Os íons metálicos Cd(II) e Pb(II) estiveram ausentes nas tanto nas amostras de água do rio Sorocabinha quanto no Itapanhaú nos dois períodos estudados.

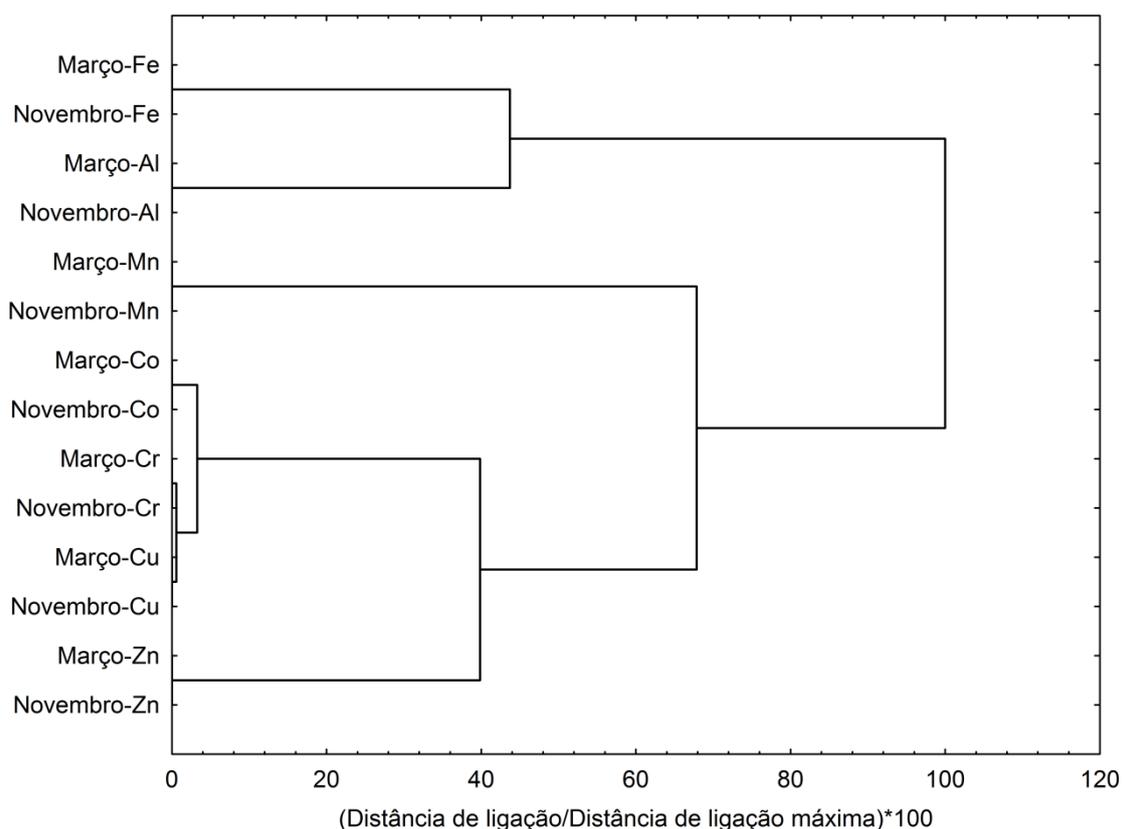


Figura 16- Dendrograma: cálculo da distância Euclidiana e método de ligação Ward's para as amostras de água em relação aos meses de março (período chuvoso) e novembro (período seco) de 2014 coletadas nos rios Sorocabinha e Itapanhaú, Estado de São Paulo.

Tabela 8- Resultados de MT, MD, MP, ML, MC, determinados nas águas do rio Sorocabinha coletadas na coleta 1 (março/2014) e coleta 2 (novembro/2014).

Metais	Rio Sorocabinha (março/2014)					Rio Sorocabinha (novembro/2014)					Valor Máximo CONAMA 357
	MT	MP	MD	M	ML	MT	MP	MD	M	ML	$\mu\text{g L}^{-1}$
Al	1015,3 ± 23,1	332,2 ± 14,4	683,1 ± 9,0	136,4 ± 0,001	546,6	75,9 ± 20,7	35,9 ± 6,0	40,0 ± 3,1	27,9 ± 0,7	12,1	100,0
Co	0,5 ± 0,10	0,09 ± 0,02	0,42 ± 0,1	<0,3	0,4	<1,1	x	<1,5	<0,3	x	50,0
Cr	0,8 ± 0,22	0,34 ± 0,1	0,45 ± 0,1	<0,2	0,4	0,8 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	<0,2	0,3	50,0
Cu	0,9 ± 0,06	0,02 ± 0,001	0,9 ± 0,2	0,2 ± 0,02	0,7	5,9 ± 0,9	3,5 ± 0,8	2,4 ± 0,1	<0,2	2,38	20,0
Fe	1348,4 ± 18,1	131,2 ± 6,4	1217,2 ± 9,8	118,3 ± 0,02	1098,9	711,3 ± 18,1	369,7 ± 8,3	341,6 ± 9,8	137,3 ± 0,4	204,3	300,0
Mn	77,7 ± 1,5	5,1 ± 0,3	72,6 ± 0,7	59,6 ± 0,8	13,0	107,5 ± 0,9	5,5 ± 0,19	102,0 ± 0,7	99,3 ± 0,2	2,7	100,0
Zn	18,2 ± 0,03	8,7 ± 0,6	9,5 ± 2,1	<2,6	9,5	15,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3	13,0 ± 0,1	<2,6	13,0	180,0

x = metal ausente na fração.

< = os valores após os símbolos correspondem aos valores do LD obtidos por ICP OES exibidos na Tabela 3 (seção 4.2.4).

Tabela 9- Resultados de MT, MD, MP, ML, MC, determinados nas águas do rio Itapanhaú coletadas no período chuvoso (março/2014) e no período seco (novembro/2014).

Metais	Rio Itapanhaú (março/2014)					Rio Itapanhaú (novembro/2014)					Valores Máximos CONAMA 357 µg L ⁻¹
	MT	MP µg L ⁻¹	MD	M	ML	MT	MP µg L ⁻¹	MD	M	ML	
Al	327,8 ± 13,1	144,5 ± 5,1	183,2 ± 8,1	40,1 ± 0,01	143,1	132,8 ± 8,3	0,2 ± 0,1	132,6 ± 1,6	11,1 ± 0,001	121,6	100,0
Co	<1,1	x	<1,5	<0,3	x	<1,1	x	<1,5	<0,3	x	50,0
Cr	<0,7	x	<0,5	<0,2	x	<0,7	x	<0,5	<0,2	x	50,0
Cu	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,05	0,46 ± 0,1	<0,2	0,5	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	<0,9	<0,2	x	20,0
Fe	1012,1 ± 7,8	593,9 ± 3,0	418,2 ± 4,8	19,9 ± 0,1	398,3	1532,1 ± 7,8	787,2 ± 5,8	744,9 ± 13,6	24,7 ± 2,1	720,2	300,0
Mn	37,9 ± 0,03	9,1 ± 0,1	9,1 ± 0,1	<0,1	9,1	84,8 ± 0,03	13,8 ± 0,4	71,0 ± 0,7	55,0 ± 0,5	16,0	100,0
Zn	11,3 ± 4,1	3,9 ± 1,0	7,4 ± 2,0	<2,6	7,4	3,1 ± 0,09	1,6 ± 0,1	1,52 ± 0,2	<2,6	1,5	180,0

x = metal ausente na fração.

< = os valores após os símbolos correspondem aos valores do LD obtidos por ICP OES exibidos na Tabela 3 (seção 4.2.4).

As Figuras 17 e 18 exibem a distribuição dos íons metálicos na fração particulada, complexados aos compostos coloidais com tamanho molecular $< 0,45 \mu\text{m}$ e $>1\text{kDa}$, como por exemplo as SHA presentes na matéria orgânica de origem natural ou antropogênica (M-SHA), e ainda distribuídos na fração ultrafiltrada, onde podem estar apresentar-se em suas formas livres (M) e/ou hidratadas ou ainda formando complexos com compostos de tamanhos menores que 1kDa .

Analisando os gráficos de distribuição dos íons metálicos nas frações particulado, complexado e livre é possível observar que há variação no comportamento dos metais quantificados, tanto espacial quanto temporal. Essas variações entre os rios estudados podem estar associadas à origem da matéria orgânica dissolvida (MOD), a qual pode afetar tanto a natureza química (quantidade de ligantes disponíveis) quanto a sua concentração (ZHANG et al., 2013).

A Figura 17 mostra a distribuição dos íons metálicos quantificados no rio Sorocabinha. É possível observar que no período chuvoso houve uma maior tendência dos metais, Al (67%), Co (82%), Cr (56%), Cu (98%), Fe (90%), Mn (93%) e Zn (51%) apresentaram-se na fração dissolvida (ML+ M) e com exceção do Mn (77 % na fração livre - M), preferencialmente complexados aos ligantes de elevada massa molecular, tipo substâncias húmicas aquáticas presente na MOD. Além do Mn, apenas Al, Fe e Cu foram encontrados em sua forma livre ou complexados a ligantes $< 1\text{kDa}$.

Comparando-se essa distribuição com a do período seco, o Al, Fe e Mn que apresentaram um decréscimo na porcentagem do metal complexado e conseqüentemente um aumento da porcentagem de suas espécies livres (13 - 37% para o Al, 9 – 19% para o Fe e 77 – 99%) enquanto que os microelementos como Co, Cr e Cu apresentaram uma maior afinidade com o material particulado. Esse comportamento pode estar relacionado ao decréscimo do COD, variando de $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ no período chuvoso para $19,0 \text{ mg L}^{-1}$ no período seco.

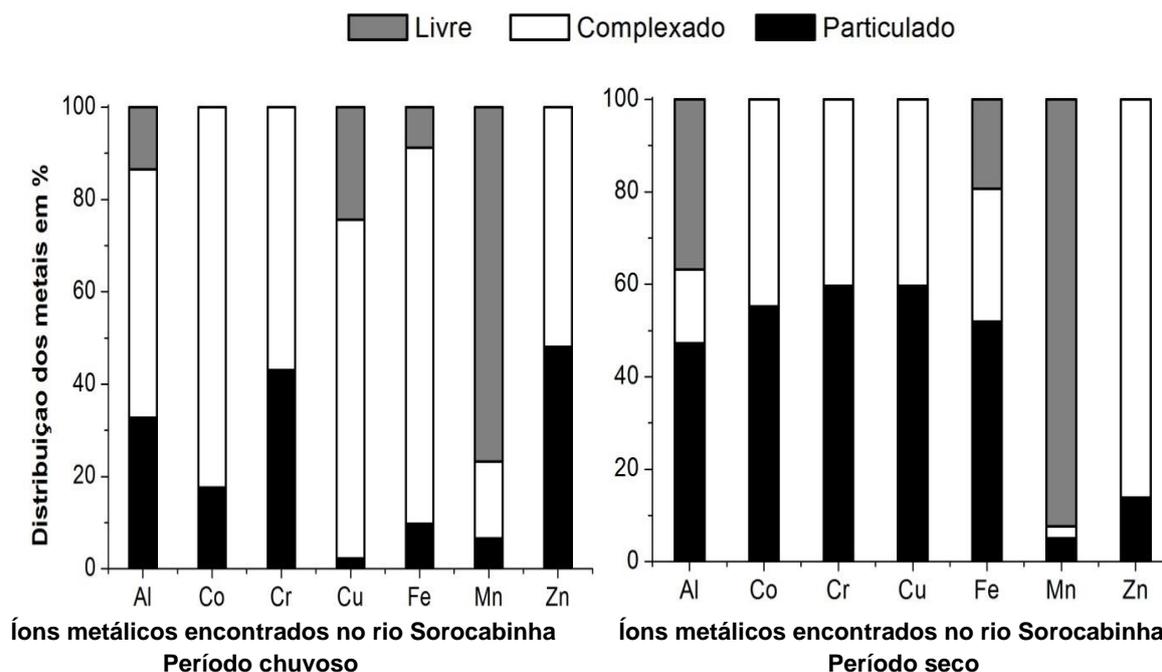


Figura 17- Distribuição dos íons metálicos nas frações livres, complexada e particulada encontrados no rio Sorocabinha no período chuvoso e seco.

Em relação aos resultados exibidos na Figura 18, para o rio Itapanhaú, é perceptível uma maior dissimilaridade na distribuição dos metais Al, Cu e Mn em função da sazonalidade. No período chuvoso o Al apresentou cerca de 44% complexado ao material particulado, enquanto no seco 100% foi encontrado na fração dissolvida, porém aproximadamente 91% complexado. Já o Cu apresentou-se ligado, preferencialmente ao material particulado no período seco. O Mn metal mais biodisponível no período seco foi encontrado predominantemente livre. Esses resultados sugerem que o material particulado lixiviado para os rios pela chuva ou ainda a ressuspensão desses metais para a solução apresentam maior influência na sua especiação. Não foi observada uma relação entre esse comportamento e a concentração do COD, pois os dois períodos apresentaram concentrações similares, 16,2 mg L⁻¹ no período chuvoso e 15,9 mg L⁻¹ no período seco.

