

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

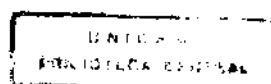
**CARACTERIZAÇÃO FLUORIMÉTRICA DA MATÉRIA
ORGÂNICA DE ORIGEM NATURAL E SUA COMPLEXAÇÃO
COM ÍONS COBRE**

Ana Teresa Lombardi
Orientador: Prof. Dr. Wilson de F. Jardim



A banca examinadora foi constituída por:
Prof Dr. Wilson de F. Jardim (presidente), IQ-UNICAMP
Profa. Dra. Maria M. de Souza Sierra, UFSC
Prof. Dr. Rolf Weber, IO-USP
Prof. Dr. Luis Pires Valente, IQ-UNICAMP
Prof. Dr. Celso Bertran, IQ-UNICAMP
Profa. Dra. Maria Izabel Bueno (suplente), IQ-UNICAMP
Prof. Dr. Walace A. Oliveira (suplente), IQ-UNICAMP

Este exemplar corresponde à redação
final da tese de doutorado defendida
por Ana Teresa Lombardi e aprovada
pela comissão julgadora em 20 de
abril de 1995.



Im-00071606-3

UNIDADE	IQ
Nº DE REGISTRO	24905
TÍTULO	430/95
VOLUME	1
DATA DE REGISTRO	23/06/95

Lombardi, Ana Teresa

Caracterização fluorimétrica d
a matéria orgânica de origem n
atural e sua complexação com i
T/UNICAMP/L838c
DEVOLVER NCME LEIT. (24905/95)

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Lombardi, Ana Teresa
L838c Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica de ori-
gem natural e sua complexação com íons cobre / Ana Teresa
Lombardi. -- Campinas, [SP : s.n.], 1995.

Orientador: Wilson de F. Jardim.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química.

1. Fluorescência. 2. Humus. 3. Complexação. I. Jar-
dim, Wilson de F. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

*Se soubéssemos exatamente o que não
sabemos sobre substâncias húmicas,
então, em princípio, saberíamos muito
mais sobre elas.*

W. Ziehmman

*Ao Amarelo (in memoriam), que me
mostrou o que é a humildade.*

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer primeiramente, e com muito carinho, o *Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim* pela orientação, apoio, amizade e paciência nesses anos de trabalho.

Aos amigos do laboratório de *Química Ambiental* da UNICAMP, pelas várias e frutíferas discussões; em especial à Vera R. Bruno pela cooperação. Aos colegas do Instituto di Biofisica (Pisa, Itália), pelo carinho e receptividade no período em que lá estive.

Ao *Departamento de Química Analítica* da UNICAMP e *Istituto di Biofisica*, através do *Dr. A. Seritti*, pela oportunidade de trabalho a mim concedida.

À *E. Grillo*, pela amizade e cooperação de todos os momentos na Itália e no Brasil.

Aos componentes da banca examinadora pela participação e sugestões.

Ao *Prof. Dr. J. H. Weber* por ter gentilmente doado o ácido fúlvico terrestre, e ao *Prof. Dr. A. Zirino* pelo apoio durante sua breve passagem por Pisa.

Ao *Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq)* pelo apoio financeiro concedido.

Com especial carinho, agradeço:

Ao Prof. Dr. *Peter J. Wangersky* pela atenção e amizade em todos os momentos.

Ao meu irmão *Adriano* pela cooperação e oferecimento do suporte computacional, que em muito facilitaram o desenvolvimento deste trabalho. Aos meus irmãos *Amadeu, Adriano, Alexandre e Ana Rosa* e a minha amiga *Lívia* pela amizade e incentivo.

Aos meus pais por tudo, inclusive pelo que só descobri após o nascimento da *Natália*.

Ao *César*, amigo e companheiro de todos os momentos, pela participação, apoio e especial dedicação na adaptação do modelo de multiligante.

À *Natália*, que faz meus dias (e noites) mais agitados e alegres.

Tabela de conteúdo

I. Introdução geral

I. 1a. Carbono Orgânico Dissolvido.....	15
I. 1b. Substância Húmica	19
I. 1c. Apresentação do trabalho	30

II. Fracionamento da matéria orgânica: CLAE, fase reversa

II. 1. Introdução.....	32
II. 2. Materiais e Métodos.....	35
II. 2a. Preparação das amostras	35
2a.1. Matéria orgânica dissolvida marinha	35
2a.2. Padrões de referência de matéria orgânica	37
2a.3. Branco de procedimento.....	38
II. 2b. Equipamentos e Reagentes	38
II. 2c. Procedimento cromatográfico.....	41
II. 3. Resultados e Discussão.....	42
II. 3a. Cromatografia	42
II. 3b. Calibração	48
II. 4. Conclusão.....	50

III. Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica

III. 1. Introdução.....	51
III. 2. Considerações Teóricas	54
III. 3. Materiais e Métodos.....	59
III. 3a. Fluorescência.....	59
III. 3b. Carbono Orgânico Total (TOC)	64

III. 4. Resultados e Discussão.....	65
III. 4a. Emissão	65
III. 4b. Excitação.....	69
III. 5. Conclusão.....	79
 IV. Complexação da matéria orgânica com íons cobre	
IV. 1. Introdução	80
IV. 2. Considerações Teóricas.....	83
IV. 3. Materiais e Métodos	91
IV. 4. Resultados e Discussão	97
IV. 5. Conclusão.....	111
 V. Conclusão geral	112
 VI. Referências	115
 A. Apêndice	134

Resumo

Matéria orgânica dissolvida de origem marinha, extraída através de resinas Sep-Pak tC18 e ácido fúlvico de solo que sofreu o mesmo procedimento de extração, foram fracionados através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por sistema não destrutivo (absorção no ultravioleta, em 254 nm). Um procedimento metodológico, cuja base é a eluição em etapas foi desenvolvido para este fracionamento. A matéria orgânica foi separada em quatro ou cinco frações com polaridade distintas. Deste modo, a matéria orgânica natural foi desagregada e pode ser caracterizada mais detalhadamente.

Cada fração eluída, bem como a matéria orgânica antes do fracionamento foram analisadas por espectroscopia de fluorescência. Foram feitos espectros de emissão, excitação convencional e excitação sincronizada. Todos os resultados são normalizados por unidade de carbono orgânico de modo a possibilitar comparações entre as diversas amostras. A emissão de fluorescência mostrou que a matéria orgânica terrestre fluoresce em média 5 vezes mais do que a marinha. O espectro de excitação sincronizada mostrou a especificidade de alguns fluoróforos: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (comprimento de onda de excitação/comprimento de onda de emissão) 566/584 nm (marinho), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 405/423 nm (terrestre), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 317/335 nm (terrestre), porém a maioria está presente em ambas as categorias de matéria orgânica.

Experimentos de extinção de fluorescência mostraram que o procedimento utilizado para extração leva não só a uma perda de fluoróforos, mas também a uma perda de ligantes que formam complexos estáveis com o cobre, originalmente presentes na matéria orgânica natural. Na titulação destes ligantes com íons $Cu(II)$, após adaptação do modelo de Ryan e Weber (1982a) para uma situação de multiligantes, valores de K' (constante de estabilidade condicional, da formação do complexo) e CL (concentração de ligante) foram obtidos. Observou-se uma relação linear entre o limite mínimo de fluorescência e a concentração de ligante por unidade de carbono orgânico.

Abstract

Marine dissolved organic matter, which has been extracted by adsorption onto Sep-Pak tC18 and, soil fulvic acid processed in the same way, were fractionated by reverse phase high performance liquid chromatography. Based on a stepwise elution gradient, a methodologic procedure was developed using the non-destructive UV-absorption (254 nm) detection system, to further investigate the chromatographic fractions. The organic materials were fractionated into 4 or 5 chromatographic fractions of differing polarity.

Fluorescence spectroscopy was used to investigate some optical properties of the organic materials, before and after chromatographic fractionation. Conventional emission and excitation, and synchronous excitation spectra were recorded for each sample. For normalization, all results are presented as per unit organic carbon. Emission spectra showed that the soil fulvic acid fluoresces about 5 times more than the marine sample, and that the extraction procedure results in a loss of some fluorophores classes. The synchronous excitation technique revealed the specificity of some fluorophores: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 566/584 nm (marine), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 405/423 nm (soil), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 317/335 nm (marine). Most of them are present in both organic materials.

Fluorescence quenching experiments showed that there is a loss of strong ligands as a result of the extraction procedure. An adaptation of the model described by Ryan and Weber (1982a) to a situation of mutiligands, showed that more than one binding site is less important to the soil fulvic acid than it is for the marine dissolved organic materials. A linear relation was obtained between the minimum fluorescence limit and total ligand concentration per unit organic carbon (CL/TOC).

Lista de abreviações

ACN - Acetonitrila

AFC - Ácido fúlvico de Conway

ANOVA - Análise de variância

°C - Graus Centígrados

CL - Concentração de ligante

CL/TOC - Concentração de ligante por unidade de carbono orgânico total

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-FR - Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

$\delta\lambda$ - (λ_{em} - λ_{ex}), ie, intervalo entre o comprimento de onda de emissão e de excitação

DOM - Matéria orgânica dissolvida

DOMmar - Matéria orgânica dissolvida marinha

HEPES - N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico ácido

I_{ML} - Limite mínimo de fluorescência

K' - Constante de estabilidade condicional

λ - Comprimento de onda

λ_{em} - Comprimento de onda de emissão

λ_{ex} - Comprimento de onda de excitação

MeOH - Metanol

MO - Matéria orgânica

NaAc - Acetato de sódio

não SPak - Resina Sep-Pak tC18 não utilizada

nm - Nanometros

P' - Polaridade de eluição. $\emptyset_a$ e $\emptyset_b$ referem-se ao volume das parcelas de solventes A e B. Símbolos utilizados para o cálculo da polaridade.

Q máx. - (100 - I_{ML})

Sep-Pak tC18 - Resina utilizada (Waters Sep-Pak cartridge, Millipore, E.U.A.)

Te - Tempo de eluição cromatográfico

TOC - Carbono orgânico total

Lista de figuras

	Página
Figura I.1 Composição do carbono orgânico total	16
Figura I.2 Substância húmica em relação ao carbono orgânico dissolvido	17
Figura I.3 Ciclo do carbono orgânico em ambiente marinho	18
Figura I.4 Origem da substância húmica	20
Figura I.5 Algumas estruturas propostas para substâncias húmicas	29
Figura I.6 Resumo esquemático do presente trabalho	35
Figura II.1 Procedimento de extração da matéria orgânica	37
Figura II.2 Procedimento de eluição cromatográfica	40
Figura II.3 Cromatograma com eluições isocrática e contínua	43
Figura II.4 Cromatogramas com eluição em etapas	45
Figura II.5 Variação das áreas de frações em função da polaridade	46
Figura II.6 Curva de calibração	49
Figura III.1 Espectro de excitação sincronizado com correção para o branco	56

Figura III.2 Espectro de emissão com correção para o branco	57
Figura III.3 Espectro de excitação convencional	58
Figura III.4 Curva de calibração (emissão de fluorescência, DOMmar)	60
Figura III.5 Curva de calibração (excitação sincronizada, DOMmar)	61
Figura III.6 Curva de calibração (emissão de fluorescência, excitação sincronizada, AFC)	63
Figura III.7 Curva de calibração (TOC)	64
Figura III.8 Intensidade de emissão de fluorescência relativa	66
Figura III.9 Espectro de emissão de fluorescência (λ_{Ex} 350 nm)	67
Figura III.10 Espectro de emissão de fluorescência (λ_{Ex} 450 nm)	68
Figura III.11 Intensidade de emissão de fluorescência para as frações cromatográficas (gráfico de barras)	69
Figura III.12 Espectro de excitação convencional para as frações cromatográficas	70
Figura III.13 Espectro de excitação sincronizada (DOMmar, AFC)	72
Figura III.14 Espectro de excitação sincronizada (fração 1)	73
Figura III.15 Espectro de excitação sincronizada (fração 2)	74
Figura III.16 Espectro de excitação sincronizada (fração 3)	75
Figura III.17 Espectro de excitação sincronizada (fração 4)	76
Figura III.18 Espectro de excitação sincronizada (fração 5)	77
Figura III.19 Fluoróforos (excitação sincronizada; DOMmar, AFC)	78

Figura III.20 Fluoróforos (excitação sincronizada; MO fracionada)	78
Figura IV.1 Extinção de fluorescência em função do tempo	96
Figura IV.2 Curvas de titulação obtidas com o AFC	98
Figura IV.3 Curvas de titulação obtidas com a DOMmar	99
Figura IV.4 Constante de estabilidade condicional e concentração de ligantes para DOMmar e AFC (gráfico de barras)	106
Figura IV.5 Concentração de ligante em função do tempo de retenção cromatográfico	107
Figura IV.6 Concentração de ligante em função da extinção de fluorescência máxima	108
Figura IV.7 Concentração de ligante em função da extinção de fluorescência máxima (dados da literatura)	109

Lista de tabelas

	Página
Tabela II.I Características dos cromatogramas (NaAc:ACN)	47
Tabela II.II Polaridade de eluição da fase móvel (KCl:ACN)	47
Tabela IV.I Correlação múltipla. Efeito da concentração de HEPES	93
Tabela IV.II Correlação múltipla. Efeito da concentração de KCl	95
Tabela IV.III Correlação múltipla. Complexação DOMmar	100
Tabela IV.IV Correlação múltipla. Complexação AFC	101
Tabela IV.V Características de complexação (K' , CL) DOMmar	103
Tabela IV.VI Características de complexação (K' , CL) AFC	103
Tabela IV.VII Características de complexação (K' , CL) AFC, 3 sítios	104
Tabela IV.VIII ANOVA e Teste de múltiplo contraste (AFC)	105
Tabela IV.IX Características de complexação (dados literatura)	110

Capítulo I



Introdução geral

I. 1a. Carbono Orgânico Dissolvido	15
I. 1b. Substância Húmica	19
I. 1c. Apresentação do trabalho	30

1. 1. Introdução geral

A matéria orgânica natural é representada pelos organismos vivos, seus produtos de excreção e restos após a morte. Pode ser encontrada em grandes depósitos, como os de combustíveis fósseis e solos, ou então em estado disperso, nas águas oceânicas e reservatórios de água doce.

Em ambientes aquáticos, a matéria orgânica natural é categorizada como particulada ou dissolvida. É uma definição operacional, e portanto arbitrária. Porém, é difícil uma definição não operacional para os materiais orgânicos dissolvidos, uma vez que não existe linha divisória entre fitoplâncton, material coloidal (incluindo bactérias e vírus), e macromoléculas (Wangersky, 1994). A definição é baseada no diâmetro do poro do filtro utilizado no processo de amostragem e/ou filtração. Em geral utilizam-se filtros de 0.2 a 0.5 μm de diâmetro de poro. Assim, tudo o que fica retido no respectivo filtro é considerado como sendo *matéria orgânica particulada* ou *carbono orgânico particulado*, e o restante, aquilo que passou através dele, é considerado como *matéria orgânica dissolvida* ou *carbono orgânico dissolvido*.

I. 1a. Carbono Orgânico Dissolvido

O carbono orgânico dissolvido (DOC) forma o maior reservatório de carbono orgânico dos oceanos, que foi calculado ser equivalente ao CO_2 atmosférico (Hedges e Bergamaschi, 1992). O papel

que o DOC exerce no ambiente marinho é fundamental para o entendimento do ciclo do carbono orgânico oceânico, suas relações com o dióxido de carbono atmosférico e processos biogeoquímicos associados com produção e decomposição. A figura I.1 ilustra a relação entre as diversas parcelas de carbono orgânico nos oceanos.

O carbono orgânico dissolvido é formado por uma mistura de moléculas biológicas (ácidos graxos, proteínas, ácidos nucleicos...)

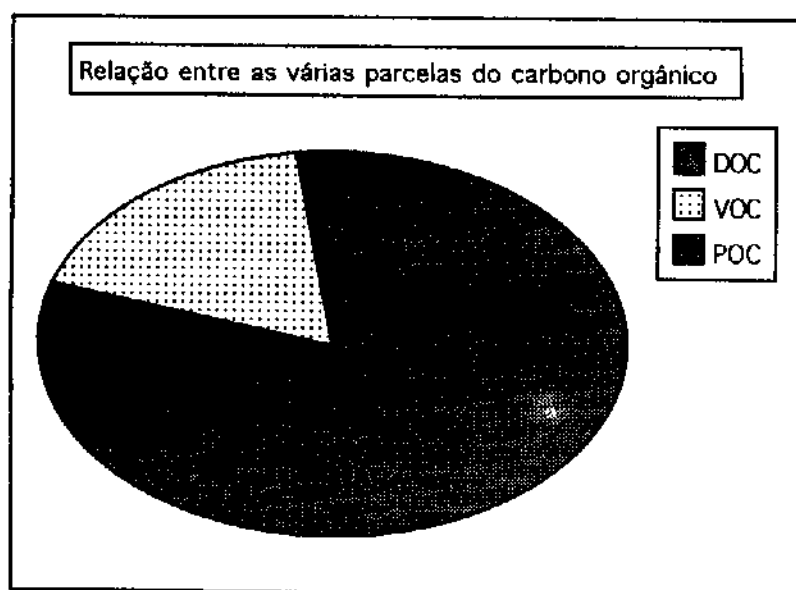


Figura I.1. Provável composição do carbono orgânico total em ambientes marinhos. DOC, VOC, e POC referem-se a carbono orgânico dissolvido, volátil e particulado respectivamente.

degradadas e acredita-se que em sua maioria seja constituído por substância macromolecular de natureza complexa e pouco conhecida (Ishiwatari, 1992), resultando em matéria orgânica que pode ser referida como

'gelbstoff' (Sieburth e Jensen, 1968), matéria orgânica residual (Bada e Lee, 1977), geopolímeros (Saar e Weber, 1982), estrutura detrital dinâmica (Buffle, 1988), ou ainda **substância húmica**.

Em ecossistemas de água doce, Reuter e Perdue (1977) reportam que cerca de 60 - 80% do total de carbono orgânico dissolvido é constituído por substância húmica. Já para o ambiente marinho (alto mar), Williams e Druffel (1987) reportam apenas 20% a 30% do total de carbono orgânico como sendo constituído por substância húmica, enquanto Mantoura e Riley (1975) apresentam o dado de 90%.

Atualmente acredita-se que a concentração esteja em torno dos 60 - 80%, como apresentado em Reuter e Perdue (1977). Estes dados são ilustrados na figura I.2.

Confirmando a alta porcentagem de substância húmica na porção dissolvida no carbono orgânico, a análise de carbono orgânico dissolvido tem sido empregada para determinar a concentração de ácidos húmicos e fúlvicos em águas naturais (Fox, 1983).

As substâncias húmicas, como parte da matéria orgânica dissolvida, constituem componente importante do ciclo do carbono orgânico em ambientes marinhos (figura I.3).

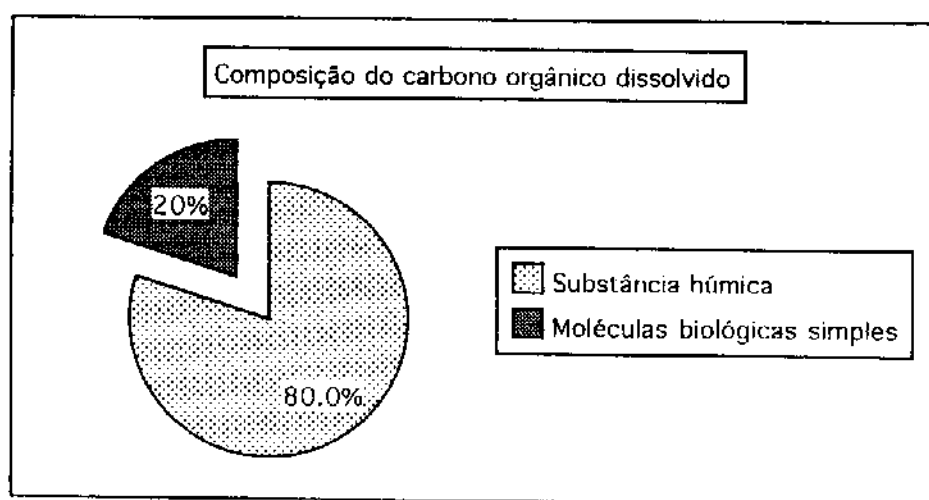


Figura I.2. Contribuição relativa da substância húmica e materiais orgânicos simples em relação ao total de material orgânico dissolvido no ambiente marinho.

A concentração de carbono orgânico dissolvido apresenta-se constante a partir de uma certa profundidade, o que segundo Williams e Gordon (1970) sugere ser formado por material recalcitrante. Bada e Lee (1977), através de datação do material orgânico dissolvido em ambientes marinhos mostram que grande parte do material é inerte ou resistente à degradação química e/ou biológica, e que este é constituído em sua maioria por substâncias húmicas. A idade apresentada em Bada e Lee (1977) varia de 90 a 800 anos para águas superficiais e de 5000 a 6000 anos para águas profundas. Fato confirmado por Williams e Druffel (1987), cujos experimentos baseados em técnicas de datação com

^{14}C e foto-oxidação mostraram uma idade aproximada de 6000 anos para o material orgânico dissolvido marinho.

As principais fontes de entrada de carbono orgânico para os oceanos são por via terrestre e pela atividade dos organismos, destacando-se a fotossintética. Através desta, cerca de $4 \cdot 10^{15}$ moles de CO_2 são fixados em matéria orgânica anualmente nos oceanos. Este valor equivale a cerca de 80% do total produzido no ambiente terrestre e cerca de 10 vezes a emissão antrópica de CO_2 (Smith e Hollibaugh, 1993).

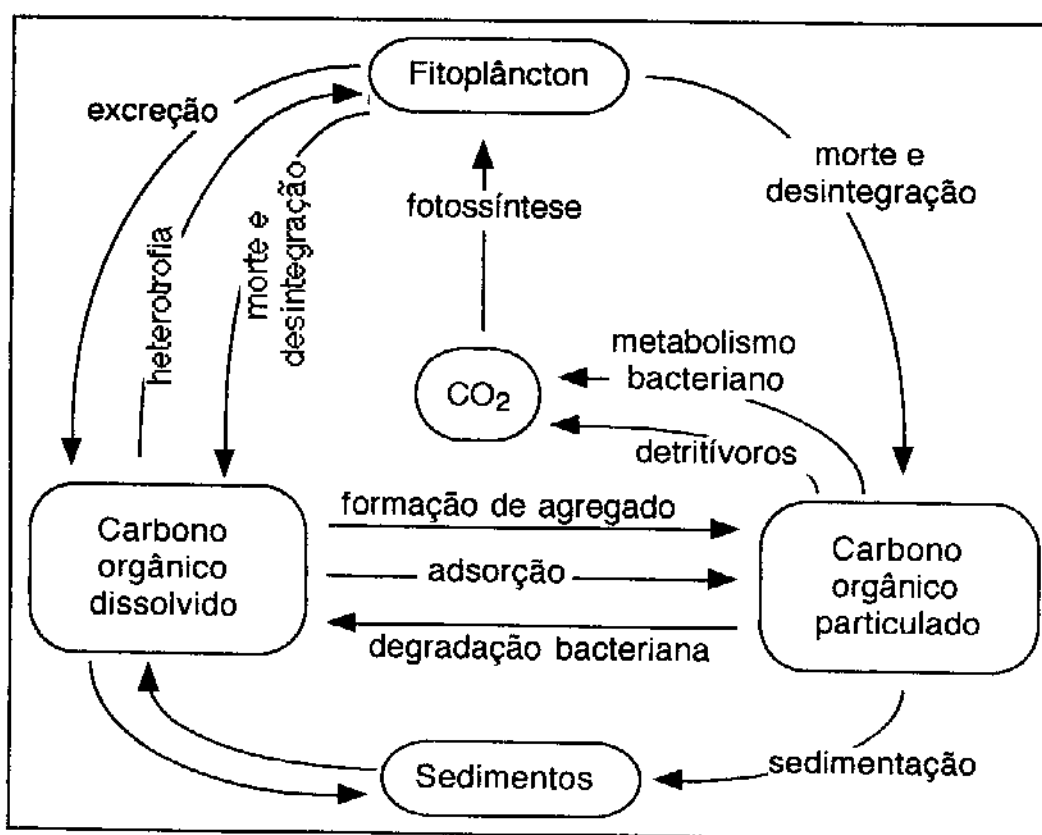


Figura 1.3. Ciclo do carbono orgânico no ambiente marinho. Modificado a partir de Wangersky, 1972.

Apesar dos estudos mostrarem um comportamento conservativo do DOC terrestre nos estuários e zonas costeiras (Mantoura e Woodward, 1983; Carpenter et alii, 1991), contribuindo com cerca de 50% dos fluxos globais de carbono orgânico dissolvido oceânico, estudos de estrutura molecular mostraram que apenas uma pequena

porcentagem da matéria orgânica dissolvida marinha é de origem terrestre (Meyers-Schulte e Hodges, 1986).

Contudo, é difícil falar em contribuição relativa quando apenas uma pequena porcentagem (20 %) do total da matéria orgânica dissolvida é conhecida atualmente. Além disso, uma das vias de entrada de carbono orgânico nos oceanos são os rios, e dados recentes da literatura mostram que não há ainda uma avaliação precisa da contribuição quantitativa dos rios para os oceanos (Milliman, 1993).

Os meios de saída de carbono orgânico são a degradação fotoquímica, utilização por organismos, incluindo a heterotrofia bacteriana e deposição nos sedimentos (Wangersky, 1983).