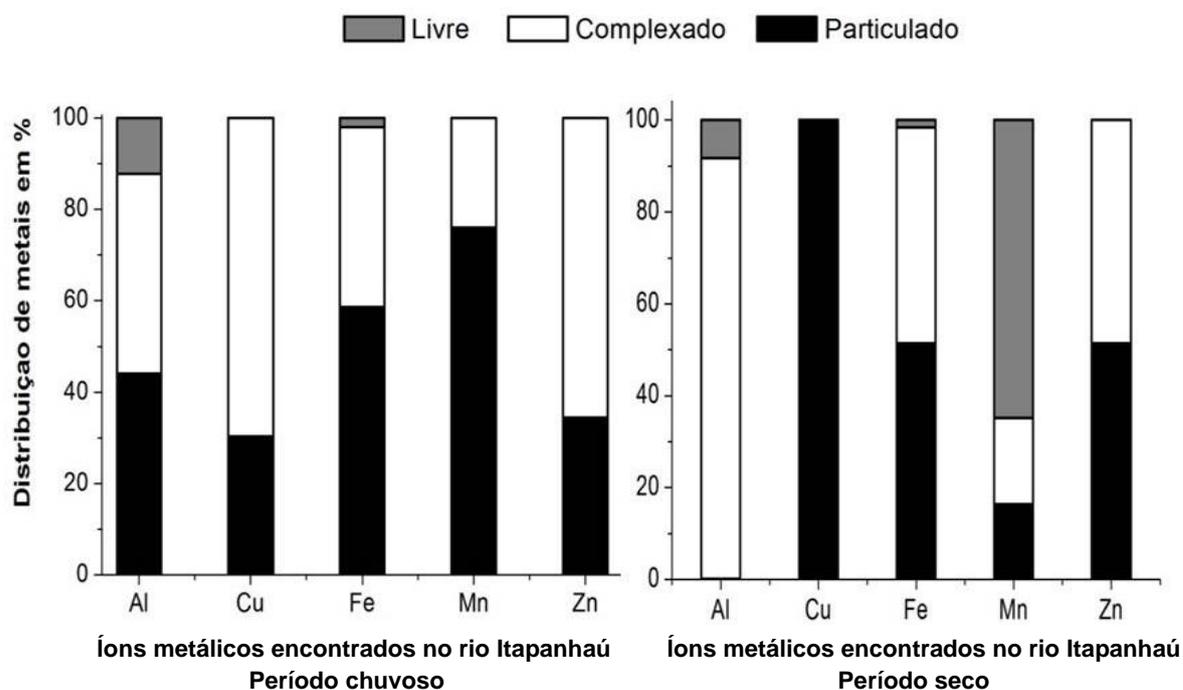


Figura 18- Distribuição dos íons metálicos nas frações livre, complexada e particulada encontrados no rio Itapanhaú no período chuvoso e seco.

Os resultados deste trabalho assemelham-se aos encontrados por Zhang e colaboradores (2013), e implicam em sugerir que compostos com tamanho entre ($1\text{kDa} < \text{ML} < 0,45\ \mu\text{m}$) que formam a fração de metais complexados ou chamada de fração coloidal por aqueles autores, desempenham um papel importante no transporte de muitos metais em águas doces. Por exemplo, essa fração coloidal tem influenciado na especiação do Fe e Al, através da formação de Fe-hidróxidos, argilas ou complexos com compostos orgânicos. Já em relação ao Mn, tantos os resultados encontrados por Zhang e colaboradores quanto neste trabalho, sugerem que os colóides orgânicos ou inorgânicos, ou seja, os compostos de alta massa molecular, não exercem um controle significativo sobre o transporte de Mn nas águas doces, uma vez que o Mn apresenta-se preferencialmente na sua forma livre, por exemplo, Mn(II), forma frequentemente encontrada nesses ambientes.

Por fim, é importante ressaltar que a toxicidade da maioria dos metais está associada à sua forma livre, ou seja, os íons metálicos livres são mais tóxicos que os complexados. Dessa forma, quanto mais fortemente ligado a matéria orgânica ou ao material particulado, menos biodisponível e menor é a toxicidade do íon metálico frente aos organismos aquáticos (ELBISHLAWI; JAFFE, 2015).

Neste trabalho foram encontrados os íons Al, Fe, Mn e Cu em sua forma livre, o que reforça a importância do monitoramento dessas espécies nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú. Apesar das concentrações encontradas, serem relativamente baixas, estes elementos não se degradam no ambiente e quando incorporados por microrganismos podem acumular e alcançar níveis mais altos da cadeia trófica e exercer sua toxicidade.

5.3. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas e suas frações

Os resultados obtidos através da análise elementar (livre de cinzas) por meio das razões atômicas H/C, C/N e O/C (Tabela 10) e da integração dos espectros de RMN ^{13}C (Tabela 11 e Figura 19) permitiram uma avaliação geral da composição estrutural (tipo de carbono), bem como a estimativa do grau de aromaticidade e humificação das substâncias húmicas extraídas dos rios Sorocabinha e Itapanhaú.

A razão H/C está relacionada com o grau de aromaticidade das SHA, logo, valores elevados dessa razão indicam maior número de carbonos alifáticos que insaturados. Em relação à razão O/C, acredita-se que esta é um indicador do teor de hidratos de carbono (carboidratos) e ácidos carboxílicos de substâncias húmicas. Já a relação C/N é um indicador das fontes de substâncias húmicas em sistemas naturais (ROSA, 2004; ROMÃO et al., 2005).

A Figura 19 ilustra os perfis dos espectros de RMN obtidos. Os espectros apresentam características semelhantes, com regiões/picos bem definidos nas regiões 1, 2, 3 e 5. A região 1 (0–65 ppm) é referente aos deslocamentos de carbonos alifáticos, por exemplo, alcanos; a região 2 (65–110 ppm) corresponde aos grupamentos de carbonos alifáticos substituídos por oxigênio (C-O hidroxilas, éteres). Na região 3 (110–150 ppm) e na 4 (150–160 ppm) são observados deslocamentos de carbonos aromáticos e aromáticos ligados a oxigênio (fenólicos e carboxilas), respectivamente. Já as regiões 5 e 6 entre 160-190 e 190-220 ppm são referentes aos deslocamentos de grupamentos carboxílicos e carbonílicos (C=O de cetonas, ésteres e amidas), respectivamente (ROMÃO et al., 2007; ROCHA; ROSA, 2003).

Tabela 10- Resultados da composição elementar livre de cinzas das SHA e AF extraídos das amostras de água coletadas nos rios Itapanhaú (SHA RI) e (AF RI) e Sorocabinha (SHA RS) e (AF RS) nos dois períodos estudados.

Coleta 1 (período seco - março/2014)				
Parâmetros	SHA RS - 01	AF RS - 01	SHA RI - 01	AF RI - 01
C (%)	45,69	40,11	35,13	30,30
H (%)	6,53	5,12	6,0	4,10
N (%)	1,30	1,02	1,10	0,70
O (%)	46,5	53,7	57,85	64,9
Razão C/H	0,58	0,65	0,49	0,62
Razão C/O	1,31	1,00	0,81	0,62
Razão C/N	41,10	51,88	38,31	47,32

Coleta 2 (período chuvoso – novembro/2014)				
	SHA RS - 02	AF RS - 02	SHA RI - 02	AF RI - 02
C (%)	33,95	46,63	35,02	48,1
H (%)	4,68	4,46	5,7	4,7
N (%)	1,00	1,09	1,0	1,1
O (%)	60,4	47,8	58,31	46,1
Razão C/H	0,60	0,87	0,51	0,85
Razão C/O	0,75	1,30	0,80	1,39
Razão C/N	39,49	49,86	40,90	51,60

Tabela 11- Valores de porcentagens relativas de diferentes grupos de carbono presentes nas amostras de SHA e ácidos fúlvicos extraídos dos rios Itapanhaú (SHA RI) e (AF RI) e Sorocabinha (SHA RS) e (AF RS) em março/2014 em novembro/2014.

Deslocamentos químico (ppm)/ Atribuições (%)						
Amostras	0-65 R1	65-110 R2	110-150 R3	150-160 R4	160-190 R5	190-220 R6
	C- alifáticos	C-O Hidroxila	C- aromático	C-aromático- O	C-O Carboxílicos	C-O Cetonas
SHA RS-01	45,65	24,64	13,04	1,45	13,04	2,17
SHA RS-02	43,69	20,39	20,39	2,91	9,71	2,91
SHA RI-01	58,06	18,71	12,26	0,65	9,68	0,65
SHA RI-02	46,60	21,36	17,48	2,91	9,71	1,94
AF RS-01	39,18	19,59	22,68	4,12	11,34	3,09
AF RS-02	44,09	16,13	20,43	3,23	11,83	4,30
AF RI-02	40,63	16,67	21,88	3,13	13,54	4,17

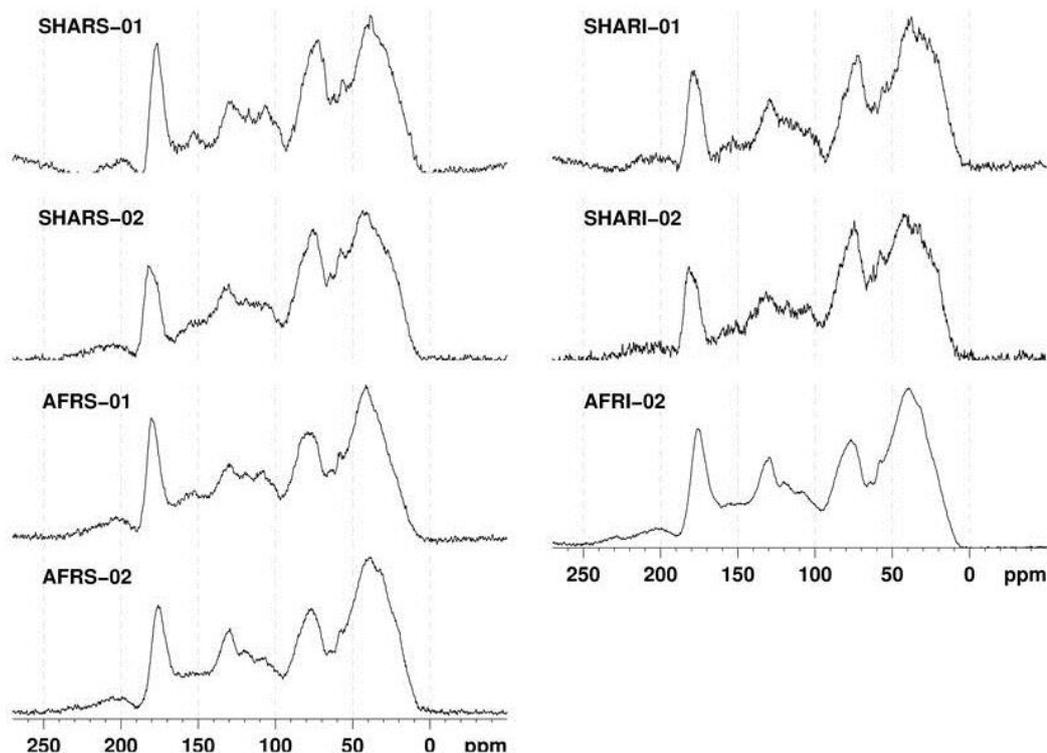


Figura 19- Espectros de RMN para as amostras de SHA e AF dos rios Itapanhaú e Sorocabinha nos períodos estudados.

De maneira geral, há uma maior predominância de estruturas alifáticas, grupos na composição de todas as amostras, pelo fato de apresentarem maiores percentuais e grupamentos majoritários situados nas regiões 1 e 2 do espectro RMN de ^{13}C . E a variação da composição dos demais grupos de carbono ocorreu em função da sazonalidade e do procedimento de extração das amostras.

Comparando a fração do ácido fúlvico (AF) com o seu respectivo extrato de SHA observou-se que as amostras dos AF obtidos nos dois períodos apresentam uma estrutura “levemente” mais aromática devido ao acréscimo das porcentagens de deslocamentos (Tabela 11) mais pronunciados nas regiões associadas aos carbonos aromáticos, R3 e R4 do espectro e por apresentar maiores valores da razão C/H (Tabela 10). Estes resultados sugerem que para comparações com outros trabalhos deve ser levado em consideração os processos de obtenção, uma vez que a depender deste, as substâncias húmicas, podem apresentar composições e estruturas diferentes e conseqüentemente suas interações com

espécies metálicas e/ou outros poluentes, podem ser diferentes. Neste trabalho optamos em usar os ácidos fúlvicos purificados.

Em função da origem (local de coleta), tanto as amostras SHA quanto as de AF extraídas do RS-01 apresentaram maiores valores das razões C/H (indicativo de aromaticidade), C/O (um indicador do teor de hidratos de carbono (carboidratos) e ácidos carboxílicos presentes nas substâncias húmicas) e C/N (relacionada às fontes e degradação de SHA) em detrimento das amostras SHA e AF do RI-01 (STEVENSON, 1994; LU et al., 2000; GIOVANELA et al., 2010; GOVEIA et al., 2011). Estes resultados são indicadores de que as amostras (SHA e AF RS-01) são constituídas com maiores teor de cadeias carbônicas insaturadas e aromáticas ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) e apresentam um maior grau de humificação, devido à diminuição da acidez e teores de carboidratos e aminoácidos/proteínas (GIOVANELA et al., 2010; GOVEIA et al., 2011). Já as amostras provenientes da coleta 2 são mais similares. Os dados de RMN corroboram com essa interpretação.

Em relação à influência da sazonalidade, as amostras (SHA RI-02 e SHA RS-02) são levemente mais aromáticas e ricas em compostos carbonílicos do que as amostras coletadas no período chuvoso (SHA RI-01; SHA RS-01), chegou-se a essa conclusão devido ao aumento nos teores dos carbonos aromáticos e carbonílicos R3, R4 e R6, respectivamente, em detrimento dos demais carbonos encontrados nas regiões, R1, R2 e R5 do espectro. Já as amostras AF RI-01 e 02 e AF RS-01 e 02, apresentaram composições semelhantes nos períodos estudados.

Outra observação à respeito desses resultados é em relação à razão C/N a qual pode ser um indicador das fontes e grau de decomposição das substâncias húmicas em ambientes naturais. Sendo assim, as amostras dos RS e RI apresentaram similaridade, pois ambas, apresentaram elevados valores (>20) dessa razão e segundo Giovanela e colaboradores (2010), esses valores sugerem que a vegetação local (plantas terrestres) é responsável pelo processo de decomposição da matéria orgânica, essas substâncias podem apresentar predominância de material original - lignocelulósico em detrimento de material proteico.