I. 1b. Substância Húmica

A substância húmica pode ser definida como sendo matéria orgânica natural de alto peso molecular caracterizada por uma coloração de amarelo a marrom escuro. Esta definição é relativamente simples em relação à complexidade do material, o que é certamente gerado pelo conhecimento incompleto de sua molécula. A fração da substância húmica que não é solúvel em água em condições ácidas (abaixo de pH 2), mas sim em pH básico é definida como *ácido húmico*. A fração solúvel em qualquer condição de pH é conhecida por *ácido fúlvico*. *Humina* é a fração insolúvel em qualquer condição de pH, e grandemente formada por querogênio. A figura I.4, modificada a partir de Saar e Weber (1982), mostra as relações entre as substâncias húmicas. Na figura, o processo de decomposição inclui degradação química e biológica, além de reações de síntese.

Acredita-se que a substância húmica seja formada por uma estrutura química complexa e resistente (Hodges, 1988), porém não imune à degradação (Ogura, 1975; Whitehouse et alii, 1984; Zhou e Banks, 1991; De Haan, 1992). Segundo Buffle (1988), se considerarmos a diversidade dos processos naturais de síntese e degradação, o número de constituintes presentes na substância húmica pode ser infinito. Isto

contribui para as dificuldades encontradas na maioria das investigações sobre substância húmica.

A importância da substância húmica no ambiente é amplamente reconhecida. A presença de grupos funcionais, particularmente -COOH e -OH (fenólico), que podem ser protonados e desprotonados na amplitude de pH encontrado em águas naturais (pH 3 - 9), fazendo com que a substância húmica assuma um comportamento polieletrólítico e funcione como agente tamponante de íons metálicos nos ambientes naturais (Saar e Weber, 1982; Samanidou et alii, 1991).

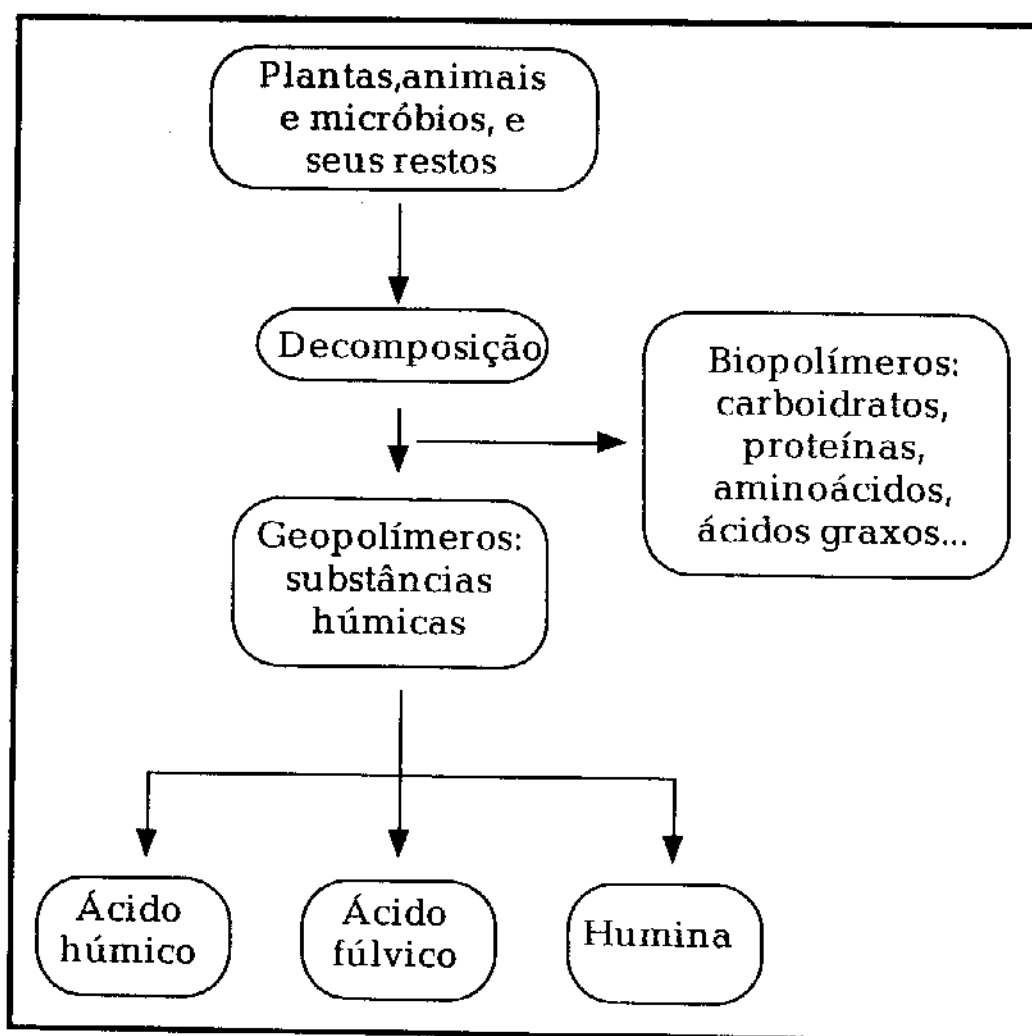


Figura 1.4. Provável origem das substâncias húmicas e suas relações. Modificado a partir de Saar e Weber (1982).

A toxicidade de um elemento químico está intimamente associada com sua especiação no ambiente (Sunda e Lewis, 1978; Wangersky, 1986; Morrison et alii, 1989; Bruland et alii, 1991; Florence et alii, 1992), e metais como cobre e cádmio, quando complexados são menos tóxicos aos organismos do que suas formas hidratadas.

Em ambientes aquáticos, a substância húmica pode alterar a partição dos metais passíveis de complexação, sequestrando ou liberando estes íons para o ambiente. Como resultado, tem-se por exemplo, uma redução na concentração de cobre na forma iônica, e seu aumento na forma complexada, não deixando este elemento atingir níveis tóxicos.

A substância húmica pode também solubilizar formas insolúveis de alguns elementos, como o ferro (Fox, 1984). Além disso, ela altera a habilidade de remoção de metais em processos de tratamento de águas (Saar e Weber, 1982).

Para ser capaz de avaliar a importância das interações metal-matéria orgânica em águas naturais, informações quanto à abundância, natureza molecular, e natureza das interações com os metais devem ser obtidas (Reuter e Perdue, 1977). Várias são as técnicas que têm sido utilizadas com tal finalidade. Voltametria de redissolução catódica (van den Berg e Donat, 1992), métodos de troca de ligante (Hirose et alii, 1982; Tuschall e Brezonik, 1984), voltametria de redissolução anódica (Piotrowicz et alii, 1982), eletrodo íon seletivo (Cabaniss e Shuman, 1986; e Holm e Barcelona, 1988), extinção de fluorescência (Ryan e Weber, 1982a, Ryan e Weber, 1982b; Cabaniss e Shuman, 1988a; Holm e Curtiss III, 1988; Ventry et alii, 1991).

Quando uma amostra de substância húmica é titulada com um metal e o resultado aplicado a um tratamento matemático adequado, valores de constante de estabilidade condicional (K') e concentração de ligante (CL) são obtidos. A maioria das técnicas quantificam a concentração de metal livre, de modo que a diferença entre o metal total e o metal livre é considerada como sendo o metal ligado.

Aproveitando a fluorescência natural da substância húmica, a extinção de fluorescência se distingue da maioria das outras técnicas,

pois quantifica o ligante não complexado, ie, ligante livre. É portanto o único método que quantifica diretamente a substância orgânica. Esta técnica é porém, limitada ao uso de metais paramagnéticos, os causadores da redução do sinal fluorimétrico. A intensidade em que a fluorescência da substância húmica é reduzida varia com o metal utilizado: cobre > chumbo > cobalto > níquel (Saar e Weber, 1980).

Assim como outras técnicas, problemas do tipo variação da constante de estabilidade condicional ao longo da titulação, número de sítios complexantes desconhecidos, e particularmente concentração de metal livre, são variáveis importantes na técnica de extinção de fluorescência. Estes problemas são abordados na seção IV.2 deste trabalho.

Além da complexação com metais, tem sido mostrado que a substância húmica pode também interagir com poluentes orgânicos, tais como DDT, PCBs e outros. O modo de ação vai desde um aumento na solubilidade do agente tóxico, até sua completa imobilização, se o agente tóxico se liga à humina, que é insolúvel (Manahan, 1989; Kango e Quinn, 1992). É bastante comum a reação entre o cloro utilizado em processos de tratamento de águas e substância húmica, formando compostos organo-clorados, reconhecidamente tóxicos (Stevens et alii, 1989).

As substâncias húmicas também participam de reações fotoquímicas em águas superficiais (Jardim e Campos, 1988; Keiber et alii, 1990). Dois efeitos básicos são obtidos sobre a substância húmica mediante a radiação no ultravioleta. Um deles é o efeito degradativo direto da radiação (foto-oxidação), que pode tornar a substância húmica mais suscetível à degradação. O outro efeito associa-se às alterações nos sítios de complexação da substância húmica, podendo resultar na liberação de elementos anteriormente complexados (De Haan, 1992).

Segundo Wangersky (1994), as transformações químicas em águas superficiais marinhas não podem ser totalmente entendidas sem considerar as reações com as substâncias húmicas ou por elas mediadas. Tal entendimento pode ser obtido através do conhecimento sobre as variações na composição das substâncias húmicas ocorridas

através de reações químicas e biológicas, assim como pela entrada de novos materiais de origem terrestre no ambiente marinho.

Um dos problemas enfrentados ao se estudar a substância húmica aquática, particularmente aquela de origem marinha, é a obtenção do material de estudo. Técnicas como adsorção em resinas, extração com solvente, ultrafiltração, liofilização e precipitação podem ser encontradas na literatura (Thurman e Malcolm, 1981). O produto resultante continua sendo qualificado de substância húmica, porém cada técnica isolou e concentrou materiais diferentes, fato que deve ser levado em consideração quando da realização de comparações entre resultados (Malcolm e MacCarthy, 1986). Além disso, uma das preocupações ao se isolar a substância húmica a partir de ambientes aquáticos é a alteração química que esta pode sofrer durante o processo de isolamento (Aiken, 1988).

A utilização de resinas adsorventes apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos: facilidade de processamento de grandes volumes de água em curtos períodos de tempo e remoção de possíveis compostos interferentes. Além disso é considerada uma técnica limpa, ie, exige pouco manuseio da amostra, portanto reduz o risco de contaminação. Contudo, uma desvantagem é a necessidade de limpeza da resina.

As resinas têm sido largamente utilizadas e uma grande variedade de material encontra-se disponível no mercado. Suas diferenças são principalmente baseadas em tamanho do poro, área superficial, composição do polímero e polaridade (Aiken, 1988). Para o isolamento de substância húmica aquática, tem-se dado preferência a XAD-2, XAD-8 e Sep-Pak C18. Segundo Mackey (1983), íons inorgânicos não são pré-concentrados quando utiliza-se a resina Sep-Pak C18, sendo este o motivo pelo qual dá-se preferência para esta em estudos de especiação de metal.

Todavia, ausência de um adsorvente suficientemente geral para remover a maioria das classes de compostos orgânicos dissolvidos nos ambientes aquáticos limita os estudos para grupos discretos de compostos (Wangersky, 1994).

Quando se trabalha com substâncias húmicas, deve-se sempre ter claro que o material isolado depende exatamente do método de coleta, localização e época do ano. Portanto, a utilização de um mesmo método de coleta não assegura ao pesquisador estar trabalhando exatamente com o mesmo material. Segundo Wangersky (1994), muito da confusão sobre substâncias húmicas na literatura pode ser o resultado de diferenças reais na composição do material estudado.

Felizmente, nos últimos anos, com a conscientização dos efeitos da eutroficação e poluição industrial nos oceanos e rios, e com a idéia de que os oceanos não são depósitos de capacidade infinita, cresce o interesse industrial para as técnicas de coleta dos materiais dissolvidos. Assim, inicia-se o desenvolvimento e padronização das técnicas de preparação de amostras.

Em contraposição aos ecossistemas terrestres, isolar quantidade suficiente de substância húmica a partir do ambiente marinho constitui por si só um desafio. Tal dificuldade é resultante da presença do material orgânico em baixa concentração e em meio com grande quantidade de sais. Segundo Harvey et alii (1983), as dificuldades em obtenção de quantidade suficiente de material a partir de ambientes marinhos parece ser a responsável pela defasagem na literatura quando se compara com o ambiente terrestre. Outro problema que surge ao se comparar a substância húmica do ambiente marinho com aquela do ambiente terrestre ou dulcícola é a metodologia de coleta e preparação da amostra. Estas são em geral diferentes uma da outra.

Análises recentes mostram que a concentração de carbono orgânico dissolvido nos oceanos é da ordem de 1 a 2 mg.l⁻¹ (Chen e Wangersky, 1993), atingindo um valor máximo de 5 mg.l⁻¹ (Wangersky, 1994).

Considerando os dados de Chen e Wangersky (1993), a concentração da substância húmica marinha é da ordem de 0.8 mg.l⁻¹. Porém com uma eficiência de retenção entre 20 e 30% da resina Sep-Pak tC18 (este trabalho) e menos de 20% quando se considera a resina XAD-2 (Ishiwatari, 1992), uma concentração equivalente a 0.2 mg.l⁻¹ são analisados. Com uma concentração de 10 mg.l⁻¹ (Reuter e Perdue, 1977),

tal problema praticamente inexistente em ambientes de água doce, ou mesmo nos solos, que constituem por si só um reservatório de substância húmica.

Várias são as linhas de pesquisa e técnicas disponíveis para a caracterização das substâncias húmicas após sua extração. A fluorescência é uma das poucas técnicas que investiga a substância húmica em concentrações e condições naturais, inclusive em águas marinhas e estuarinas (De Souza Sierra, 1992). A seguir são citados alguns exemplos.

- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Saleh et alii, 1983; Wein-Brukner et alii, 1990),
- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Marley et alii, 1992),
- Espectroscopia de fluorescência (Zepp e Schlotzhauer, 1981; Miano et alii, 1990; Miano e Senesi, 1992; Mopper e Schultz, 1993),
- Ressonância eletrônica de spin (Senesi et alii, 1989; Filip et alii, 1991),
- Espectrometria de massa (Saleh et alii, 1983),
- Fotodegradação induzida por radiação no UV (Kieber et alii, 1990),
- Propriedades ácido-básicas (Gomez et alii, 1991),
- Análises de grupos funcionais (Cameron e Sohn, 1992; Cabaniss, 1991; Arsenie et alii, 1992),
- Degradação química (Michaelis et alii, 1989)
- Estudos sobre complexação com metais (Perdue, 1989; Ventry et alii, 1991),
- Composição elementar (Alberts et alii, 1988; Rice e MacCarthy, 1991),
- Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (Susic e Boto, 1989), e com detecção por absorção no U.V. (254 nm) (Lombardi et alii, 1992),
- Cromatografia gasosa (Casella, 1990)
- Cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama (Zhou e Wangersky, 1987; Parrish et alii, 1988),

Ainda que não forneça informações sobre o mecanismo de retenção da substância húmica na fase sólida, a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) é uma técnica bastante difundida nas pesquisas com matéria orgânica de origem natural (Mills e Quinn, 1981; Susic e Boto, 1989; Lombardi et alii, 1992). Horvath et alii (1976) classificou esta técnica de cromatografia hidrofóbica, ie, separação de compostos relativamente polares em colunas de fase reversa.

A complexidade da substância húmica causa sérias dificuldades nos processos de fracionamento. No caso da CLAE-FR, até o presente momento, todas as tentativas de separação em compostos de relativa pureza falharam. O que se tem é o fracionamento em grupos de compostos com características semelhantes. Com isso, torna-se quase obrigatório o acoplamento de técnicas analíticas para a obtenção de novas informações.

Marley et alii (1992) aplicaram técnicas como a espectroscopia de ressonância nuclear magnética (NMR), espectroscopia no infravermelho com transformação de Fourier (FTIR) e cromatografia gasosa em amostras de substância húmica previamente fracionadas por massa molecular. Também baseado em massa molecular, Hayase e Tsubota (1984) aplicaram a CLAE-FR em suas frações. Lombardi et alii (1994) (ver apêndice) investigaram as propriedades de fluorescência em substância húmica previamente fracionada por polaridade.

A determinação da massa molecular dos ácidos húmico e fúlvico tem sido feita por cromatografia em gel. O resultado é a obtenção de diversas frações com massas moleculares distintas (Miles e Brezonik, 1983; Sugimura e Suzuki, 1988; Rausa et alii, 1991). Técnicas como a ultrafiltração podem também ser utilizadas para essa finalidade (Stuermer e Harvey, 1974; Ogura, 1974; Wilson e Weber, 1977; Hayase e Tsubota, 1984). Uma revisão sobre a determinação de massas moleculares em amostras de substâncias húmicas pode ser encontrado em De Nobili et alii (1989).

A massa molecular da substância húmica marinha, segundo Lee e Wakeham (1992), não ultrapassa os 2000 D. Outros trabalhos, porém, têm mostrado que a substância húmica marinha apresenta

massa molecular oscilando entre 1800 e 60000 (Sugimura e Suzuki, 1988). Carlson, et alii (1985) obtiveram pesos moleculares maiores que 100000 para 6% da matéria orgânica dissolvida, entre 1000 e 30000 D para cerca de 30% e o restante era menor que 1000 D. No presente trabalho, uma avaliação preliminar sobre a massa molecular da substância húmica marinha através de cromatografia em gel de alta eficiência mostrou que 30% apresenta massa molecular menor do que 1000 D, 65% entre 1000 e 13000, e o restante (5%) maior do que 81000 D.

Uma das características fundamentais de uma substância química é sua composição elementar, que em se considerando substâncias húmicas, refere-se às propriedades médias da molécula. Além disso, a composição elementar é o primeiro passo para a descrição da estrutura molecular. Após analisarem cerca de 650 amostras, Rice e MacCarthy (1991), em uma avaliação estatística sobre a composição elementar das substâncias húmicas, mostraram que a porcentagem de carbono (55/56%), hidrogênio (5.0/6.0%) e oxigênio (36/32%) são semelhantes para os ácidos húmicos de solo (terrestre) e marinho, e que a principal diferença entre estas duas classes de materiais orgânicos é a quantidade de enxofre, o marinho apresentando 3.1% e o terrestre 0.8%. Através da relação H/C, os autores mostraram que ácido húmico marinho é o menos aromático entre as amostras analisadas, incluindo amostras terrestres.

A correspondência entre substância húmica e *gelbstoff* marinho direcionou o interesse das pesquisas no sentido de suas propriedades de fluorescência (Sieburth e Jensen, 1968; Chen e Bada, 1990), particularmente porque a coloração amarelo da substância húmica e sua fluorescência induzida pela luz do sol, interferem em estimativas feitas através de sensoriamento remoto (Ferrari e Tassan, 1991).

Estudos de fluorescência de substâncias húmicas têm sido utilizados para caracterizar a natureza e origem da matéria orgânica em águas naturais (De Souza Sierra e Donard, 1991; Momzikoff et alii, 1992; Coble et alii, 1993), sua estrutura (Senesi, 1990; Senesi et alii, 1991), e interações com íons metálicos e compostos orgânicos (Ryan e Weber, 1982a, 1982b; Senesi, 1990; Ventry et alii, 1991).

As bandas de emissão de fluorescência de substâncias húmicas são amplas e não são fixas mediante variação no comprimento de onda de excitação. Isto mostra a complexidade do material e as várias classes de fluoróforos envolvidos.

Recentemente foi observado que há um deslocamento do máximo de emissão para comprimentos de onda mais curtos da substância húmica de origem marinha em relação a terrestre (Coble et alii, 1990; De Souza Sierra, 1992), o que pode ser devido ao diferente grau de substituição de hidroxilas nos anéis fenólicos (Bloom e Leenheer, 1989).

Atualmente acredita-se que a substância húmica de origem marinha seja oriunda principalmente de microalgas (Hoyt, 1970; Sieburth e Jensen, 1968; Wilson et alii, 1983) e a terrestre de vegetais superiores, ricos em tanino e lignina. Vários trabalhos da literatura mostram as microalgas como fonte dos precursores da substância húmica no ambiente marinho. Benner et alii (1992) mostra que aproximadamente 50% do total da matéria orgânica dissolvida marinha em águas superficiais é constituído por polissacarídeos, e que esta porcentagem sofre uma redução para 25% em águas profundas. Este resultado confirma a atividade fitoplanctônica na formação da matéria orgânica dissolvida marinha.

Estudos de degradação confirmam um caráter mais alifático para a substância húmica de origem marinha (Ishiwatari, 1992), e um mais aromático para a de origem terrestre (Stuermer e Payne, 1976), o que está certamente associado às diferentes origens.

A definição de um modelo estrutural da substância húmica deve ser consistente com suas propriedades. Porém, a complexidade da molécula, mais uma vez causa sérias dificuldades a esta tarefa.

Características da substância húmica, tais como seu caráter polidisperso: diversos valores de pesos moleculares; polieletrólitos: cada molécula carrega consigo um grande número de cargas elétricas; polifuncional: cada composto individual apresenta um número pequeno de sítios complexantes, mas considerando a molécula como um todo, o número de sítios é grande (ainda não definido) limitam o desenvolvimento de um modelo estrutural da molécula.

Ziechmann (1988) discute a evolução dos modelos estruturais para substâncias húmicas. Uma tentativa de formulação de estrutura para a substância húmica marinha é apresentada em Harvey et alii (1983). Esta estrutura porém, segundo Laane (1984) não apresenta fluorescência no azul, como é o caso das substâncias húmicas marinhas. Laane (1984) apresenta derivado da base de Schiff ($-N=C-C=C-N-$) como estrutura responsável pela fluorescência da substância húmica marinha. Pauli (1967) apresenta uma estrutura para a molécula de substância húmica, que pode ser considerada um sistema. Mais recentemente, e baseado na composição de blocos construtores da substância húmica, Schulten et alii (1991) propõem nova estrutura para substâncias húmicas de origem terrestre. Algumas estruturas são mostradas na figura I.5.

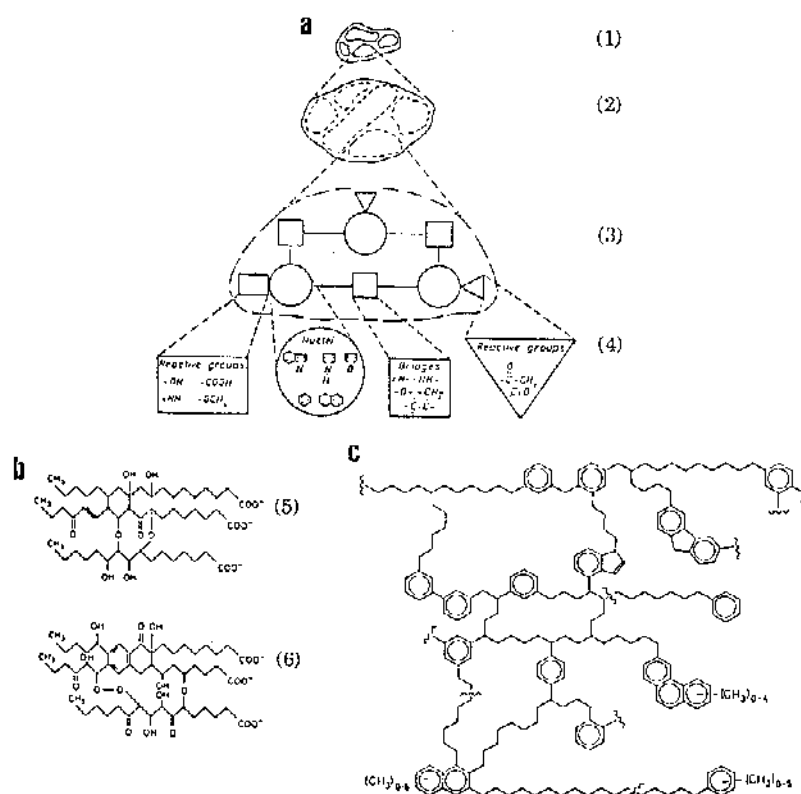


Figura I.5. Propostas de estruturas para substâncias húmicas de origem marinha e terrestre. (a) Pauli, 1967: (1) partícula de húmus, 300 a 400 Å, (2) bloco construtor grande, 100 a 160 Å, (3) bloco construtor, 30 a 45 Å, rocha construtora, 8 a 15 Å, com núcleos, pontes e grupos reativos. (b) Harvey et alii, 1983: (5) ácido fúlvico marinho, (6) ácido húmico marinho e (c) Schulten et alii (1991).

I. 1c. Apresentação do trabalho

Este trabalho tem como objetivo principal caracterizar a matéria orgânica de origem natural e avaliar sua complexação com o metal cobre. A parte experimental foi realizada no *Istituto di Biofisica* (CNR), entidade governamental de pesquisa localizada em Pisa, Itália. A figura I.6 mostra, esquematicamente, o que foi realizado.

Em vista do alto grau de complexidade desta matéria orgânica, foi primeiramente desenvolvido um procedimento que possibilitasse sua separação (CLAE-fase reversa, seção II) em frações, pois estas tendem a ser mais homogêneas em comportamento. A fluorescência, por ser um método espectrométrico de alta sensibilidade e não destrutivo foi escolhida como ferramenta para caracterização da matéria orgânica antes e após o fracionamento cromatográfico (seção III). Em seguida, foram então verificadas as interações de cada fração e da matéria orgânica não fracionada com o metal paramagnético cobre, que ao se complexar à matéria orgânica, causa uma redução do sinal fluorimétrico. Neste caso, a quantificação foi feita através da técnica de extinção de fluorescência (seção IV). A fim de obter as constantes de estabilidade condicional e concentração de ligante, através do tratamento dos dados, foi desenvolvido um modelo matemático a partir daquele proposto por Ryan e Weber (1982a). O modelo é apresentado na seção IV, sob o título 'considerações teóricas'.