Essas diferenças na distribuição e quantidade de grupos funcionais presentes nas amostras estudadas podem estar relacionadas ao processo de decomposição da matéria orgânica natural/original, o qual tende a levar a transformações que dependem do tipo de substrato original, presença e

características de micro-organismo, além de outros fatores ambientais tais como: intensidade de radiação solar, temperatura, oxigênio, pH etc (OLIVEIRA et al., 2007; ROCHA et al., 2003).

A análise de variância (ANOVA) de fator único foi aplicada ao conjunto dos dados obtidos através dos espectros de RMN ^{13}C apresentados na Tabela 11, a fim de verificar se no intervalo de 95 % de confiança, as amostras, apresentariam diferença significativa, entre elas, tanto em relação ao processo de extração do material, quanto em relação à variação sazonal. Os resultados da ANOVA revelaram que apesar das amostras apresentarem algumas variações em suas composições estruturais, não há diferença significativa entre elas, uma vez que os resultados de $F_{\text{calculado}}$ (0,022 – 0,90) foram sempre menores que o $F_{\text{tabelado/crítico}}$ (~4,96), além disso, os valores de p encontrados ($p > 0,05$) também indicam que não há diferença significativa entre o conjunto de dados.

5.4. Fracionamento molecular das substâncias húmicas aquáticas e suas frações

Na caracterização da MON e do extrato das SHA e suas frações (AF e AH) é muito importante conhecer a distribuição de tamanhos moleculares, tanto para perceber se após os processos de extração e purificação, as frações resultantes ainda são representantes da composição original da amostra *in natura*, ou se esses procedimentos ocasionariam comportamentos diferentes de distribuições de COD, quanto para investigar se os íons metálicos originalmente presentes, têm interações preferenciais com alguma das frações.

As Figuras 20, 21, 22 e 23 e a Tabela 12 exibem a distribuição das frações com diferentes tamanhos moleculares em função das respectivas porcentagens de carbono nas amostras extraídas (SHA, AH e AF) dos rios estudados. Para as amostras das SHA e AF e *in natura* foram obtidas seis frações, e para os AH apenas 5, assim descritas: $F_1 > 100$ kDa; $30 < F_2 < 100$ kDa; $10 < F_3 < 30$ kDa; $3 < F_4 < 10$ kDa; $1 < F_5 < 3$ kDa (para SHA e AF) ou $F_5 < 3$ (para AH) e $F_6 < 1$ kDa.

Tabela 12- Resultados das distribuições do COD (%massa) das amostras extraídas dos rios Itapanhaú (SHA, AF, AH RI) e Sorocabinha (SHA, AF, AH RI) em março (01) e novembro (02) /2014.

Amostras		Amostra	
	Distribuição COD (% massa)		Distribuição COD (% massa)
SHA RS - 01	F3>F5>F2>F1>F4>F6	SHA RS - 02	F4>F5>F3>F1>F6>F2
AF RS - 01	F4>F5>F3>F1>F6=F2	AF RS - 02	F5>F4>F3>F6>F1>F2
SHA RI - 01	F3>F4>F1=F5>F2>F6	SHA RI - 02	F5>F4>F3>F2>F1>F6
AF RI - 01	F3>F4>F1>F5>F2>F1	AF RI - 02	F5>F4>F3>F1>F2=F6
		AH RS-02	F1>F4>F3>F2>F5
		AH RI-02	F1>F3>F2>F4>F5

Os primeiros resultados exibidos correspondem à comparação do fracionamento das amostras em função do processo de extração da amostra. Observando as distribuições do COD para as amostras provenientes do rio Itapanhaú (Figura 20) nota-se que a amostra *in natura* é especialmente rica em COD entre 10 e 1 kDa com 78% do total em duas frações (F4 a 28% e F5 a 50%). Em seguida observa-se que o extrato (SHA) é semelhante ao AF, quando comparados à amostra *in natura*, pois ambos apresentam-se mais distribuídos nas frações maiores (F1, F2 e F3), são semelhantes nas frações (F4 e F5) e bem menores nas inferiores a 1kDa (F6). Esse comportamento indica que nesse caso, os AF são majoritários no extrato do rio Itapanhaú, uma vez que a amostra SHA é a soma do AF e AH. Por outro lado, o AH aparece predominantemente nas frações maiores F1 com 50%, F2 com 17% e F3 com 21% e 11% nas menores (F4 e F5), estando ausente da F6, como era esperado.

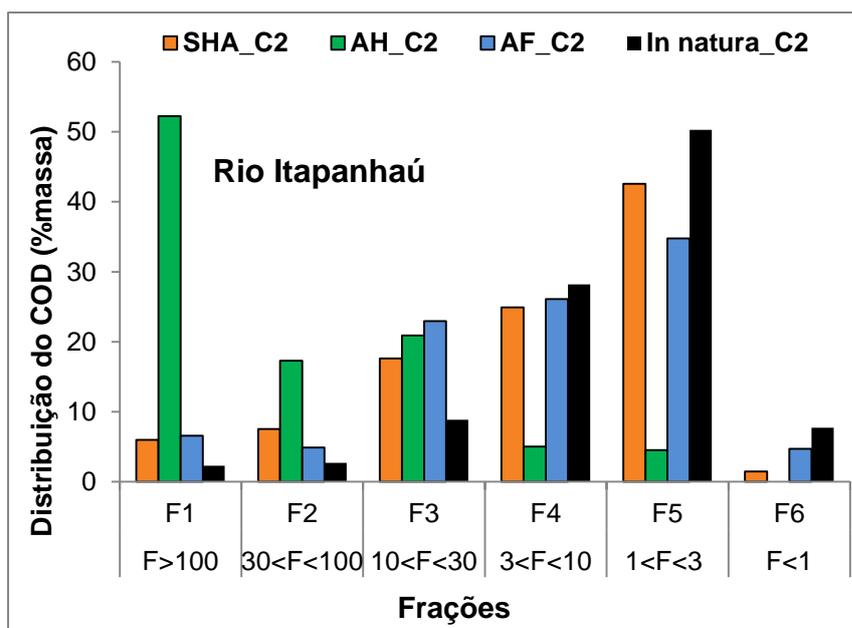


Figura 20- Distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Itapanhaú na coleta 2 comparando-as com a amostra *in natura* (novembro/2014).

A Figura 21 exibe a distribuição do COD para as amostras do rio Sorocabinha. O COD da amostra *in natura* do rio Sorocabinha (Figura 21), apresentou-se mais distribuído do que o do rio Itapanhaú, com 85% do material entre 30 e 1kDa (F3 = 30%, F4 = 22% e F5 = 33%). Comparando a distribuição das SHA, AF e AH extraídos com os resultados da amostra *in natura*, foi observado que o extrato de SHA apresenta uma maior predominância da F4 (compostos entre 3 e 10kDa), em detrimento da amostra *in natura*, cuja predominância, é da F3 e F5, em relação as demais frações, F1, F2 e F6, apresentaram distribuição semelhantes. Os AF seguem majoritariamente o SHA salvo que são maiores na F5 e menores na F4 onde se aproximam bastante da amostra *in natura*. Em relação aos AH Relativamente aos AH a fração majoritária continua a ser a F1 com 50% como no Itapanhaú, mas curiosamente o resto do material (41%) aparece na F4.

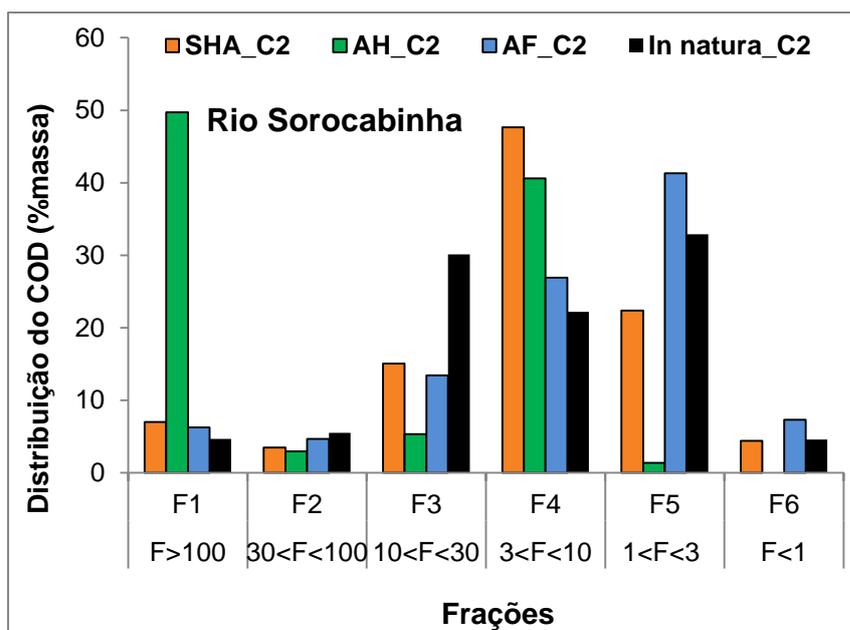


Figura 21- Distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Sorocabinha na coleta 2 comparando-as com a amostra in natura (novembro/2014).

A Figura 22 exibe uma completa comparação entre as três amostras (SHA, AF e AH) extraídas dos dois rios estudados. Observando as distribuições do carbono nas diferentes frações para o extrato (SHA) e ácidos fúlvicos (AF) nota-se que há uma distribuição similar, mesmo estas amostras sendo provenientes de rios diferentes.

As amostras de SHA extraídas do RS apresenta maior predominância de compostos de maiores tamanhos, F4 em detrimento das do RI que tem maior porcentagem dos compostos menores F5. Em relação aos AF a maior composição é dos grupos de menores tamanhos (F5) e para o RS há ainda uma porcentagem maior de compostos (<1kDa). Os ácidos húmicos presentes nesses rios tem uma maior abundância dos compostos de alta massa molecular (F>100 kDa), como previsto pela literatura, isso pode ocorrer devido a facilidade desses compostos em formar agregados. O que difere essas amostras é que os AH do RS também apresentam uma quantidade expressiva de compostos entre 3 e 10 kDa.

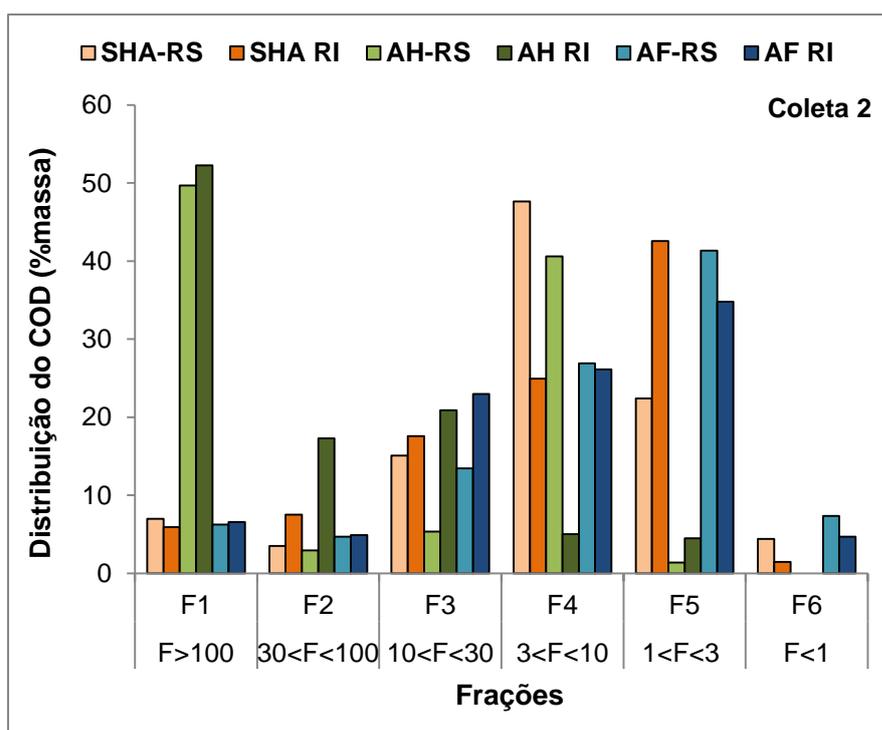


Figura 22- Comparação da distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Sorocabinha e Itapanhá (novembro/2014).

Em relação à sazonalidade, Figura 23, as amostras do RI seguem o mesmo comportamento nos dois períodos, pois, observou-se uma maior predominância dos compostos de tamanho ($1 < F_5 < 3$ kDa) no período seco. Já as amostras do RS apresentaram comportamentos diferentes, as SHA RS-02 apresentaram um acréscimo na fração F4 em relação à SHA RS-01, enquanto as AF RS-02 apresentaram acréscimo na fração F5. Estes resultados sugerem que as amostras que apresentaram maior porcentagem nas frações menores estejam em estágios mais avançados de decomposição, corroborando com o observado pelos resultados de RMN.

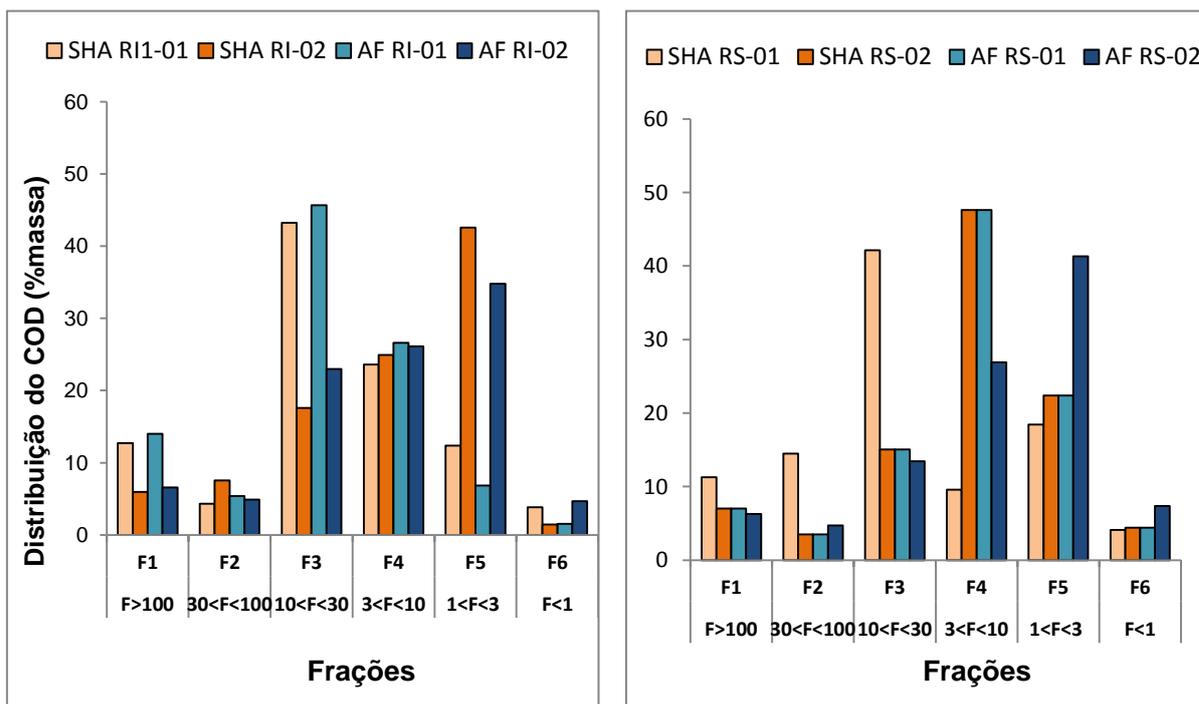


Figura 23- Distribuição de COD nas seis frações obtidas após fracionamento molecular das amostras parcialmente purificadas SHA, AH e AF purificados das amostras do rio Itapanhaú (a) e Sorocabinha (b) da coleta 2 (novembro/2014).

A Figura 24 ilustra a distribuição dos íons metálicos presentes originalmente nas frações de AH e AF extraídos dos rios Sorocabinha e Itapanhaú no período seco (coleta 2). De maneira geral, os resultados evidenciam as diferenças das afinidades dos metais (Cu, Zn, Fe e Al) em função do material extraído e suas origens.

No ácido fúlvico obtido de ambos os rios, Figura 24a e 24c, nota-se que a distribuição dos íons metálicos presentes nos AF apresentou o mesmo padrão de distribuição do COD e estiveram preferencialmente distribuídos nas frações de menor tamanho (F4 e F5), frações que apresentaram as maiores porcentagens do COD. Isso pode ser um indicativo que nesse caso a concentração do COD governa a distribuição desses metais nas amostras do AF. Esse padrão não foi observado para a distribuição no AH, no qual estiveram mais distribuídos nas frações (F1 e F3), apesar da F3 apresentar uma pequena porcentagem do COD, indicando que nesse caso, outros grupos químicos tenham contribuído para a complexação desses íons nessa fração.

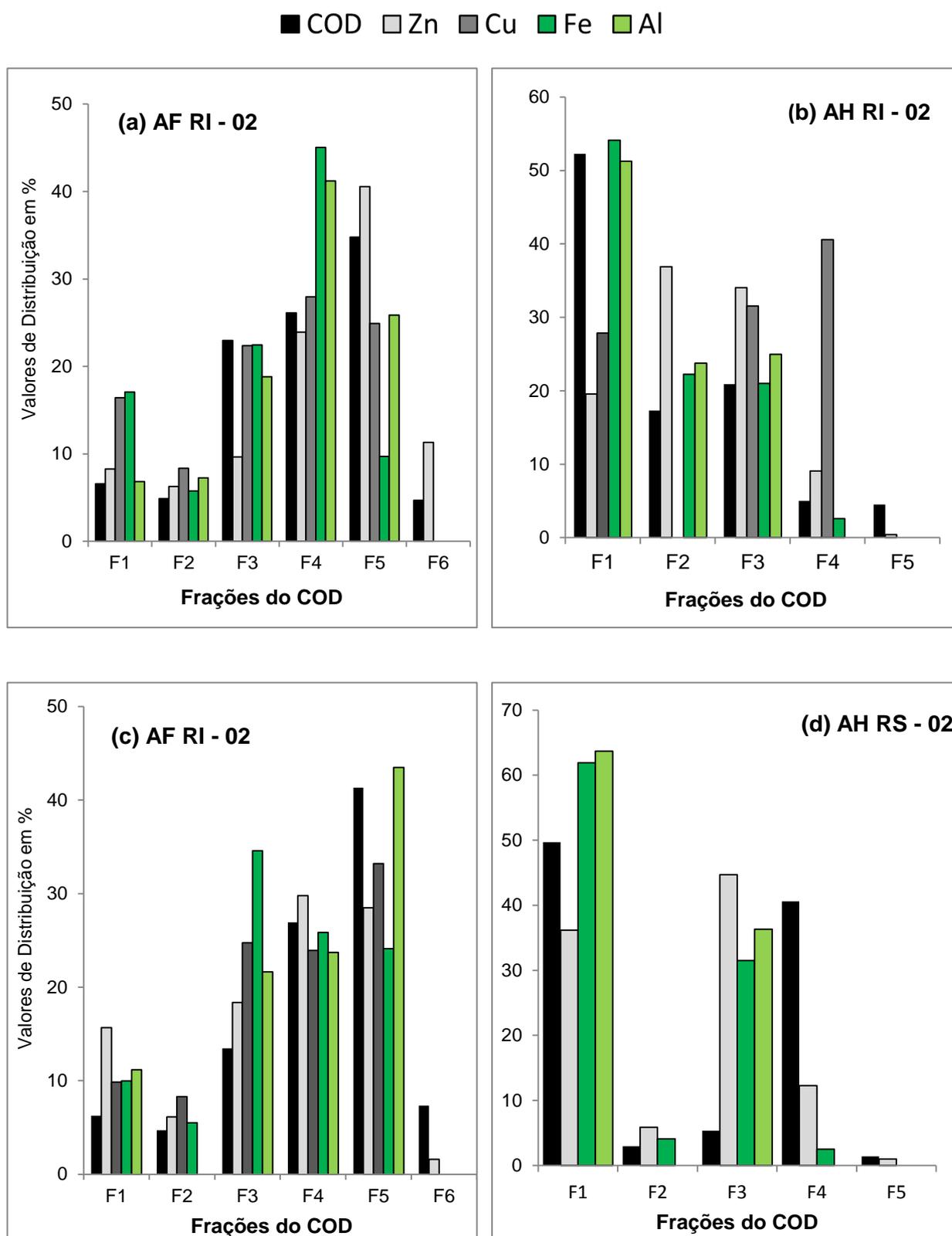


Figura 24- Distribuição dos metais Zn, Cu, Fe, Al presentes originalmente nas frações do COD das amostras de AF e AH dos rios Sorocabinha (a e b) e Itapanhaú (c e d) extraídos da coleta 2.

5.5. Desenvolvimento da metodologia eletroanalítica utilizando as técnicas SCP e AGNES para determinação de cádmio total e livre nas amostras de água dos rios Itapanhaú e Sorocabinha, que possibilite uma futura aplicação on-site

A metodologia proposta e desenvolvida neste trabalho com ensaios em laboratório oferece uma nova perspectiva para especiação de metais traço em águas naturais, no que diz respeito às futuras análises *on-site*. Como já descrito anteriormente, a análise de especiação de metal traço não é uma tarefa simples devido à complexidade das matrizes ambientais. Além disso, a coleta e tratamento das amostras de águas naturais podem promover e/ou induzir às alterações na distribuição das espécies antes das medidas em laboratório. Dessa forma, medidas *on-site* são preferíveis, uma vez que elas evitam problemas devido à contaminação durante a amostragem, adsorção de metal nas paredes do recipiente e a instabilidade das espécies metálicas durante o transporte e armazenamento antes das medidas (MONTEIRO et al., 2016).

Ao longo dos anos um grande esforço foi feito para conceber o design de sensores químicos para medidas *on-site* e há uma vasta literatura sobre sensores químicos para medidas aquáticas (BUFFLE et al., 2000), porém estes métodos se concentram principalmente na determinação de metal total. E em termos de portabilidade para sistemas de detecção *on-site*, os dispositivos eletroquímicos são os mais vantajosos devido ao seu pequeno tamanho e baixa demanda de energia.

5.5.1. Determinação de cádmio total na amostra *in natura* por SCP

A determinação do Cd total foi realizada nas amostras *in natura* filtradas (0,45 μm) e posteriormente acidificadas para obter a concentração total do metal dissolvido (MONTEIRO et al., 2016).

Inicialmente, o sistema eletroanalítico foi calibrado para obter o valor da constante de proporcionalidade; α (Equação 13), utilizando três ou quatro adições de metal medidas em triplicata. Dez curvas de calibração foram construídas no intervalo de $3,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para obtenção do LD que variou de 0,8 a $2,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e sete curvas de calibração foram construídas na faixa de 3×10^{-9} a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e de 1,0 a $3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ produzindo um LD no intervalo

$3,6$ a $9,8 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ que é da mesma ordem de grandeza do LD obtido por GF-AAS ($5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹) (MONTEIRO et al., 2016).

É importante mencionar que os valores de LD podem ser melhorados utilizando tempos de deposição mais elevados (60 a 600s) tradicionalmente utilizados em voltametria de redissolução. Neste trabalho utilizamos o tempo de 45s e os LD obtidos foram comparáveis com os do GF-AAS (MONTEIRO et al., 2016).

De maneira geral, os resultados das análises de Cd(II) por SCP e GF-AAS exibidos na Tabela 13 foram considerados satisfatórios, visto que apresentaram elevados valores de concordância entre o valor adicionado e valor medido (% recuperação), uma vez que em se tratando de amostras ambientais, conseguir medidas reprodutíveis é difícil. A porcentagem de recuperação das medidas feitas por SCP variou de 85 a 109%, com média de 96%, sendo estes ligeiramente melhores que os encontrados por GF-AAS, os quais variaram entre 85 a 97%, com valor médio de 91%.

Estes resultados confirmaram e validaram a capacidade da SCP em determinar com precisão a concentração do Cd(II) total adicionado nas amostras de águas naturais estudadas tanto em laboratório quanto em *on-site*, uma vez que os únicos tratamentos realizados nas amostras foram a filtração em 0,45 µm e acidificação com o HNO₃, que podem facilmente serem realizados em campo, não sendo necessário métodos prévios para destruir a matéria orgânica para a determinação do Cd total provavelmente devido à fraca ligação de Cd(II) com a matéria orgânica. Para outros metais como Cu(II) ou Pb(II), esta simplificação da metodologia assumida neste trabalho deve ser validada (MONTEIRO et al., 2016).

Tabela 13- Comparação dos resultados da determinação de Cd total por SCP e GF-AAS nas amostras coletadas nos rios Sorocabinha e Itapanhaú em novembro/2014.

Rio	[Metal Adicionado] 10^{-7} mol L ⁻¹	GF-AAS 10^{-7} mol L ⁻¹	Recuperação (%)	SCP 10^{-7} mol L ⁻¹	Recuperação (%)
Sorocabinha	0,7	0,7	93	0,8	109
Sorocabinha	1,5	1,4	92	1,3	85
Sorocabinha	2,4	2,2	92	2,4	100
Sorocabinha	3,3	2,9	85	3,3	100
Itapanhaú	0,7	0,7	97	0,7	102
Itapanhaú	1,5	1,3	88	1,4	93
Itapanhaú	2,4	2,1	88	2,5	106
Itapanhaú	3,3	3,0	91	3,0	91

Fonte: adaptada MONTEIRO et al., 2016.

5.5.2. Determinação de cádmio total nas amostras ultrafiltradas (<1 kDa)

Para melhores resultados o tempo de condicionamento das amostras no sistema de UFT foi fixado em 15 minutos e fluxo nas válvulas de recirculação e o fluxo de saída do ultrafiltrado foram definidos como 1,0 e 0,3 mL min⁻¹ respectivamente.

Os resultados obtidos após determinação por SCP e GF-AAS das amostras ultrafiltradas em 1 kDa e acidificadas, representam a concentração de Cd(II), incluindo tanto o íon metálico livre quanto o metal coordenado a pequenos ligantes que foram capazes de permear a membrana. A Tabela 14 exhibe os resultados de duas réplicas dos experimentos de UFT-SCP e UFT-GF-AAS para cada rio estudado.

Tabela 14- Comparação dos resultados da determinação de Cd livre nas amostras ultrafiltradas acidificadas por SCP e GF-AAS.

Cd adicionado	UFT/SCP	UFT/GF-AAS	Cd adicionado	UFT/SCP	UFT/GF-AAS
Cd (10^{-7} mol L⁻¹)					
Itapanhaú 1			Itapanhaú 2		
0,7	0,3	0,2	0,7	0,3	0,2
1,5	0,5	0,5	1,5	0,4	0,5
2,4	1,0	0,9	2,4	0,9	0,9
3,2	1,3	0,9*	3,2	1,3	1,0*
Sorocabinha 1			Sorocabinha 2		
0,7	0,4	0,5	0,7	0,5	0,5
1,5	0,9	0,9	1,5	0,8	1,1*
2,4	1,4	1,4	2,4	1,3	1,5
3,2	1,8	1,9	3,2	1,8	2,0

*Pontos discordantes

Fonte: adaptada MONTEIRO et al., 2016.