Como já mencionado anteriormente, a substância húmica é formada *in situ* pelas moléculas biológicas e atividade microbiana existentes em um determinado local, sua composição pode sofrer variações de uma região para outra. Segundo Cabaniss e Shuman (1988b), as variações na composição de tais materiais podem complicar comparações entre resultados. Os autores propõem a utilização de um padrão de referência como solução a este problema. No presente trabalho, como padrão de referência foi utilizado um ácido fúlvico de solo (Weber e Wilson, 1975) doado pelo Prof. James H. Weber da Universidade de New Hampshire (E. U. A.). É um material purificado e que vem sendo estudado pelo seu grupo de trabalho. Todas as análises

foram portanto realizadas, pelo menos, com o padrão de referência e a matéria orgânica dissolvida marinha.

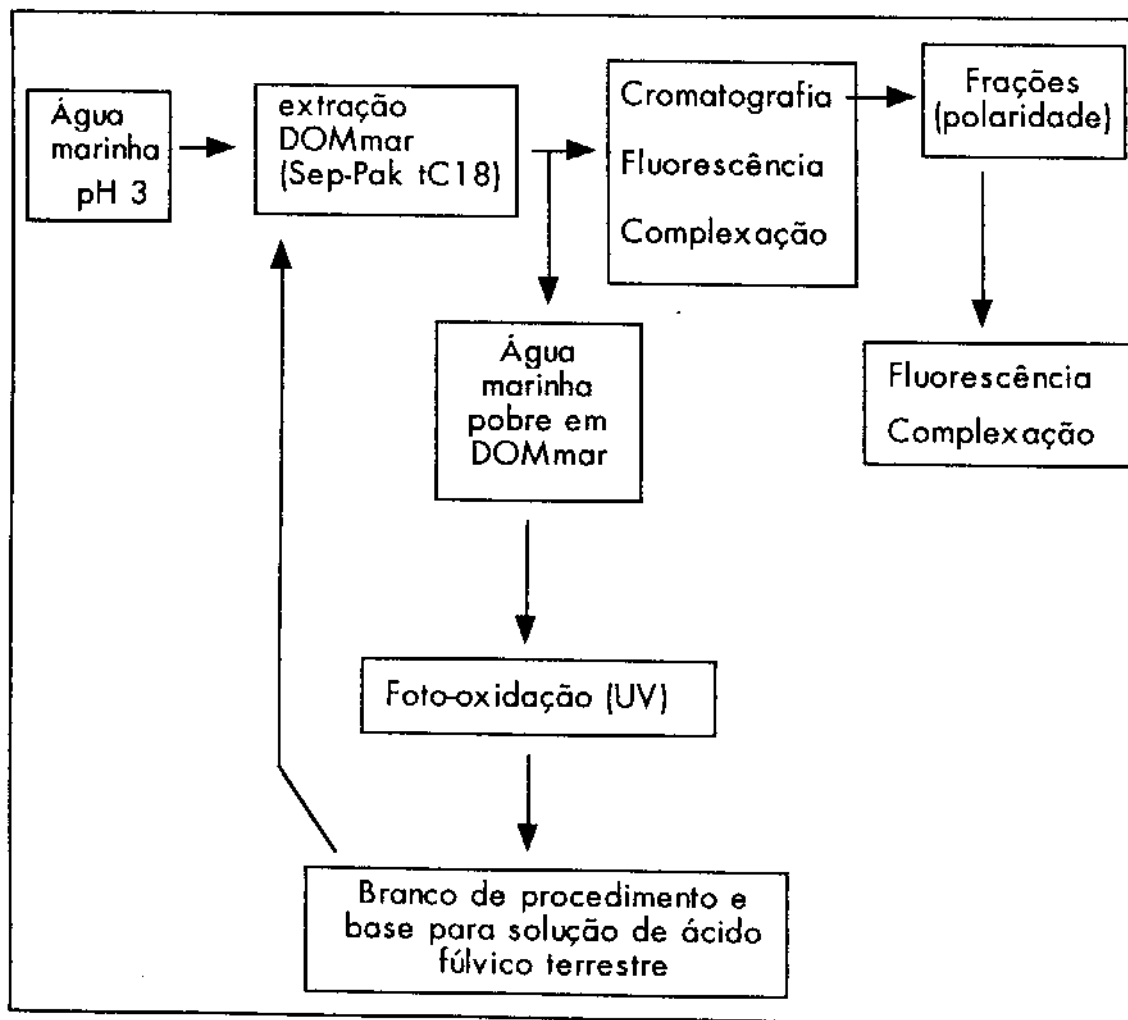


Figura 1.6. Resumo esquemático do desenvolvimento do presente trabalho. DOMmar refere-se a matéria orgânica dissolvida marinha.

Capítulo II

Fracionamento da matéria orgânica: CLAE, fase reversa

II. 1. Introdução.....	32
II. 2. Materiais e Métodos	35
II. 2a. Preparação das amostras.....	35
2a.1. Matéria orgânica dissolvida marinha	35
2a.2. Padrões de referência de matéria orgânica	37
2a.3. Branco de procedimento.....	38
II. 2b. Equipamentos e Reagentes.....	38
II. 2c. Procedimento cromatográfico	41
II. 3. Resultados e Discussão	42
II. 3a. Cromatografia	42
II. 3b. Calibração.....	48
II. 4. Conclusão	50

II. 1. Introdução

Em águas naturais, a matéria orgânica dissolvida, é formada por uma grande variedade de compostos desconhecidos resultando no que se pode chamar de “estrutura detrital dinâmica” (Buffle, 1988). Esta complexa mistura de compostos termina por resultar em sérias dificuldades para sua completa separação e caracterização. Com isso, uma quantidade substancial de informações quanto à natureza e papel das substâncias húmicas nos ecossistemas são obtidas a partir do estudo de frações da substância com características semelhantes.

Apesar da inabilidade, até o presente momento, de se caracterizar por completo as substâncias húmicas, segundo Reuter e Perdue (1977) uma aproximação pode ser obtida através do estudo de suas parcelas .

O fracionamento cromatográfico é uma das possibilidades para o estudo de parcelas da substância húmica. Fazendo isto, as características investigadas podem ser mais facilmente distinguíveis, e novas propriedades detectadas. Porém, a complexidade da molécula, ainda que fracionada, permanece.

A necessidade de caracterização das substâncias húmicas deve-se principalmente ao seu papel no ambiente. Sabe-se que esta classe de matéria orgânica natural atua sobre o comportamento e mobilidade de metais no ambiente, tanto de elementos traços como também de metais derivados de poluição (Mills et alii, 1987; Zhou et alii, 1989). Além disso, as substâncias húmicas apresentam importante papel em processos biogeoquímicos (Mantoura, 1981).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido frequentemente utilizada para a separação da matéria orgânica dissolvida de origem natural (Mills e Quinn, 1981; Hayase e Tsubota, 1984; Saleh e Chang, 1987; Susic e Boto, 1989; Grasso et alii, 1990; Lombardi et alii, 1992, ver apêndice). Devido à complexidade da matéria orgânica, o acoplamento metodológico é uma das tendências que se observa como uma tentativa para sua melhor caracterização. Hayase e Tsubota (1984) utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para investigar ácido fúlvico que havia sido previamente fracionado por peso molecular. Os autores concluíram que há uma diminuição no grau de hidrofobicidade da amostra com o aumento do peso molecular.

MacCarthy et alii (1979) utilizando resina XAD-8 para concentrar a matéria orgânica dissolvida, e gradiente de pH 3 até 11 para sua eluição, obtiveram o fracionamento em apenas duas classes de compostos, os ácidos húmico e fúlvico. Susic e Boto (1989), interessados na detecção de substância húmica em águas naturais propuseram um procedimento para cromatografia líquida de alta eficiência e em fase reversa que chega a nível de ppb, porém em termos de fracionamento cromatográfico, os autores obtiveram apenas uma fração. Saleh e Chang, (1987), através da cromatografia líquida de alta eficiência e em fase reversa e utilização de diversas fases móveis com gradiente isocrático, e gradiente de eluição em etapas, obtiveram apenas dois picos. Zhou e Wangersky (1987) utilizando a cromatografia de camada delgada com posterior detecção por ionização em chama (TLC/FID) conseguiram o fracionamento de matéria orgânica dissolvida de origem marinha em 4 grupos de compostos, porém com um sistema de detecção destrutivo. Frimmel et alii (1992), utilizando a CLAE com diversos sistemas de detecção, dentre eles a fluorescência e carbono orgânico dissolvido, detectaram apenas duas frações de matéria orgânica.

A alta complexidade da matéria orgânica de origem natural e a falta de conhecimento do seu mecanismo de retenção em sistemas de fase reversa parecem ser os principais responsáveis pelas dificuldades enfrentadas e controvérsias da literatura.

O objetivo desta parte do trabalho foi o de separar cromatograficamente tanto quanto possível os vários componentes da matéria orgânica dissolvida. Seria ingenuidade assumir em qualquer instante que esta complexa substância orgânica seria separada em substâncias puras através da cromatografia utilizada (cromatografia líquida de alta eficiência e em fase reversa). Foi realizado aqui um fracionamento da matéria orgânica dissolvida em 5 grupos de compostos orgânicos com diferentes características de polaridade. O procedimento foi primeiramente desenvolvido com solução de acetato de sódio como um dos solventes (Lombardi et alii, 1992, ver apêndice), mas devido à necessidade de análises de carbono orgânico total, e controle da força iônica para os experimentos de complexação, a solução de AcNa (acetato de sódio) foi posteriormente substituída por uma solução de KCl.

II. 2. Materiais e Métodos

II. 2a. Preparação das amostras

2a.1. Matéria orgânica dissolvida marinha (DOM_{mar})

A água marinha utilizada no presente trabalho foi coletada a cinco quilômetros de Capraia, um arquipélago da região de Toscana (Itália), no mar Mediterrâneo. A coleta foi feita a aproximadamente um metro da superfície e transferida para recipientes de polietileno com capacidade para 10 a 20 litros. Tais recipientes foram previamente lavados com ácido clorídrico diluído (10%) e com água do mar do próprio local de coleta. A coleta foi feita em sentido contrário ao da corrente local e contra a direção do vento. No laboratório, a água foi filtrada (sob pressão de nitrogênio) em filtros de membrana de 0.45 µm (Sartorius) pré-lavados com HNO₃ 3M e 0.8M, e que haviam sido deixados em imersão em água Milli-Q até o momento de uso. A lavagem com o ácido é necessária uma vez que tais filtros continuam a liberar metais pesados como cádmio e chumbo mesmo após a passagem de um litro de água. Após o processo de filtração, a água do mar era estocada em uma câmara fria, a 4 °C, até o momento de uso. A coleta, o tratamento da água marinha e a limpeza do material foram realizados segundo o procedimento descrito em Mart (1979a) e Mart (1979b).

A extração da matéria orgânica dissolvida marinha foi realizada com o uso de colunas descartáveis Sep-Pak tC18 (Water Associates). Em relação à Sep-Pak clássica, as tC18 são empacotadas com uma maior quantidade de SiC18H37 e apresentam ligação trifuncional ao invés de monofuncional, além de maior homogeneidade no tamanho das partículas (37 - 55 μm ao invés de 55 - 105 μm). Duas resinas têm sido utilizadas com maior frequência para o isolamento e extração de matéria orgânica dissolvida de ambientes aquáticos, Sep-Pak e XAD. Apesar da XAD isolar cerca de 50% da DOMmar, quantidade considerada alta, segundo Mills et alii (1987), há possibilidades de ocorrência de reação entre a matéria orgânica e a resina. Com a Sep-Pak, há uma diminuição destas possibilidades, pois trata-se de um sistema de fase reversa, onde as forças interativas envolvidas no processo de retenção são mais fracas.

Com o auxílio de uma seringa descartável lavada com ácido diluído, a coluna Sep-Pak tC18 era condicionada através da passagem consecutiva de 10 ml de metanol (J.T. Baker, Holland, grau HPLC de pureza), 10 ml de HCl (Suprapur, Merck, Germany) em uma concentração de $3 \cdot 10^{-4}$ M para remoção de traços de metais presente na coluna, novamente 10 ml de metanol, e finalmente 20 ml de água Milli-Q. Com o cuidado de não deixar a coluna Sep-Pak tC18 secar internamente, esta era posicionada na porção terminal de um tubo de silicone conectado a um recipiente com 2 litros de água do mar ajustada para pH 3 (HCl, suprapur) à temperatura ambiente. A passagem da água do mar através da Sep-Pak tC18 era realizada sob atmosfera de nitrogênio e com uma vazão de $12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Após a passagem de toda a água marinha, a Sep-Pak tC18 era lavada com 20 ml de água Milli-Q para remoção dos sais marinhos. Em seguida, a DOMmar presente na Sep-Pak tC18 era eluída com 10 ml de uma solução metanol:água (85:15, v/v), como descrito em Mills et alii (1987). A DOMmar era coletada em tubos de centrifuga de polipropileno lavados com ácido diluído e enxaguados com água Milli-Q. Estes tubos, contendo a DOMmar em metanol, eram submetidos a um processo de secagem a frio em uma centrifuga (Hetovac) acoplada a um liofilizador (Edwards-Modulyo). Após secagem, os tubos de centrifuga, então com a

DOMmar, eram fechados e reservados no escuro em uma câmara fria até o momento de uso, o que não excedia 3 a 4 semanas. A acidificação da água do mar antes de passar através da Sep-Pak tC18 é feita com a intenção de aumentar o caráter hidrofóbico da matéria orgânica, o que aumenta a quantidade de material que fica retido na coluna Sep-Pak (Mills et alii, 1987). A figura II.1 ilustra o procedimento utilizado para a extração de matéria orgânica.