Analisando os resultados da Tabela 14 pode-se inferir que se houver a disponibilidade de um sensor eletroquímico que permita o uso do método para análise de SCP e ainda a possibilidade de levar o sistema de ultrafiltração nos dias de coleta, a SCP pode ser utilizada como técnica de quantificação das espécies livres, minimizando assim, a possibilidade de adulteração da amostra durante o transporte e armazenamento da amostra. Chegou-se a este entendimento através da comparação dos resultados obtidos com as duas técnicas, os quais mostraram mais uma vez o potencial e bom desempenho do método proposto para a medir a concentração de metais totais em amostras ácidas por SCP, uma vez que houve apenas três resultados discordantes obtidos por GF-AAS marcados com um asterisco (*).

Explorando os dados da Tabela 14, é importante evidenciar que a concentração do Cd(II) “livre” representa 39% (rio Itapanhaú) a 58% (rio Sorocabinha) do total adicionado, indicando que a outra parte do Cd pode estar ligada aos compostos coloidais, tipo substâncias húmicas, que ficaram retidas na membrana de 1kDa. E embora os valores de COD e pH dessas amostras sejam

semelhantes, o valor de Cd(II) medido nas amostras ultrafiltradas é elevado para o rio Sorocabinha.

5.5.3. Determinação de cádmio livre na amostra *in natura* por AGNES

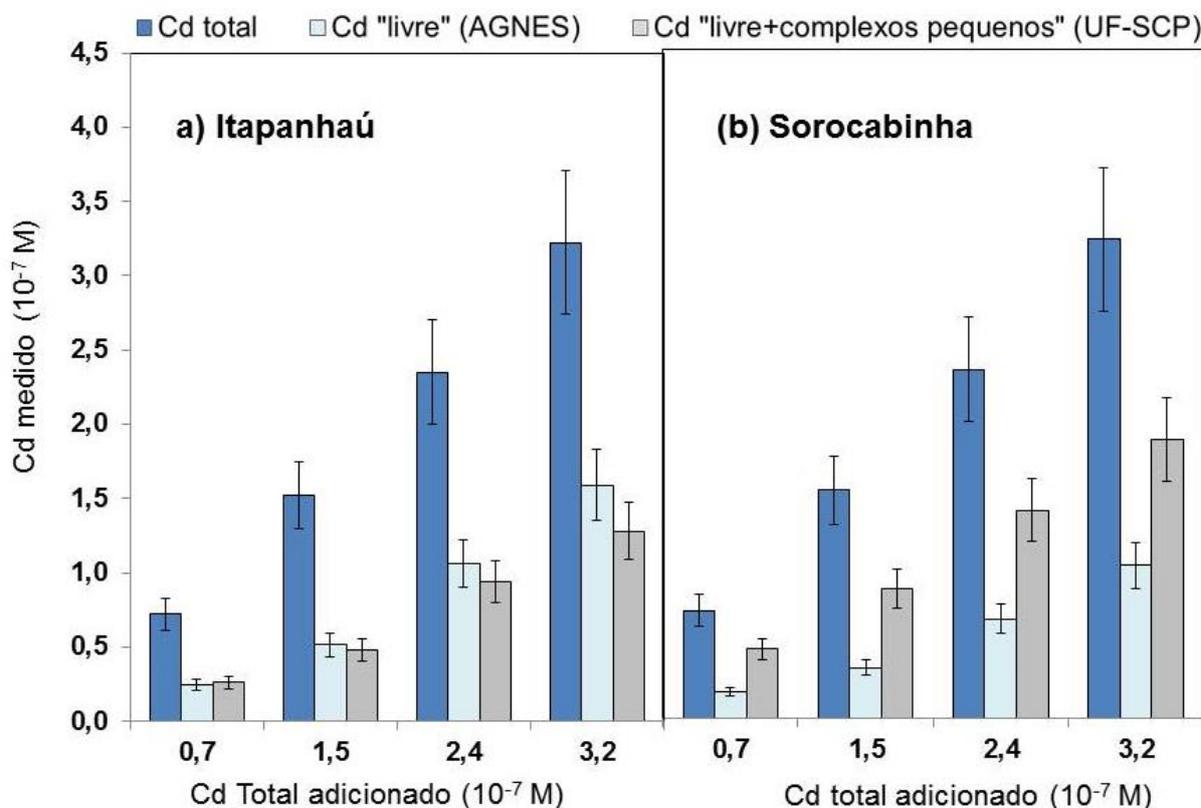
AGNES foi aplicada diretamente na amostra *in natura* filtrada (0,45 µm) para obter a concentração de metal livre. O desenvolvimento do método para medidas de AGNES consistiu de duas etapas realizadas consecutivamente. A primeira foi à verificação da condição de equilíbrio (medidas em diferentes tempos de deposição, habitualmente de 30 a 360s) para medidas de AGNES no potencial de deposição escolhido, procedimento que deve ser realizado sempre que ocorrer possíveis variações do potencial do eletrodo de referência. As condições de equilíbrio foram atingidas quando o tempo de reoxidação chegou a ser o mesmo para o aumento do tempo de deposição (GALCERAN et al., 2004).

A segunda etapa é a calibração, realizada para obter o valor da constante de proporcionalidade h (Equação 14) usando três ou quatro adições de metal medidas em triplicata. Nove curvas de calibração foram medidas no intervalo de $0,6 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o cálculo do LD que variou no intervalo de 0,7 a $3,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

Ressalta-se que este LOD representa o limite para o Cd(II) livre e é considerado como um excelente resultado quando comparado com valores obtidos por eletrodos de íons seletivos que são frequentemente de duas a três ordens de grandezas mais elevadas. Melhorar estes valores não será tão simples, uma vez que um potencial de deposição próximo da corrente limite já foi utilizado (MONTEIRO et al., 2016).

Os resultados obtidos de Cd(II) livre determinado diretamente nas amostras dos rios Itapanhaú e Sorocabinha por AGNES foram comparados com os resultados do metal total nas amostras *in natura* e ultrafiltrada ambas acidificadas, obtidos por SCP, como mostra as Figuras 25a e 25b, respectivamente. A comparação destes resultados permitiu avaliar a contribuição dos pequenos ligantes inorgânicos que conseguem permear a membrana de 1kDa na especiação do Cd. Se essa contribuição for significativa esperava-se observar valores maiores do Cd(II) na solução ultrafiltrada, pois se deve lembrar que ao acidificar a amostra e

analisa-la por SCP tem-se a concentração total do Cd ("livre+ Cd que estava ligado a compostos orgânicos e/ou inorgânicos com tamanhos <1kDa).



Fonte: adaptada de MONTEIRO et al., 2016

Figura 25- Comparação do metal total adicionado com os resultados de metal das amostras ultrafiltradas medidas por SCP e com o metal livre medido diretamente por AGNES nas amostras do rio Itapanhaú (a) e Sorocabinha (b).

Observando os dados para o rio Itapanhaú (Figura 25 a) nota-se que a fração livre do cádmio determinada diretamente por AGNES e a fração determinada na fração ultrafiltrada por SCP são semelhantes, ou seja, seus resultados são próximos. Essa concordância permite inferir que a especiação do Cd(II) nessa amostra está relacionada diretamente a matéria orgânica natural, representada pelo COD, uma vez que, a contribuição dos possíveis compostos de tamanho < 1kDa, foi minoritária.

No entanto, para as amostras de água *in natura* do rio Sorocabinha (Figura 25b) o valor do cádmio livre medido por AGNES é menor do que o valor medido na fração ultrafiltrada, o que indica que as amostras de água do rio

Sorocabinha possivelmente é mais concentrada em pequenos ligantes inorgânicos e/ou orgânicos que são capazes de permear a membrana de 1 kDa. Este comportamento pode estar associado às características físico-químicas (apresentados na seção 5.1) das águas do rio Sorocabinha, o qual apresentou maior valor de condutividade do Sorocabinha ($1043,0 \mu\text{S cm}^{-1}$) e Cl^- ($30,3 \text{ mg L}^{-1}$) em comparação com os encontrados para o rio Itapanhaú ($189,0 \mu\text{S cm}^{-1}$) e Cl^- ($12,8 \text{ mg L}^{-1}$), provavelmente devido ao RS ter uma maior contribuição de sais oriundos da água do mar. Os íons Cl^- podem atravessar a membrana de 1kDa e formar ligações com o Cd(II).

Outra observação a ser levada em consideração é que a concentração do Cd “livre” na fração do ultrafiltrado do rio Sorocabinha é aproximadamente o dobro da encontrada no rio Itapanhaú enquanto o metal livre Cd(II) (AGNES) na amostra *in natura* é na verdade menor, indicando que a especiação do Cd(II) é diferente em ambas as amostras dos rios, sendo controlada principalmente pela matéria orgânica no rio Itapanhaú, enquanto que no rio Sorocabinha os ligantes de baixa massa molecular (1kDa) inorgânicos e a concorrência de outros cátions e íons (por exemplo, Cl^-) são maiores para esse rio e devem ser levados em consideração. A partir desses resultados, pode se concluir que a ligação do Cd(II) com a matéria orgânica natural é principalmente eletrostática e que a competição com outros íons possivelmente é muito efetiva (MONTEIRO et al., 2016).

Levando em consideração o COD, inclusive em relação à sua concentração similar em ambos os rios, a natureza da matéria orgânica presente pode ser diferente devido às relativas quantidades das frações de ácidos fúlvicos e húmicos presentes. A força iônica mais elevada e os cátions presentes no rio Sorocabinha sugerem que a fração húmica do COD é menos estável, ou encontra-se agregada. Já no Itapanhaú essa fração húmica pode ainda ser significativa. Em trabalhos futuros pretendemos investigar esta questão com mais detalhes (MONTEIRO et al., 2016).

A fim de confirmar as observações descritas foram realizadas medidas de AGNES nas amostras ultrafiltradas sem acidificá-las de duas amostras do rio Sorocabinha (enriquecida com $2,4$ e $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de Cd(II)) para determinar a proporção de Cd(II) livre na solução ultrafiltrada. Os resultados mostraram que apenas uma parcela de 37 a 45% do total de Cd(II) adicionado nesta fração é livre, confirmando assim, que o Cd(II) estar realmente complexado na amostra

ultrafiltrada não acidificada provavelmente por pequenos ligantes inorgânicos (MONTEIRO et al., 2016).

Neste trabalho foi validada a determinação da concentração total de Cd(II) por SCP nas amostras *in natura* e ultrafiltrada acidificada com um LD de $1,6 \times 10^{-9}$ M e a determinação do Cd(II) livre por AGNES com um LD de $1,9 \times 10^{-9}$ M comparando-se com os resultados obtidos GF-AAS (seção 5.5.1). Além disso, foi demonstrado também que a especiação de metais proposta pela metodologia fornece informações válidas sobre o Cd(II) total e livre ao ser capaz de elucidar adicionalmente a contribuição de ligantes inorgânicos e/ou orgânicos (<1kDa) na complexação de metais nas amostras *in natura* (MONTEIRO et al., 2016).

5.6. Estudo das interações do Cd(II) e Pb(II) com os ácidos fúlvicos e húmicos purificados dos rios Itapanhaú e Sorocabinha em diferentes estações utilizando AGNES

Esta nova metodologia consiste em efetuar titulações dos ácidos húmicos fúlvicos extraídos dos rios Sorocabinha (AHS e AFS) e Itapanhaú (AHI e AHS) com o Cd(II) e Pb(II) em uma ampla faixa de concentração, seguindo a variação do metal livre por AGNES. Este experimento permite extrair parâmetros para a modelagem dos resultados por NICA-DONNAN (trabalhos futuros) e assim compreender melhor as interações do metal com os diferentes ligantes.

Inicialmente foram feitas otimizações dos métodos para a obtenção de limite de detecção (LD) adequados para a análise das espécies livres de Cd(II) e Pb(II), por AGNES. Logo, o LOD obtido para Cd(II) variou de $(1,0 \text{ a } 6,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1})$ e $(3,0 \text{ a } 8,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1})$ para o Pb(II). Para avaliar a reprodutibilidade dos experimentos, bem como da técnica, os experimentos foram realizados em duplicata e/ou triplicata quando necessário e de maneira geral, como pode ser observado nas Figuras 26 a 30, os resultados foram bem reprodutíveis, evidenciando a precisão nas medidas de AGNES.

Todos os experimentos com as amostras estudadas foram realizados em três pH diferentes para cada metal. A escolha desses pH, está relacionada ao pH natural das amostras de água coletada nos rios Sorocabinha e Itapanhaú, bem como a uma simulação prévia realizada no programa Visual Minteq, para verificação das faixas de pH onde as espécies de Cd(II) e Pb(II) estivessem

predominantemente na sua forma complexada, logo os pH de trabalho foram 6, 7 e 8 para o Cd(II) e 5, 5,5 e 6,5 para o Pb(II).

As principais diferenças das interações do Pb(II) e Cd(II) com os ácidos fúlvicos e húmicos extraídos dos rios Sorocabinha e Itapanhaú levando em consideração fatores como, origem do material, sazonalidade, a heterogeneidade dos complexos formados e diferentes condições de pH foram avaliadas em função do comportamento dos valores das constantes ($k' = K_{CL,T} = C_{ML}/C_M$) obtidas após as titulações dos AF e AH. Para melhor interpretação dos resultados os dados de k' foram normalizados ($\log k'/\text{concentração do AF e/ou AH adicionado (kg L}^{-1}\text{)}$) para obtenção de K (L g^{-1} AF e/ou AH) e posterior construção dos gráficos $C_{M,T}$ (concentração do metal total) versus K (L g^{-1} AF e/ou AH).

A Figura 26 exibe a comparação da complexação do Pb(II) (pH 6,5) e Cd(II) (pH 7,0) com o AF extraído do rio Itapanhaú coleta 2. Os valores de K foram sempre maiores para o Pb(II) do que para o Cd(II) independente do material estudado em qualquer concentração adicionada sugerindo que as ligações (AF-Pb) são mais fortes, ou seja, o Pb(II) complexa mais em comparação às ligações do (AF-Cd).

O perfil das curvas obtidas fornece informações quanto à heterogeneidade dos complexos AF/AH-Metal. Se o sistema for homogêneo, será obtida uma linha reta (constante) indicando que a proporção C_{ML}/C_M se mantém qualquer que seja a proporção de metal total/ligante total. Quando o sistema é heterogêneo a razão C_{ML}/C_M decresce com o aumento da razão metal total/ligante total. Este decréscimo é observado porque inicialmente a concentração do metal é baixa, logo, estes tendem a ocupar os sítios de complexação mais fortes presentes nos AF e AH. Conforme a $C_{M,T}$ vai aumentando, os sítios mais fortes estão ocupados e os íons metálicos vão ocupando os sítios mais fracos. Dessa forma a complexação entre o AF-Pb é muito heterogênea, enquanto que para o cádmio é praticamente homogênea.

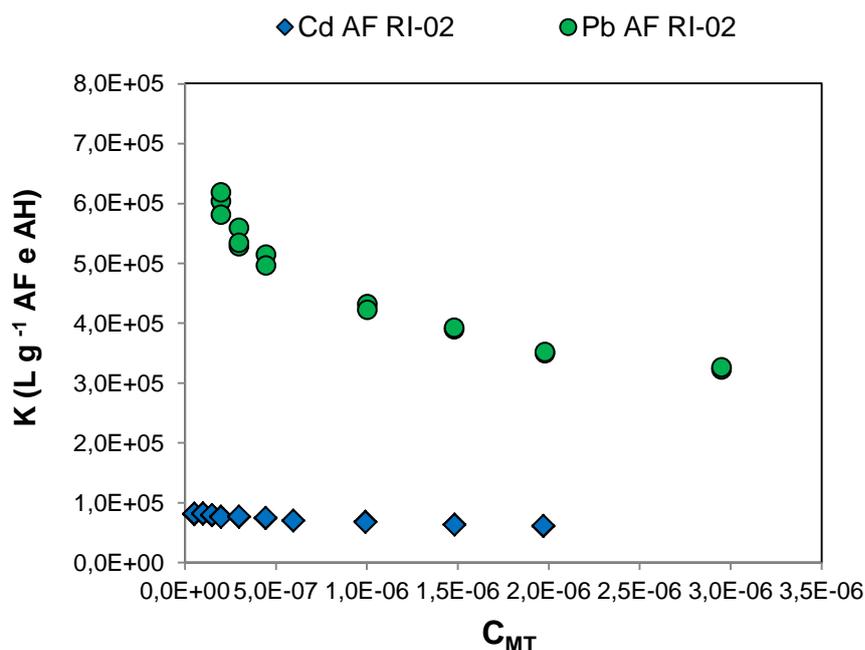


Figura 26- Curvas de $Kx C_{M,T}$ (obtidas por meio da AGNES) para o ácido fúlvico do rio Itapanhaú período chuvoso (AF RI-02), comparando as diferenças de complexação do Cd(II) (pH 7) e Pb(II) (pH 6,5) e força iônica $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

As Figuras 27a e 27b exemplificam a comparação da complexação do Pb(II) (pH 6,5) e Cd(II) (pH 7,0) com o AF e AH, respectivamente, comportamento observado em todas as amostras estudadas. Nota-se que os valores das constantes para o mesmo metal são sempre maiores para a complexação com o AH, o qual apresenta comportamento mais heterogêneo, uma vez que o ácido húmico é conhecido por apresentar menos sítios com cargas negativas e um maior grau de variabilidade dos grupos disponíveis para complexar estes metais, enquanto que o AF apresenta mais cargas e menor variedade de grupos (MILNE; KINNIBURGH; TIPPING, 2001).

Este efeito é bem evidente para o Cd(II) onde a complexação com o AH é mais heterogênea e mais forte para uma razão metal ligante baixa, porém, com o aumento da concentração do metal a complexação dos AF torna-se mais efetiva, pois há mais grupos. Além disso, estes resultados corroboram com o que já foi demonstrado na literatura que as interações entre metais traço e o material húmico pode ocorrer através de interações não específicas, como à carga negativa residual e/ou específicas, entre cátions e grupos funcionais presentes (DOMINGOS, et al., 2004).

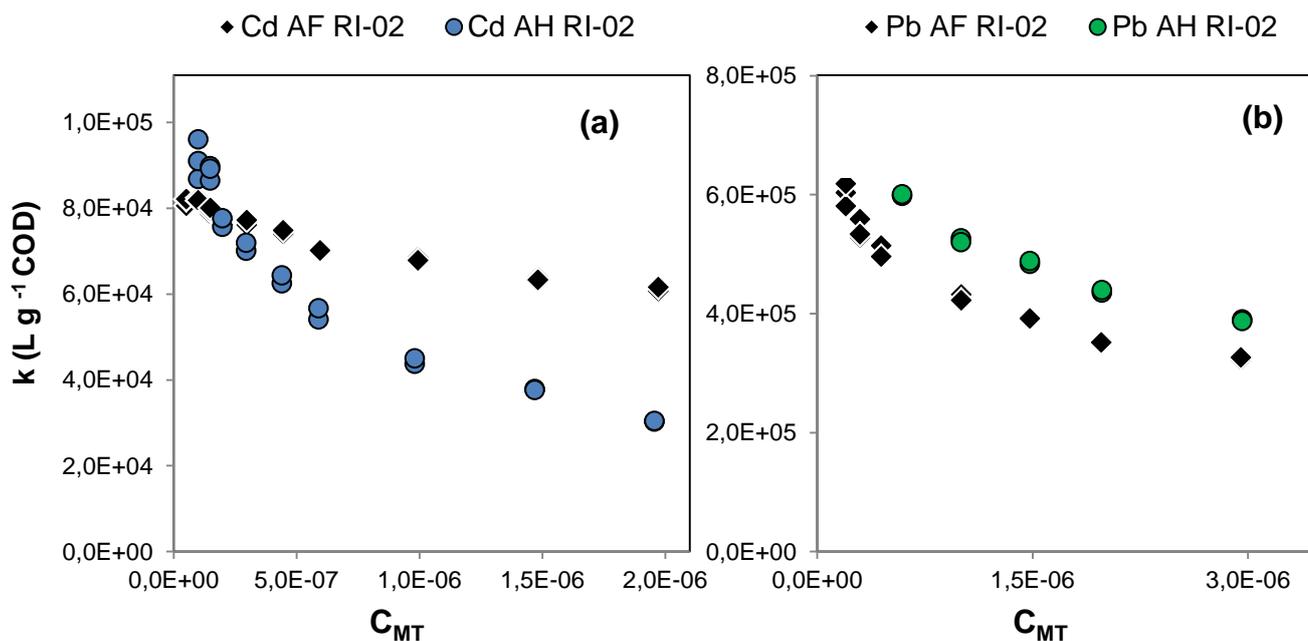


Figura 27- Comparação das curvas de $K \times C_{M,T}$ (obtidas por meio da AGNES) para o AF e AH do rio Itapanhá período chuvoso, experimentos realizados com Cd(II) em pH 7 (a) e Pb(II) em pH 6,5 (b), força iônica $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Tanto para os experimentos Cd(II) (Figura 28a) quanto para o Pb(II) (Figura 28b) os maiores valores de K foram encontrados com o aumento do valor de pH e consequentemente foi observado uma maior complexação e heterogeneidade. Conforme vai ocorrendo a desprotonação (acréscimo da carga negativa e/ou posições ionizadas presente nos ligantes) o valor de K' aumenta (KINNIBURG et al., 1999). Dessa forma o pH 8 para o Cd(II) e o pH 6,5 para o Pb(II) permitiu uma maior interação desses metais traço com os AF e AH estudados. Estes resultados sugerem que quando forem quantificados Cd(II) e Pb(II) nas águas dos rios Sorocabinha e Itapanhá com pH variando de 5,3 a 6,3 (seção 5.1), provavelmente o Cd(II) estará mais disponível do que o Pb(II), uma vez que o AH e AF presentes nessas amostras apresentaram maior afinidade pelo Pb(II).

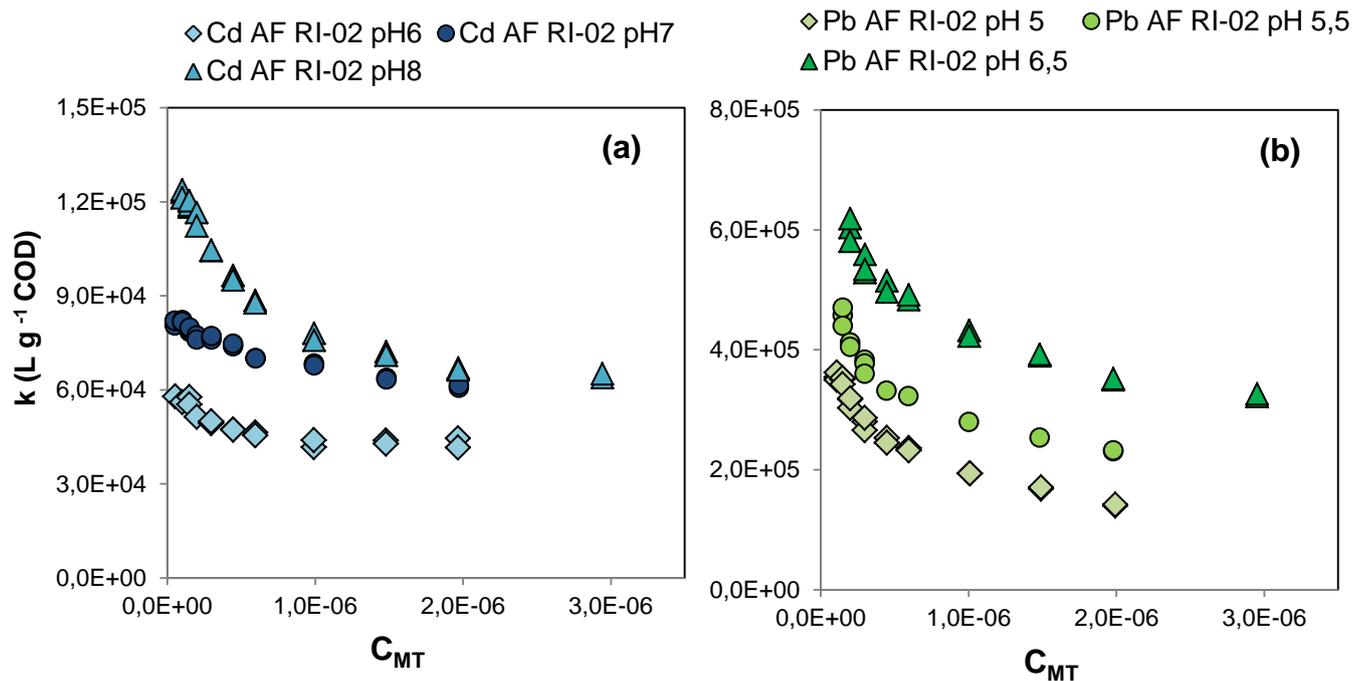


Figura 28- Influência do pH na complexação do Cd(II) (pH 6, 7 e 8) (a), e do Pb(II) em pH (5, 5,5 e 6,5) (b), com o AF do rio Itapanhaú.

Em relação à origem, pode-se inferir por meio dos resultados exibidos nas Figuras 29a e 29b, que para ambos os casos em pH mais baixos as complexações são semelhantes mas que para os pH mais elevados no caso do Cd(II) é mais forte com o AF RI do que com o AF RS mas se observa o inverso em relação ao Pb(II) onde a complexação é maior para o rio Sorocabinha.

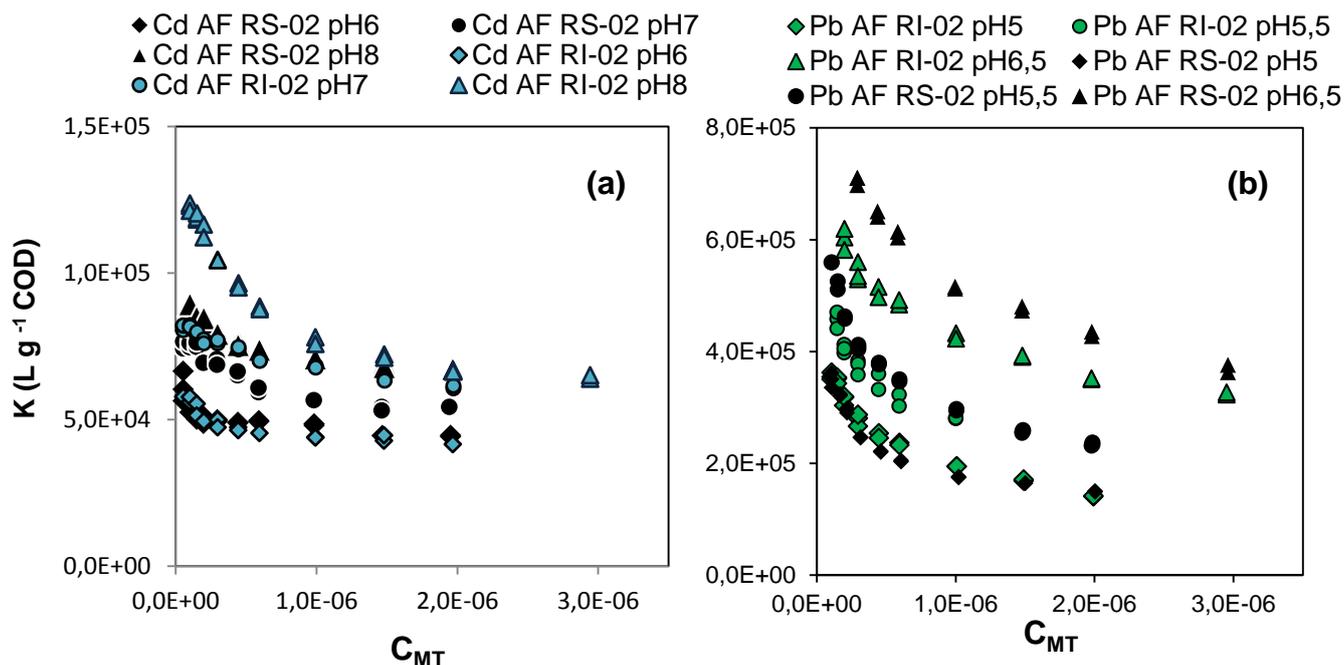


Figura 29- Influência da origem do material extraído na complexação do Cd AF RS e AF RI-02 (pH 6, 7 e 8) (a), e do Pb AF RS-02 e AF RI-02 em pH (5, 5,5 e 6,5) (b).