Segundo o procedimento acima descrito, a eficiência de retenção da DOMmar pela Sep-Pak tC18 foi de cerca de 20%, sendo quantificada através de absorbância em 254 nm.

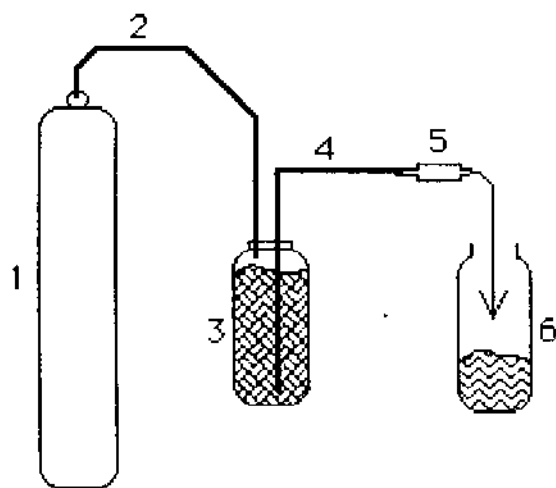


Figura II.1. Procedimento para extração de matéria orgânica. (1) nitrogênio; (2) fluxo de gás; (3) água do mar; (4) fluxo de água; (5) Sep-Pak tC18; (6) água do mar pobre em matéria orgânica dissolvida.

2a.2. Padrões de referência de matéria orgânica (MO)

Substância húmica comercial (SH) (Fluka Chemie, Switzerland lote No. 35069 989) e ácido fúlvico (AF) obtido através do padrão comercial e ácido fúlvico de

Conway (AFC) gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. J. Weber da University of New Hampshire, foram os padrões de referência utilizados neste trabalho. O ácido fúlvico de Conway foi extraído de solo tipo podzol originário de Conway, NH, E.U.A. O procedimento de extração, purificação e análise do AFC pode ser encontrado em Weber e Wilson (1975).

A substância húmica comercial foi utilizada tanto sem ser submetida a qualquer processo de purificação, como também após sua separação nos ácidos fúlvico e húmico. Para tal, uma certa quantidade

com HCl, e o sobrenadante centrifugado e filtrado através de filtros de membrana (Sartorius) com 0.2 μm de diâmetro de poro. A solução restante foi então neutralizada (pH 7) com NaOH e mantida a 4 °C por 24 horas. A fração insolúvel foi removida por centrifugação e filtragem. A amostra líquida (ácido fúlvico e sais) foi posteriormente dializada em tubos de celofane (Medicell International, Londres) e seca a vácuo. O processo de purificação da SH empregado é uma modificação daqueles descritos em Boussemart et alii (1989) e Castetbon et alii (1986).

Quando os padrões de referência eram analisados, estes eram dissolvidos em água do mar pobre em matéria orgânica resultando em solução 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Esta mesma água do mar era utilizada para a realização do branco de procedimento. As soluções de MO 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ sofriam então os mesmos procedimentos das amostras de DOMmar, ie, concentração e extração da MO na coluna Sep Pak tC18 e secagem a frio.

2a.3. Branco de procedimento

Para a realização de brancos de procedimento, dois litros de água do mar previamente passados através de coluna Sep-Pak tC18 eram acrescidos de 1 ml de peróxido de hidrogênio (Carlo Erba) e distribuídos em tubos de quartzo (100 ml cada) fechados com tampas de Teflon®. Os tubos eram então foto-oxidados durante um período de 9 a 11 horas por irradiação com uma lâmpada de mercúrio de alta pressão com 1 KW de potência. Verificação através de fluorescência e absorbância em 254 nm mostrou que esta água marinha era pobre em matéria orgânica e foi então utilizada como branco de procedimento.

II. 2b. Equipamentos e Reagentes

Para o fracionamento da MO foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). O sistema cromatográfico encontrava-se acoplado a um integrador Hewlett-Packard (modelo HP3396 Série II), era equipado com duas

sistema cromatográfico encontrava-se acoplado a um integrador Hewlett-Packard (modelo HP3396 Série II), era equipado com duas bombas LKB 2150, um programador de solvente LKB 2152, um injetor com capacidade para 250 µl (Rheodine, Califórnia, E.U.A.), e um detector de ultravioleta ajustado para 254 nm (Pharmacia LKB, Uvicord SD). O integrador era ajustado para uma velocidade do papel de 0.2 mm·min⁻¹, exceto no período de 0.8 a 4 minutos, onde a velocidade foi mantida em 0.5 mm·min⁻¹.

Uma coluna analítica comercial empacotada com sílica ligada a octadecil com diâmetro de 5 µm para CLAE (Spherisorb) com 250 x 4.6 mm D.I. (Violet, Phase Sep) foi utilizada em conexão a uma pré-coluna (50 x 4.6 mm D. I.) empacotada com o mesmo material. Com o objetivo de proteger ambas as colunas de qualquer material particulado, um filtro de Teflon® (Alltech, USA) com 2 µm de diâmetro de poro foi conectado entre o injetor e a pré-coluna e utilizado rotineiramente. Onde possível tubos capilares de Teflon® ou PEEK (Alltech) eram utilizados para as linhas cromatográficas. Com a finalidade de evitar contaminação por fungos, quando não em uso, todo o sistema cromatográfico era deixado repousar em uma solução de água:acetona, 95:5 (v/v).

A recuperação da DOMmar do sistema cromatográfico, que era de cerca de 95%, foi avaliada através de absorção em comprimento de onda fixo de 254 nm e também por emissão de fluorescência (λ_{ex} 320 nm, λ_{em} 410 nm) para as amostras submetidas a uma fase móvel contendo acetato de sódio. Para aquelas tratadas com KCl na fase móvel, a recuperação foi avaliada através de carbono orgânico total (Dorhamnn DC-190), e o resultado foi de 99%. As medidas de absorção foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro JASCO UVIDE-510 (modelo HMC 538) com cuvetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico para os extratos de DOMmar e de 5 cm para a água do mar natural. As análises de fluorescência foram realizadas através de um espectrofluorômetro JASCO Fluorometer (modelo FP 770) ajustado para 5 e 10 nm de amplitude de banda para os monocromadores de excitação e emissão respectivamente. Todas as medidas foram realizadas em pH 6.5- 7.0, em solução de NaAc ou KCl, e filtradas em filtros de membrana

de 0.2 μm de diâmetro de poro (Sartorius). A temperatura ambiental foi mantida em $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

Água Milli-Q, Millipore (Bedford, MA, E.U.A.) foi utilizada durante todo o processo experimental deste trabalho.

Os solventes acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) foram de grau HPLC de pureza e fornecidos por J.T. Baker (Holanda). O primeiro foi utilizado como parte da fase móvel no gradiente cromatográfico e o segundo para a eluição da matéria orgânica das colunas Sep-Pak tC18. Também utilizado como fase móvel, foram soluções de acetato de sódio (NaAc) e KCl. NaAc foi fornecido por Carlo Erba (Milão) e utilizado em solução com concentração de $5 \cdot 10^{-2}$ M e pH 7. KCl (Suprapur, Merck) foi utilizado em solução com concentração de $4 \cdot 10^{-3}$ M, e pH 7.

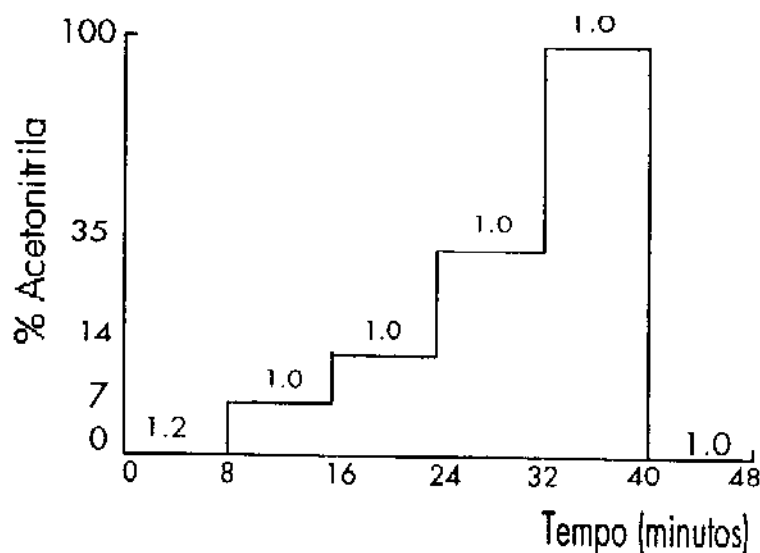


Figura II.2. Procedimento de eluição em etapas utilizado para o fracionamento de matéria orgânica. O número acima de cada etapa indica o fluxo da fase móvel ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

O volume morto, ie, o tempo que demora para uma substância não retida passar através da coluna e chegar no detector, foi medido através da injeção de metanol.

Como mostrado em Dolan

(1991), a injeção de metanol leva a um distúrbio da linha de base, ocasionado pela alteração do índice de refração, de modo que o volume morto pode ser quantificado. Nas condições utilizadas, o volume morto foi de aproximadamente 2,5 ml.

II. 2c. Procedimento cromatográfico

O procedimento proposto é a eluição em etapas com mistura programada dos solventes NaAc:ACN (97:3) v/v ou KCl:ACN (98:2) v/v como solvente A, e ACN 100% como solvente B, formando então a fase móvel. Com uma amplitude de polaridade de eluição entre 8,68 e 10,06 (AcNa), e 8,60 e 10,11 (KCl) foi possível a separação da DOM em até 5 frações distintas. A quantidade traço de ACN previamente adicionada à solução de KCl ou NaAc tem por finalidade diminuir o ruído da linha de base causado pela mistura dos solventes. Além disso sabe-se que quantidades traço de solvente orgânico na fase móvel atuam na umidificação da coluna (hidrofóbica em cromatografia de fase reversa), aumentando então o equilíbrio através das duas fases altamente dissimilares (hidrocarboneto e aquosa) (Snyder e Kirkland, 1979). O valor da polaridade de eluição das frações foi calculado segundo Snyder e Kirkland (1979) e é mostrado na equação que segue.

$$P' = (\varnothing_a \cdot P_a) + (\varnothing_b \cdot P_b)$$

onde:

P' é a polaridade de eluição

$\varnothing_a$ e $\varnothing_b$ referem ao volume das frações dos solventes A e B da fase móvel,

P_a e P_b referem ao valor de polaridade do solvente puro

Nas condições apresentadas, a linearidade do método encontra-se entre 7,0 µg e 20 µg de massa injetada no sistema cromatográfico para qualquer uma das frações. O procedimento de eluição cromatográfico em etapas utilizado é mostrado na figura II.2.

III. 3. Resultados e Discussão

II. 3a. Cromatografia

Apesar do considerável número de investigações publicadas na literatura quanto ao fracionamento de substâncias húmicas, poucos são os resultados conclusivos.

A utilização de gradiente contínuo, semelhante àquele utilizado por Mackey (1983) e Mills et alii (1987) resultou, nas condições usadas neste trabalho, no cromatograma de DOMmar mostrado na figura II.3, uma separação inadequada para futuras investigações sobre características de complexação dos materiais orgânicos com metais.

O gradiente contínuo é o mais comumente empregado para o fracionamento de matéria orgânica dissolvida (Mackey, 1983; Mills et alii, 1987). Este gradiente apenas separa a porção mais polar da MO, enquanto o restante da substância vai sendo cluído da coluna cromatográfica aos poucos, sem apresentar um fracionamento efetivo. A segunda parte do cromatograma varia com a inclinação do gradiente, sendo tanto mais plano quanto mais tempo for necessário para chegar ao final da análise cromatográfica. Este fato, ilustrado através das figuras II.3a e II.3b, sugere que a matéria orgânica

dissolvida seja constituída por uma mistura de substâncias orgânicas. Este resultado está em contraposição aos de Susic e Boto (1989), cujo

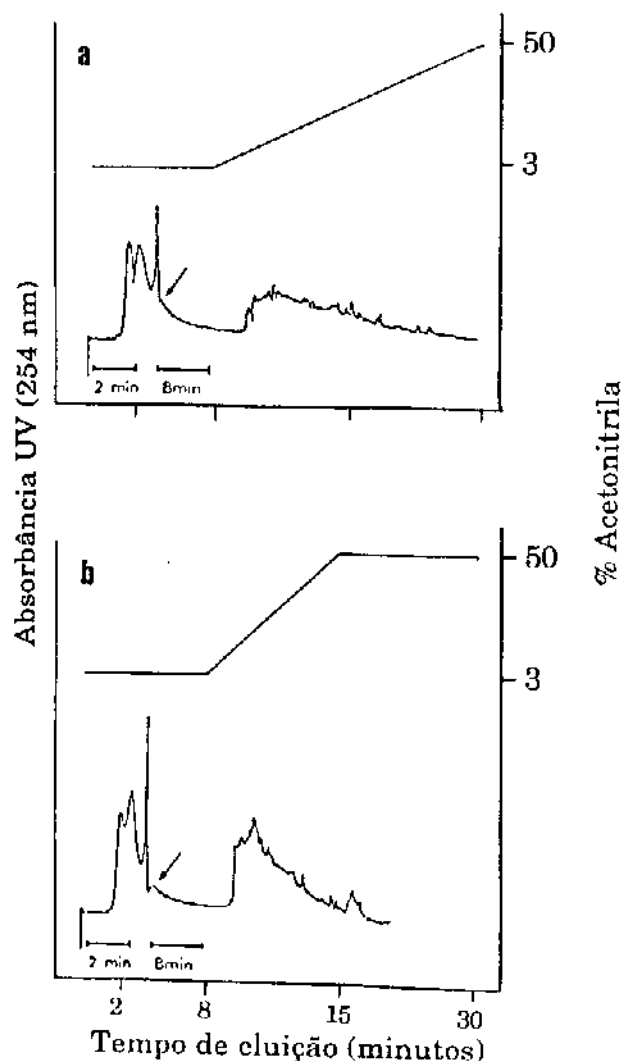


Figura 11.3. Cromatogramas de DOM_{mar}. Eluição isocrática (AcNa:ACN, 97:3 v/v) nos 8 minutos iniciais, e então contínua até 50% ACN em 30 minutos (a), e em 15 minutos (b). Vazão = 1,2 ml·min⁻¹ para os 8 minutos iniciais e 1,0 ml·min⁻¹ até completa eluição.

trabalho mostra apenas uma fração cromatográfica, e através de análise ótica (espectro de absorção com varredura de 220 a 380 nm) concluem que a fração obtida não é constituída por uma mistura de muitos compostos. Porém, com os resultados do presente trabalho e outros da literatura (Frimmel et alii, 1992; Saleh e Chang, 1987) pode-se dizer que esta mistura é caracterizada por apresentar um gradiente contínuo de polaridade, o que explicaria então as inúmeras dificuldades encontradas em sua separação cromatográfica.

Ao contrário do gradiente contínuo, cuja variação na polaridade procura levar ao isolamento de cada composto, o gradiente proposto (em etapas) quando aplicado à matéria orgânica dissolvida resulta no

agrupamento de compostos com polaridade semelhante. Tal gradiente, como mostrado na figura II.2, resulta em um fracionamento da matéria orgânica dissolvida em grupos de compostos com características semelhantes, e não substâncias puras. Deste modo foi possível o fracionamento da DOM em até 5 grupos de compostos constituintes da substância húmica. A figura II.4 mostra alguns cromatogramas típicos utilizando-se o procedimento de eluição em etapas com diversos solventes e sempre a mesma coluna. Os cromatogramas ilustram nitidamente o efeito da força iônica no processo de fracionamento da DOM. De fato, sabe-se que a adição de sais na fase móvel influencia o mecanismo de retenção e seletividade do soluto (Snyder e Kirkland, 1979). Como já mencionado, devido à necessidade de estudos de especiação e determinação de carbono orgânico, a solução de acetato de sódio foi posteriormente substituída por solução de cloreto de potássio como fase móvel.

O efeito da força iônica na eluição de diversas frações é discutida em Susic e Boto (1989), onde os autores interpretam a presença de um ou mais picos como incompleta eluição da MO, e não como prováveis compostos presentes na substância húmica. Segundo Shapiro (1957), a ausência de um ponto de fusão preciso, por si, já indica a presença de múltiplos compostos na MO.

A reprodutibilidade do procedimento cromatográfico foi verificada através de ANOVA (95% de intervalo de confiança). Não houve diferença significativa considerando o tempo de retenção das frações cromatográficas em amostras distintas. Porém, uma observação minuciosa das figuras II.6 e II.4 deixa claro que o tempo de retenção para as frações 3, 4, e 5 é função da alteração de polaridade da fase móvel, definindo as etapas do gradiente cromatográfico e mostrando a variação de composição das frações. Isto significa que com o gradiente proposto separam-se grupos de compostos com uma amplitude de polaridade cujo mínimo é a polaridade daquela etapa. Saleh e Chang (1987), investigando as propriedades de retenção em CLAE-FR de ácido fúlvico do rio Suwannee (E.U.A.), obtiveram resultado semelhante.

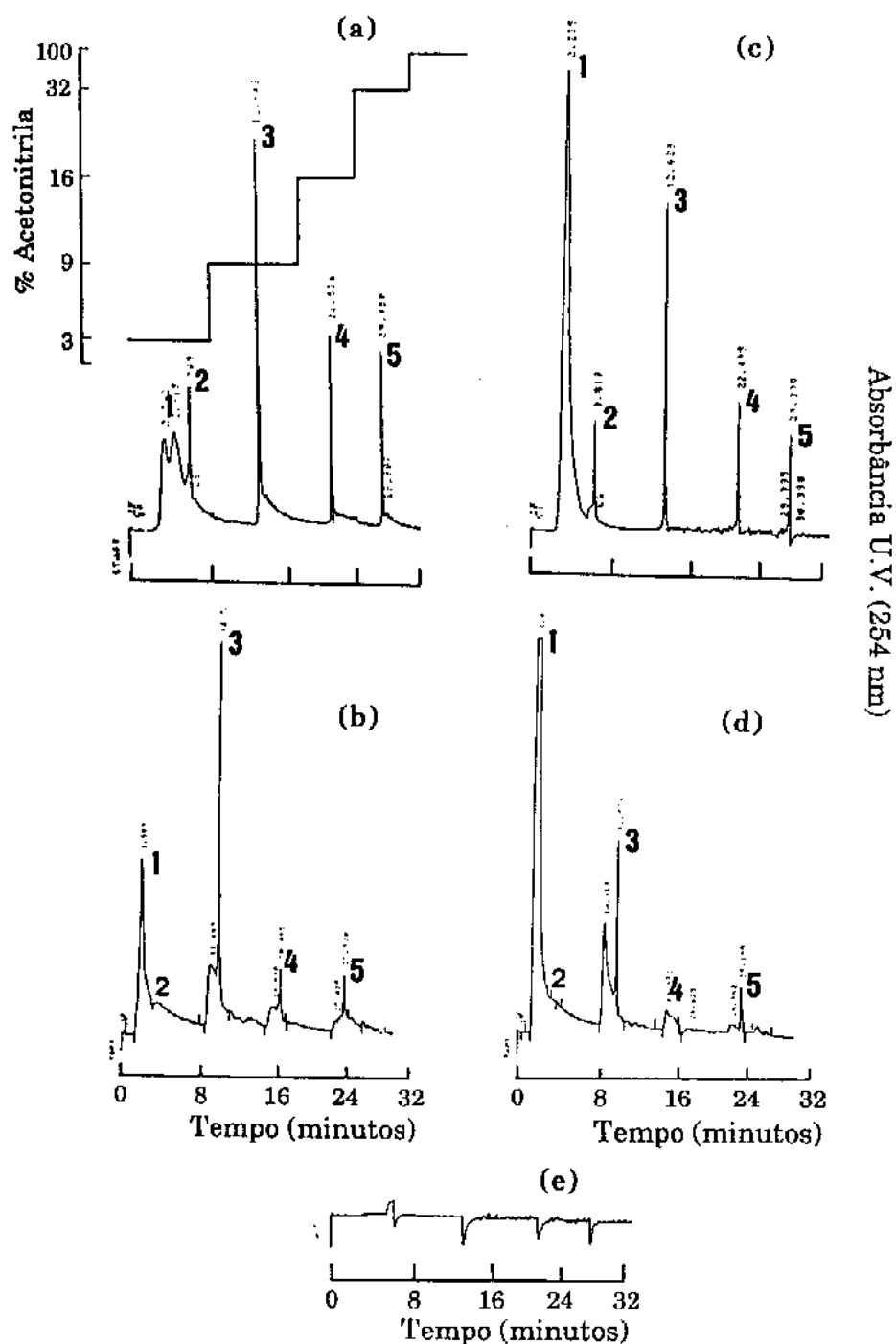


Figura 11.4 Cromatogramas de DOM típicos obtidos através de CLAE-FR e eluição em etapas como ilustrado na figura 11.2. DOM_{mar}, fase móvel=AcNa:ACN (a), KCl:ACN (b); HS, fase móvel=AcNa:ACN (c), AFC, fase móvel KCl:ACN (d); Branco de procedimento (e), fase móvel=AcNa:ACN.

A figura 11.5 mostra o valor da área absoluta para as frações cromatográficas 3 e 4 em função da concentração de acetonitrila na

primeira etapa da fase móvel. Observa-se um aumento na área da fração 3 e uma diminuição naquela da fração 4 com a diminuição da polaridade da fase móvel. Este fato mostra haver a passagem de compostos orgânicos de uma fração para a outra e corrobora para a hipótese de uma escala quasi-contínua de polaridade nos compostos

formadores da matéria orgânica natural.

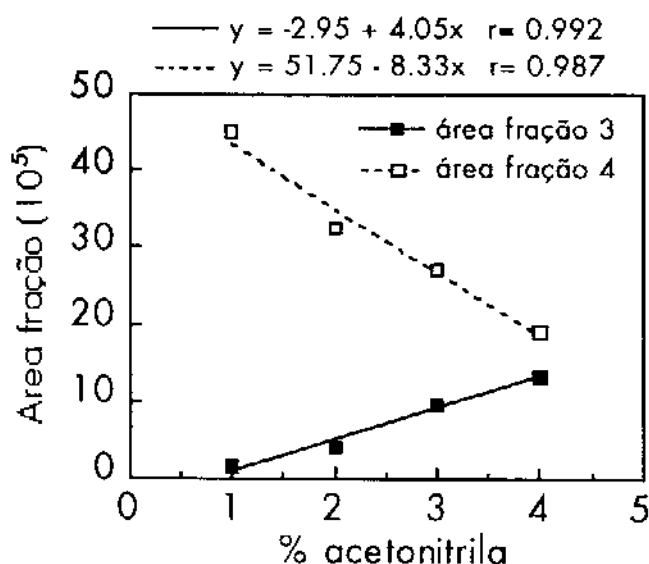


Figura II.5. Áreas das frações cromatográficas 3 e 4 como função da porcentagem inicial de acetonitrila na fase móvel A.

As características dos cromatogramas obtidos com o gradiente em etapas e AcNa:ACN como fase móvel, além da importância relativa de cada fração para o total da DOM são mostrados

na Tabela II.I. É interessante notar que na água do mar, os compostos de maior polaridade constituem cerca de 40% da DOM_{mar}, enquanto que este valor sobe para 81% em se tratando de AF. Já a fração de polaridade intermediária representa cerca de 40% do total na DOM_{mar}, enquanto que apenas 16% para o AF. As frações de menor polaridade (4 e 5) são novamente encontradas em maiores quantidades na água do mar do que no ácido fúlvico terrestre. Baseado nos estudos de Grasso e Weber (1988) e no presente trabalho, pode-se dizer que a DOM_{mar} apresenta um maior grau de polimerização do que o ácido fúlvico terrestre. Grasso e Weber (1988) investigam o comportamento da MO de origem natural através de cromatografia líquida com fase reversa e

oxidação química, e obtiveram uma relação inversa entre polaridade e grau de polimerização.

Tabela II.I. Valores obtidos a partir dos cromatogramas. CV indica coeficiente de variação. Tempo de eluição é dado em minutos. Número total de amostras analisadas = 8. Fase móvel = NaAc:ACN.

Fração	Polaridade de eluição	Tempo eluição	DOMmar % área	CV	AFC % área	CV	SH % área	CV
1	10.06	2.3-2.8	30	7	71	5	34	8
2	10.06	3.9	9	7	10	2	5	29
3	9.86	12.7	36	5	16	4	23	8
4	9.37	20.1	14	7	3	9	21	5
5	8.68	28.5	12	17	2	27	16	12

A polaridade dos compostos eluídos varia de 10.06 para a fração mais polar e 8.68 para a de menor polaridade quando AcNa é adicionado à fase móvel. Porém quando é utilizado a solução de KCl, a polaridade de eluição das frações cromatográficas sofreu leve modificação, como mostrado na tabela II.II.

Tabela II.II. Polaridade de eluição para as frações cromatográficas. Fase móvel: KCl:ACN. Todos os outros dados são aqueles apresentados na tabela II.I.