A Figura 30 mostra a comparação dos resultados em função da sazonalidade para os AF extraídos do rio Itapanhaú. A complexação é sistematicamente maior na coleta 2 (período seco) do que na coleta 1 (período chuvoso). A diferença é maior no caso do Cd(II) do que para o Pb(II), e no caso do Cd(II) maior aos pH 6 e 7 do que a pH 8. Nota-se que a distribuição das frações indica que no caso da coleta 1 a predominância é da fração F3 com 45% seguida da F4 com 27% e da F5 com 7% enquanto na coleta 2 a fração mais preeminente é a F5 com 35%, seguida da F4 com 26% e F3 com 23%. Esta distribuição com maior abundância de moléculas menores na coleta 2 indica em geral maiores densidades de cargas por moléculas, o que justificaria uma maior complexação. As titulações potenciométricas para determinar as quantidades de cargas estão em andamento, o que permitirá brevemente confirmar a origem deste comportamento.

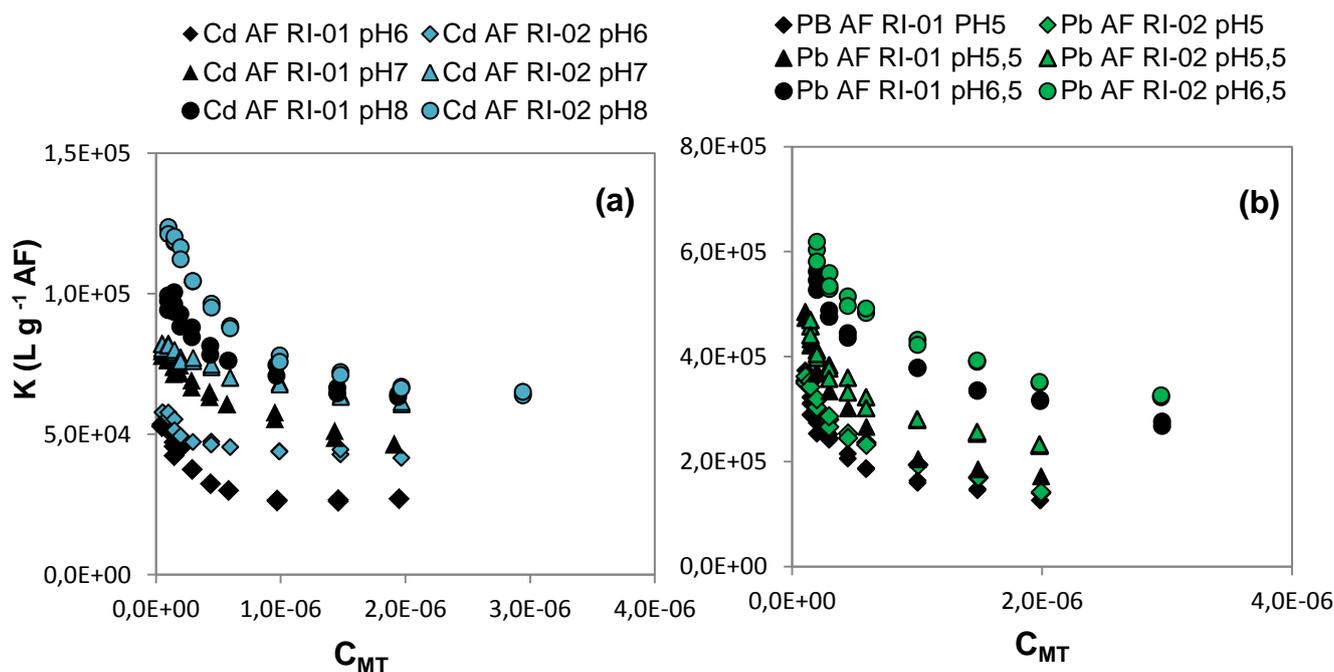


Figura 30- Influência da sazonalidade na complexação do Cd e AF RI (pH 6, 7 e 8) (a) e do Pb AF RI em pH (5, 5,5 e 6,5) (b), para os períodos chuvoso (01) e seco (02).

Durante este trabalho foram realizados experimentos de SSCP para estudar a heterogeneidade da complexação e apenas um exemplo será mostrado aqui. Esse estudo pretende investigar métodos capazes de obter informações de heterogeneidade a partir da inclinação da curva de SSCP que é intercalada nos experimentos de AGNES.

Na SSCP é a inclinação da curva que reflete a heterogeneidade do complexo SHA-Metal. Os gráficos de SSCP apresentam duas curvas, uma referente à curva teórica (*Fitting curve* SSCP – linha cheia) obtida por intermédio de equações estabelecidas para combinar os valores teóricos, ajustando os valores do E^0 (potencial padrão) e τ_m (tempo) e a outra curva representa os dados experimentais (linha com marcadores). A curva teórica é para um sistema homogêneo, quanto mais distante for a curva experimental (SSCP [Cd]= $5,1 \times 10^{-3}$) da curva teórica (*Fitting curve* SSCP [Cd]= $5,1 \times 10^{-3}$), por exemplo, mais heterogêneo é o sistema. Observando os resultados parciais obtidos neste trabalho (Figura 31), é possível inferir que a pH 6 os complexos formados para a concentração de Cd estudada são praticamente homogêneos para ambas SHA estudadas, enquanto que, os formados com o Pb(II) ao mesmo pH, apresentam uma inclinação maior nos pontos experimentais nas curvas de SSCP quando

comparados com a curva teórica, evidência de um comportamento bastante heterogêneo.

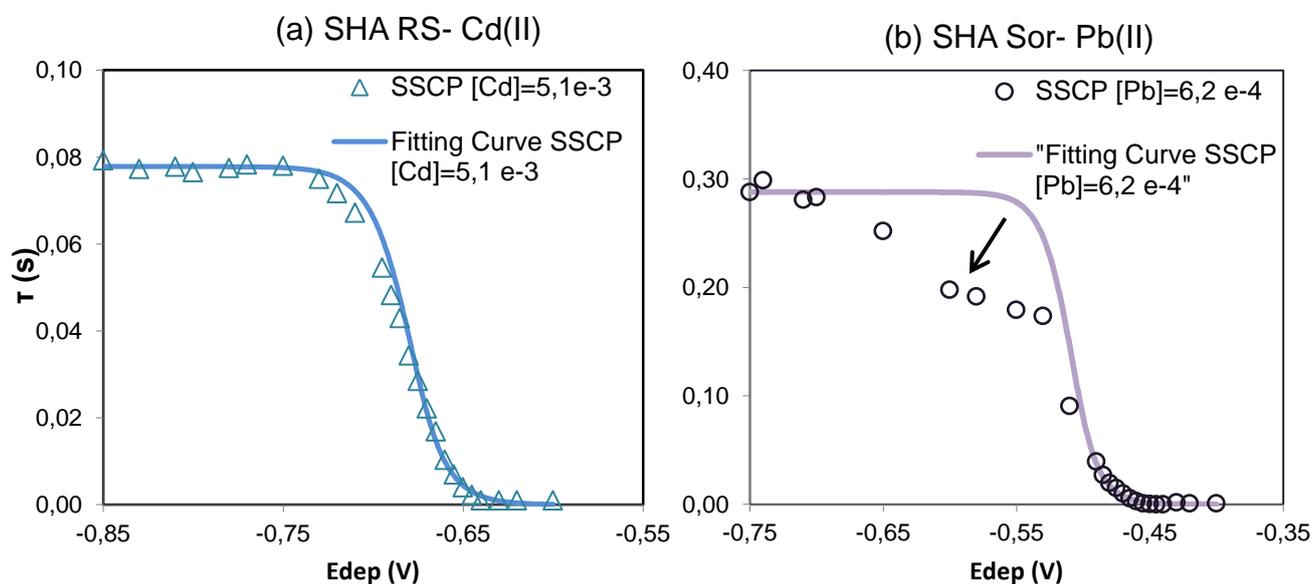


Figura 31- Curvas de SSCP experimental e teórica para o Cd(II) (a) e Pb(II) (b) com a SHA extraída do rio Sorocabinha a pH 6.

6. CONCLUSÃO

- Os resultados da avaliação da qualidade da água dos rios Sorocabinha (RS) e Itapanhaú (RI) permitiram verificar que a maiores diferenças entre esses rios se devem à maior contribuição da água do mar no rio Sorocabinha, o qual apresentou maiores valores de condutividade e cloreto principalmente no período de estiagem. A MON foi caracterizada como predominantemente de origem alóctone e a concentração do COD foi maior no RS em detrimento do RI e apresentaram maiores valores quando comparados com rios de outros países. Os metais, Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, e Zn foram encontrados em ambos os rios, em maiores concentrações no RS, e no período chuvoso para ambos. Estes metais apresentaram-se predominantemente na fração dissolvida, complexados à fração coloidal. E apenas Al, Fe, Cu e principalmente Mn apresentara-se em suas “formas livres” e dessa forma, mais biodisponíveis para internalização pela biota aquática;
- A análise de ANOVA intervalo de 95 % de confiança aplicada aos dados de caracterização das substâncias húmicas e ácidos fúlvicos extraídos a partir da MON para os rios estudados revelaram que apesar das amostras apresentarem algumas variações em suas composições estruturais, não há diferença significativa entre elas. Houve uma maior predominância de estruturas alifáticas na composição de todas as amostras, porém as amostras provenientes do RS no período chuvoso são mais humificadas e aromáticas do que as do RI. Em relação à influência da sazonalidade, as amostras (SHA RI-02 e SHA RS-02) são mais aromáticas e ricas em compostos carbonílicos do que as amostras coletadas no período chuvoso (SHA RI-01; SHA RS-01).
- A partir do fracionamento molecular das amostras das SHA e AF e *in natura* foram obtidas seis frações, e apenas 5 para os AH, assim descritas: $F_1 > 100$ kDa; $30 < F_2 < 100$ kDa; $10 < F_3 < 30$ kDa; $3 < F_4 < 10$ kDa; $1 < F_5 < 3$ kDa ou $F_5 < 3$ e $F_6 < 1$ kDa. As amostras de SHA extraídas do RS apresenta maior predominância de compostos de maiores tamanhos, F4 em detrimento das do RI que tem maior porcentagem dos compostos menores F5. Em relação aos AF a maior composição é dos grupos de menores tamanhos (F5) e para o RS há uma ainda uma porcentagem maior de compostos (<1kDa). Os ácidos húmicos presentes nesses

rios tem uma maior abundância dos compostos de alta massa molecular ($F > 100$ kDa). A distribuição dos metais presentes originalmente nas frações estudadas, de maneira geral, evidenciaram as diferenças das afinidades dos metais (Zn, Fe, Al e K) em função do material extraído e suas origens. No AF de ambos os rios, os metais estiveram preferencialmente distribuídos nas frações de menor tamanho (F4 e F5) enquanto que no AH estiveram mais distribuídos nas frações (F1 e F3).

➤ A metodologia desenvolvida para a especiação de Cd(II) nas amostras de água dos RS e RI, validada em laboratório combinando UFT-SCP e AGNES é capaz de ser utilizada em experiências *on-site*, uma vez que para a quantificação por SCP apenas a filtração e acidificação das amostras é necessário, enquanto que por AGNES a amostra é apenas filtrada. Os resultados forneceram informações válidas em relação às concentrações totais e livres de cádmio e, adicionalmente, alguma interpretação sobre a contribuição dos pequenos ligantes inorgânicos na complexação do Cd(II). A determinação de Cd(II) total nas amostras (*in natura* e ultrafiltrada em 1kDa) acidificadas por SCP teve limite de detecção de $1,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e o LD para a determinação de Cd(II) livre usando a AGNES foi $1,9 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

➤ As principais diferenças das interações do Pb(II) e Cd(II) com os ácidos fúlvicos e húmicos extraídos dos rios Sorocabinha e Itapanhaú usando AGNES foram avaliadas levando em consideração fatores como, origem do material, sazonalidade e heterogeneidade através do comportamento dos valores de K. Os resultados obtidos mostram uma complexação mais efetiva para o Pb(II) do que para o Cd(II) como esperado. Considerando o mesmo metal, os valores de K indicaram que o AH tem maior potencial complexante e comportamento mais heterogêneo que o AF. Em relação à variação do pH tanto para os experimentos com Cd(II) quanto para o Pb(II), os maiores valores de K foram encontrados com o aumento do valor de pH e conseqüentemente foi observado uma maior complexação e heterogeneidade. Comparando os AF e AH obtidos dos RI e RS não existe uma tendência clara, já em relação à sazonalidade a complexação é mais efetiva no período seco que no chuvoso.

7. TRABALHOS FUTUROS

- a) Determinação dos parâmetros NICA-Donnan para os ácidos húmicos e fúlvicos aquáticos purificados, frações (obtidas após fracionamento) e dos rios Sorocabinha e Itapanháu dos dois períodos de coleta (março e novembro de 2014)
- ✓ Titulações potenciométricas das 8 amostras sob três diferentes forças iônicas;
 - ✓ Modelagem dos resultados de potenciometria e da interação com Cd^{2+} e Pb^{2+} com Orchestra/PEST;
- b) Experimentos de AGNES e SSCP nas amostras após o fracionamento molecular do AF e AH purificado dos rios Sorocabinha e Itapanháu
- ✓ Simulação dos resultados esperados em cada fração com Orchestra baseado nos parâmetros obtidos para os materiais purificados não fracionados;
- c) Tratamento dos dados experimentais obtidos por SSCP para aferir a heterogeneidade e labilidade do Cd(II) e Pb(II) com os AF e AH purificados e suas frações.
- d) No trabalho de pos-doc pretende-se continuar o desenvolvimento da detecção on-site terminando o trabalho para o Cd(II) e Pb(II) e desenvolvendo a detecção para o Hg(II) .

REFERÊNCIAS

- ABATE, G.; MASINI, J. C. Complexation of Cd (II) and Pb (II) with humic acids studied by anodic stripping voltammetry using differential equilibrium functions and discrete site models. **Organic Geochemistry**, v. 33, p. 1171-1182, 2002.
- AGUILAR, D.; PARAT, C.; GALCERAN, J.; COMPANYS, E.; PUY, J.; GAUTIER, M. P. Determination of free metal ion concentrations with AGNES in low ionic strength media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 689, p. 276-283, 2013.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st ed. Washington, DC, 2005. 1200 p.
- BOTERO, W. G.; SOUZA, S. O.; SANTOS, O. S.; OLIVEIRA, L. C. AMARANTE, C. B. Influência das substâncias húmicas de sedimentos na biodisponibilidade de metais para o sistema aquático. **Química Nova**, v. 37, p. 943-949, 2014.
- BUFFLE, J. **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach**. New York: Ellis Horwood, 1988. 692 p.
- BUGARIN, M. G.; MOTA, A. M.; PINHEIRO, J. P.; GONÇALVES, M. L. S. S. Influence of metal concentration at the electrode surface in differential pulse anodic stripping voltammetry in the presence of humic matter. **Analytica Chimica Acta**, v. 294, p. 271-281, 1994.
- BURBA, P.; ROCHA, J.; KLOCKOW, D. Labile complexes of trace-metals in aquatic humic substances - investigations by means of an Ion exchange-based flow procedure. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 349, p. 800-807, 1994.
- CHITO, D.; WENG, L.; GALCERAN, J.; COMPANYS, E.; PUY, J.; RIEMSDIJK, W. H.; VAN LEEUWEN, H. P. Determination of free Zn²⁺ concentration in synthetic and natural samples with AGNES (absence of gradients and nernstian equilibrium stripping) and DMT (donnan membrane technique). **Science of the Total Environment**, v. 421, p. 238-244, 2012.
- CHON, K.; CHON, K. CHO, J. Characterization of size fractionated dissolved organic matter from river water and waster effluent using preparative high performance size exclusion chromatography. **Organic Geochemistry**, v.103, p. 105-112, 2017.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo, 2011**. São Paulo, 2012. 356 p. (Série relatórios).
- COSTA, A. S.; PASSOS, E. A.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H. Characterization of dissolved organic matter in the Piauí river estuary, northeast Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2139-2147, 2011.

DANG, D. H.; LENOBLE, V.; DURRIEU, G.; OMANOVIC, D.; MULLOT, J. U.; MOUNIER, S.; GARNIER, C. Seasonal variations of coastal sedimentary trace metals cycling: insight on the effect of manganese and iron (oxy)hydroxides, sulphide and organic matter. **Marine Pollution Bulletin**, 2015. doi.10.1016/j.marpolbul.2014.12.048.

EIGEN, M. Fast elementary steps in chemical reaction mechanisms. **Pure and Applied Chemistry**, v. 6, p. 97-115, 1963.

ELBISHLAWI, H.; JAFFE, P. R. Characterization of dissolved organic matter from a restored urban marsh and its role in the mobilization of trace metals. **Chemosphere**, v. 127, p.144-151, 2015.

GALCERAN, J.; COMPANYS, E.; PUY, J.; CECILIA, J.; GARCES J. L. AGNES: a new electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 566, p. 95-109, 2004.

GIOVANELA, M.; CRESPO, J. S.; ANTUNES, M.; ADAMATTI, D. S.; FERNANDES, A. N.; BARISON, A.; SILVA, C. W. P. da; GUEGAN, R.; MOTELICA-HEINO, M.; SIERRA, M. M. D. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from the bottom sediments of a Brazilian subtropical microbasin. **Journal of Molecular Structure**, v. 981, p. 111-119, 2010.

GOVEIA, D.; ROCHA, J. C.; OLIVEIRA, L. C.; MORAIS, L. C.; CAMPOS, V.; FRACETO, L. F.; ROSA, A. H. Caracterização estrutural das substâncias húmicas aquáticas extraídas dos rios Itapanhaú e Ribeira de Iguape. **Química Nova**, v. 34, p. 753-758, 2011.

GUSTAFSSON, J. P. **Visual MINTEQ ver. 3.1**. [S.l.:s.n.], 2013. Disponível em <<http://vminteq.lwr.kth.se/>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

HORTELLANI, M. A.; SARKIS, J. E. S.; ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P. M. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do estuário Santos - São Vicente. **Química Nova**, v. 31, p. 10-19, 2008.

INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY. **Isolation of IHSS aquatic humic and fulvic acids**. 2008. Disponível em: <<http://humic-substances.org/isolation-of-ihss-aquatic-humic-and-fulvic-acids/#organization>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

JAMALIA, M. K.; KAZIA, T. G.; ARAINA, M. B.; AFRIDI, H. I.; JALBANI, N.; KANDHORO, A. Q. S.; BAIGA, J. A. Speciation of heavy metals in untreated sewage sludge by using microwave assisted sequential extraction procedure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 1157-1164, 2009.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, v. 68, p. 167-182, 2003.

JIANG, T.; SKYLLBERG, U.; GREEN, N. W.; TANG, J.; WANG, D.; LI, C. Characteristics of dissolved organic matter (DOM) and relationship with dissolved mercury in Xiaoqing River-Laizhou Bay estuary, Bohai Sea, China. **Environmental Pollution**, v. 223, p. 19-30, 2017.

KAUSHIK, A.; KANSAL, A.; SANTOSH; MEENA; KUMARI, S.; KAUSHIK, C. P. Heavy metal contamination of the river Yamuna Haryana India: assessment by metal sediment enrichment factor. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p. 265-270, 2009.

KEIZER M. G.; VAN RIEMSDIJK, W. H. (Coord.). **ECOSAT**: a computer program for the calculation of chemical speciation and transport in soil-water systems. Version 4.7. Wageningen, 1995.

KIKUCHI, T.; FUJII, M.; TERAOKA, K.; LEE, Y. P.; YOSHIMURA, C. Correlations between aromaticity of dissolved organic matter and trace metal concentrations in natural and effluent waters: a case study in the Sagami River Basin, Japan. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 36-45, 2017.

KIPPLER, M.; HOSSAIN, M. B.; LINDH, C.; BROBERG, K. Early life low-level cadmium exposure is positively associated with increased oxidative stress. **Environmental Research**, v. 112, p. 164-170, 2012.

MARTINS, C. A. S.; NOGUEIRA, N. O.; RIBEIRO, P. H.; RIGO, M. M.; CANDIDO, A. O. Dynamics of soil trace metal. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, p. 383-391, 2011.

MEEUSSEN, J. C. L. ORCHESTRA: an object-oriented framework for implementing chemical equilibrium models. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 1175-1182, 2003.

MERCÊ, A. L. R.; YANO, L. S.; THANH, X.; D. BOUET, G. Complexing power of vitamin D3 toward various metals. potentiometric studies of vitamin D3 complexes with Al^{3+} , Cd^{2+} , Gd^{3+} , and Pb^{2+} ions in water-ethanol solution. **Journal of Solution Chemistry**, v. 32, p. 1075-1085, 2003.

MONTEIRO, A. S. C.; PARAT, C.; ROSA, A. H.; PINHEIRO, J. P. Towards field trace metal speciation using electroanalytical techniques and tangential ultrafiltration. **Talanta**, v. 152, p. 112-118, 2016.

MONTERROSO, C. C.; CARAPUCA, H. M.; SIMÃO, J. E. J.; DUARTE, A. C. Optimisation of mercury film deposition on glassy carbon electrodes: evaluation of the combined effects of pH, thiocyanate ion and deposition potential. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, p. 203-212, 2004.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**, v. 27, p. 251-260, 2004.

MOREL, F. M. M.; HERING, J. G. **Principles and applications of aquatic chemistry**. New York: Wiley, 1993. 608 p.

MOTA, A. M.; SANTOS, M. M. C.; TURNER, T. D. **Metal speciation and bioavailability**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 679 p.

NORDIC COUNCIL OF MINISTERS. **Lead review**. [S.l.], 2003. 29 p.
Disponível em: <http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_lead.pdf>.
Acesso em: 20 fev. 2017.

OLIVEIRA, J. L.; BOROSKI, M.; AZEVEDO, J. C. R.; NOZAKI, J. Spectroscopic investigation of humic substances in a tropical lake during a complete hydrological cycle. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 34, p. 608-617, 2006.

OTERO, N. G.; ALONSO, M. C. B.; GONZÁLEZ, R. D.; HERMELO, P. H.; PIÑEIRO, A. M.; BARRERA, P. B. Evaluation of offgel electrophoresis, electrothermal atomic absorption spectroscopy and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy for trace metal analysis in marine plankton protein. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 51-57, 2015.

PARAT, C.; SCHNEIDER, A.; CASTETBON, A.; POTIN-GAUTIER, M. Determination of trace metal speciation parameters by using screen-printed electrodes in stripping chronopotentiometry without deaerating. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, p. 156-162, 2011.

PERNET, C. B.; COMPANYS, E.; GALCERAN, J.; MOREY, M.; MOUCHEL, J.; PUY, J. Pb-binding to various dissolved organic matter in urban aquatic systems: key role of the most hydrophilic fraction. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 14, p. 4005-4019, 2011.

PESAVENTO, M.; ALBERTI G.; BIESUZ, R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, p. 129-141, 2009.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas**. São Paulo: Ed. Unesp, 2003. 120 p.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004. 154 p.

ROMÃO, L. P. C.; ROCHA, J. C. Utilização da ultrafiltração em fluxo tangencial na determinação das constantes de troca entre substâncias húmicas e íons Cu (II). **Revista da Fapese de Pesquisa e Extensão**, v. 2, p. 25-36, 2005.

ROMÃO, L. P. C.; CASTRO, G. R.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; PADILHA, P. M.; SILVA, H. C. Tangential flow ultrafiltration: an alternative methodology for determination of complexation parameters in organic matter from waters and soils samples from Brazilian regions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 1097-1100, 2003.

ROMÃO, L. P. C.; LEAD, J. R.; ROCHA, J. C.; OLIVEIRA, L. C.; ROSA, A. H.; MENDONÇA, A. G. R.; RIBEIRO, A. S. Structure and properties of brazilian peat: analysis by spectroscopy and microscopy. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 714-720, 2007.

ROSA, A. H.; SIMÕES, M. L.; OLIVEIRA, L. C. de; ROCHA, J. C.; MARTIN NETO, L.; MILORI, D. M. B. P. Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soil profiles in Brazil's Amazonian region. **Geoderma**, v. 127, n. 1/2, p. 1-10, 2005.

SARGENTINI, E. J.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. R. ZARA, L. F.; SANTOS, A. S. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v. 24, p. 339-344, 2001.

SERRANO, N.; DÍAZ-CRUZ, J. M.; ARIÑO, C.; ESTEBAN, M.; PUY, J.; COMPANYYS, E.; GALCERAN, J.; CECILIA, J. Analysis of stripping chronopotentiograms at scanned deposition potential (SSCP) as a tool for heavy metal speciation: theoretical development and application to Cd(II)-Phthalate and Cd(II)-Iodide systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 600, p. 275-284, 2007.

SHIUA, R. F.; LEEA, C. L. Role of microgel formation in scavenging of chromophoric dissolved organic matter and heavy metals in a river-sea system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 328, p. 12-20, 2017.

SHUJUN, D.; YAN, G.; YIN, Z.; LU, H.; JIA, R.; XU, J.; CANÇÃO, X.; LI, L.; SHU, Y.; ZHAO, X. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 260-268, 2014.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition and reactions**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 512 p.

TEMPLETON, D. M. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. **Pure Application Chemistry**, v. 72, p. 1453-1470, 2000.

THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. Preparative isolation of aquatic humic substances. **Environmental Science & Technology**, v. 15, p. 463-466, 1981.

TONELLO, P. S.; ROSA, A. H.; ABREU JUNIOR, C. H.; MENEGÁRIO, A. A. Use of diffusive gradients in thin films and tangential flow ultrafiltration for fractionation of Al(III) and Cu(II) in organic-rich river waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, p. 162-168, 2007.

TORO, D. M.; ALLEN, H. L.; MEYER, P.; PAQUIN, R.; SANTORE, R. C. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 2383-2396, 2001.

TOWN, R. M.; VAN LEEUWEN, H. P. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 2. Determination of metal ion speciation parameters. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 541, p. 51-65, 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3005A**. Acid digestion of waters for total recoverable or dissolved metals for analysis by FLAA or ICP spectroscopy. Washington, DC, 1992. 25 p.

VAN LEEUWEN, H. P.; TOWN, R. M. Electrochemical metal speciation analysis of chemically heterogeneous samples: the outstanding features of stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 3945-3952, 2003.

VAN LEEUWEN, H. P.; TOWN, R. M. Fundamental features of metal ion determination by stripping chronopotentiometry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 509, p. 58-65, 2001.

WATANABE, C. H.; GONTIJO, E. S. J.; MONTEIRO, A. S. C.; LIRA, V. S.; KUMAR, N. T.; BUENO, C. C.; FRACÁCIO, R.; ROSA, A. H. Toxicity assessment of arsenic and cobalt in the presence of aquatic humic substances of different molecular sizes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 1-8, 2017.

ZHANG, H.; RUIXIA, L.; LEAD, J. R. Combining cross flow ultrafiltration and diffusion gradients in thin-films approaches to determine trace metal speciation in freshwaters. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 109, p. 14-26, 2013.