Fração	Polaridade eluição
1	10.11
2	10.11
3	9.80
4	9.50
5	8.60

Utilizando um sistema semelhante, CLAE-FR e também gradiente em etapas, Saleh e Chang (1987) obtiveram que a polaridade de compostos do ácido fúlvico encontrava-se entre 10.15 e 5.86. Nota-se uma diferença de 3 unidades de polaridade para a fração menos polar de Saleh e Chang (1987) e a do presente trabalho. Este fato pode ser o

resultado das distintas técnicas de extração de matéria orgânica empregadas. O procedimento de extração utilizado no presente trabalho (Sep-Pak tC18), por si, já seleciona os compostos da matéria orgânica de menor polaridade. Segundo Mills e Quinn (1981), os compostos de matéria orgânica extraídos por resinas Sep-Pak eluem em polaridades de até 7.90, o que estaria então de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

II. 3b. Calibração

Para propósitos de calibração da CLAE-FR, foi utilizado uma solução do padrão de AF sem ser passada através da coluna Sep-Pak tC18. Para as curvas de calibração foram utilizados alíquotas de uma solução concentrada ($0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) feita em NaAc ($5\cdot 10^{-2} \text{ M}$) e filtrada através de filtros de membrana com $0.2 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro (Sartorius).

As curvas de calibração para cada uma das frações cromatográficas são mostradas na figura II.6. Nesta observa-se que o parâmetro mais sensível para a determinação da linearidade do método é a área relativa das frações, e não a área absoluta. É claro que os valores de área relativa devem ser constantes independentemente da massa injetada no sistema, se considerarmos que a composição da solução de ácido fúlvico é a mesma independentemente de sua concentração. Os limites das linhas de regressão linear foram testados por gráficos de residuais do eixo y segundo apresentado em Miller (1991), e estão de acordo com os valores obtidos pelas áreas relativas. O limite de detecção obtido com a metodologia proposta no presente trabalho encontra-se em nível de micrograma, e a linearidade entre 7.5 μg e 20 μg . A causa provável da não linearidade entre 0 - 5 μg de massa injetada no sistema cromatográfico pode ser tanto um erro instrumental em baixos níveis de detecção, como também uma interconversão entre as frações. Esta interconversão entre frações foi detectada através da re-injeção de cada fração em separado e aplicado o mesmo procedimento cromatográfico. Deste obteve-se que apenas uma

pequena parte da fração re-injetada aparecia como outras frações, a maioria aparecia como ela própria.

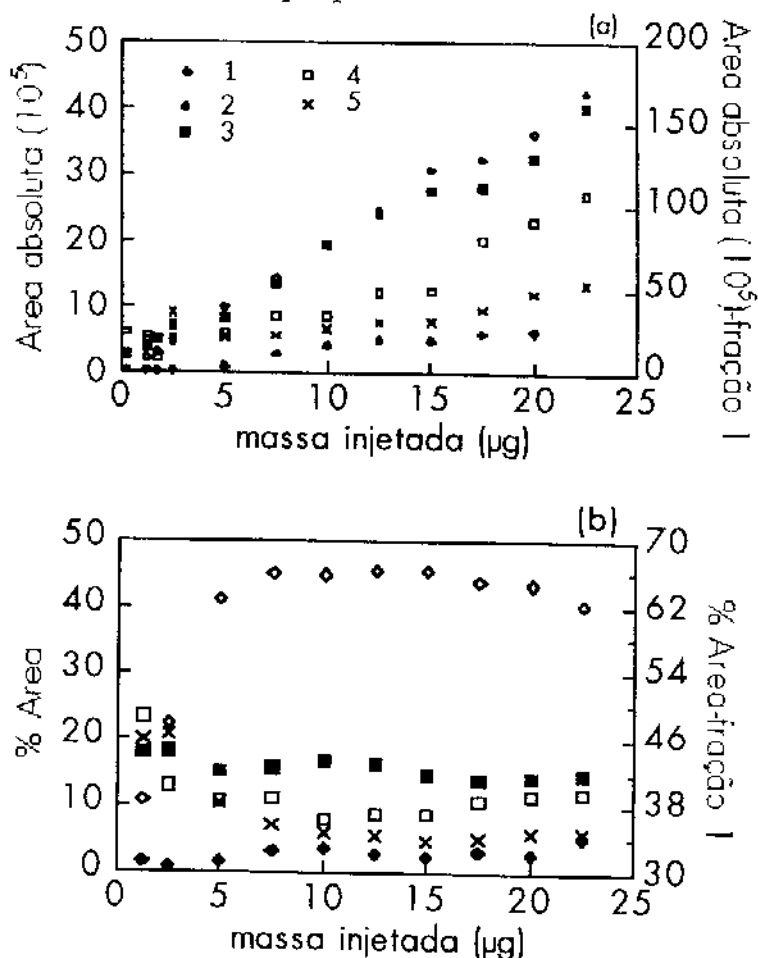


Fig. 11.6. Curvas de calibração para as frações cromatográficas realizadas com solução de ácido fúlvico.

Susic e Boto (1989) obtiveram um aumento na sensibilidade utilizando detector de fluorescência. Os autores propõem um método de determinação de ácido húmico em amostras ambientais, cujo limite de detecção está ao nível de nanograma e a linearidade entre 0.18 µg e 2.1 µg. Neste caso porém, apenas uma fração cromatográfica é obtida.

A separação da DOM em frações cromatográficas com detecção através de absorbância em 254 nm, apesar de não ser tão sensível como detectores de fluorescência, permite, por ser um sistema de detecção não destrutivo, análises posteriores.

II. 4. Conclusão

A matéria orgânica natural, quer de origem marinha ou terrestre, é constituída por uma mistura de compostos de diversas polaridades, resultando na formação daquilo que se pode chamar de escala quasi-continua de polaridade.

Devido à complexidade da matéria orgânica natural, muitas dificuldades surgem em sua separação cromatográfica. Como resultado tem-se o **agrupamento** de compostos orgânicos, e não a separação em substâncias puras. O termo “frações cromatográficas” é sugerido para estas situações.

Apesar da complexidade acima mencionada, a metodologia apresentada no presente trabalho, ie, gradiente em etapas baseado em polaridade possibilitou o fracionamento da matéria orgânica de origem natural em até 5 frações distintas, cada qual contendo diversos compostos orgânicos mas que apresentam pelo menos uma característica em comum: a polaridade.

O ácido fúlvico terrestre apresentou uma predominância de frações mais polares em relação à matéria orgânica dissolvida marinha.

Capítulo III



Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica

III. 1.	Introdução	51
III. 2.	Considerações Teóricas	54
III. 3.	Materiais e Métodos	59
III. 3a.	Fluorescência.....	59
III. 3b.	Carbono Orgânico Total (TOC)	64
III. 4.	Resultados e Discussão.....	65
III. 4a.	Emissão	65
III. 4b.	Excitação	69
III. 5.	Conclusão.....	79

III. 1. Introdução

A fluorescência é uma propriedade intrínseca das substâncias húmicas, quer seja de origem terrestre ou marinha. É uma propriedade conservativa (Cabaniss e Shuman, 1987) e portanto pode ser utilizada como traçador. É frequente sua utilização em estudos de processos de mistura de águas de rios com as de estuários (Dorsh e Bidleman, 1982; Hayase et alii, 1988). De Souza Sierra (1992) mostrou que uma combinação de processos complexos tais como a perda de material fluorescente de alto peso molecular durante a mistura estuarina resulta em uma alteração no máximo de emissão e também na eficiência aparente de fluorescência das águas estuarinas.

A entrada de materiais orgânicos de origem terrestre no ambiente marinho é fortemente dependente da descarga dos rios nos oceanos. Atualmente os rios descarregam cerca de 35 a 40-10³ Km³ de água doce e 15 a 20-10⁹ toneladas de sedimentos por ano nos oceanos de todo o mundo (Milliman, 1993). Para uma avaliação quantitativa e qualitativa do ciclo global do carbono, é importante o conhecimento sobre a contribuição dos materiais orgânicos de origem terrestre no ambiente marinho. Moran et alii (1991) mostram que a presença de compostos derivados de lignina presentes na água do mar são originários de plantas vasculares, e portanto de ecossistemas terrestres. Gough et alii (1993) mostraram a presença de lignina e cutina (produtos de plantas vasculares) em sedimentos marinhos com uma profundidade maior do que 4000 metros. A contribuição da substância húmica terrestre na matéria orgânica dissolvida marinha

pode ser avaliada através da propriedade natural de fluorescência destas substâncias.

A alta sensibilidade da espectroscopia de fluorescência como uma técnica analítica permite sua utilização em concentrações naturais. Este aspecto é especialmente vantajoso quando se investiga o ambiente marinho, uma vez que são muitas as dificuldades encontradas para o isolamento da matéria orgânica dissolvida marinha a partir de um meio rico em sais, como a água do mar.

Pensa-se que apenas uma pequena parte da molécula das substâncias húmicas seja responsável por sua fluorescência (Seitz, 1981; Miano et alii 1988). Apesar disso, Visser (1983) mostra que a fluorescência das substâncias húmicas fornece informações representativas quanto às características estruturais da molécula como um todo. Senesi et alii (1991), associa a alta intensidade de fluorescência em comprimentos de onda curtos com a presença de componentes estruturais simples e de baixo peso molecular, baixo grau de policondensação aromática e baixos níveis de cromóforos conjugados. Os autores concluem que as propriedades de fluorescência das substâncias húmicas podem ser utilizadas como critério para sua diferenciação e classificação quanto à origem, gênese e natureza. Segundo Seitz (1981), os fluoróforos dos ácidos húmico e fúlvico são provavelmente estruturas aromáticas condensadas e substituídas (-OH) com alguns grupos de ácidos carboxílicos.

A fluorescência é uma técnica que analisa o todo da molécula, porém devido à alta complexidade da substância húmica, uma quantidade limitada de informação é obtida. Com isso, a fluorescência dessas moléculas tem sido utilizada, em sua maioria, como critério de distinção da substância húmica quanto à natureza, gênese e origem.

A fluorescência das substâncias húmicas relaciona-se com vários parâmetros, tais como origem, peso molecular (Green et alii, 1992), pH (Senesi, 1990), e polaridade (Lombardi et alii, 1994, ver apêndice). Uma das vantagens da fluorescência, é que como outras técnicas espectrais, esta apresenta grande flexibilidade e sensibilidade, pois comprimentos de onda específicos podem ser usados para selecionar diferentes classes de fluoróforos. Um dos problemas porém, é

que a fluorescência das substâncias húmicas não obedece à teoria existente, descrita para compostos mais simples. O comprimento de onda de máxima emissão, a identidade de uma molécula, não é fixo para as substâncias húmicas, qualquer que seja sua origem. Com isso, muitas dificuldades surgem quando as técnicas convencionais de varredura de excitação e emissão são utilizadas. Uma técnica fluorimétrica relativamente recente, a fluorescência sincronizada, parece mais seletiva e tem sido utilizada com bastante frequência em pesquisas com substância húmica.

O acoplamento de técnicas analíticas tem se mostrado promissor para analisar a substância húmica em si. Frimmel et alii (1992) utiliza vários sistemas de detecção em amostras previamente fracionadas através de cromatografia em gel e mostra as diferenças entre amostras naturais e ácidos fúlvicos isolados. Hayase e Tsubota (1984) investigam o comportamento hidrofílico de frações de ácidos fúlvicos de sedimentos marinhos de vários pesos moleculares.

Definindo melhor cada fração analisada, a junção da espectroscopia de fluorescência com a cromatografia líquida de alta resolução utilizada no presente trabalho, forneceu informações mais detalhadas sobre a fluorescência da substância húmica, utilizada aqui como sinônimo de matéria orgânica de origem natural.

III. 2. Considerações Teóricas

O fenômeno de luminescência molecular reside na emissão de fótons a partir de estados excitados eletronicamente. A fluorescência pode ser definida como a emissão de fótons de estados excitados singlete resultante do retorno ao estado fundamental. Quando um elétron com nível de energia superior apresenta spins com orientações opostas, o retorno ao estado fundamental a partir de um estado excitado singlete não requer alteração na orientação do spin. Assim, de acordo com a mecânica quântica, são transições 'permitidas', resultando em tempo de vida de fluorescência de 10^{-8} - 10^{-9} segundos. Este é o tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado. Por outro lado, a fosforescência, que é a emissão de fótons resultante do decaimento do elétron em estado tripleto de excitação, não é 'permitida' quanticamente, sendo necessária a alteração na orientação do spin eletrônico. Com isso, o tempo de vida médio da fosforescência é maior do que o da fluorescência, ficando em torno dos milisegundos a segundos.

Em geral, substâncias fluorescentes possuem elétrons delocalizados presentes em ligações duplas conjugadas (Lakowicz, 1983). A ausência ou presença de fluorescência em uma molécula é dependente de sua estrutura e também do ambiente no qual o espectro é medido. A fluorescência não é um fenômeno sensível para detalhes refinados de estrutura molecular, e apenas uma pequena fração dos compostos orgânicos existentes é que apresenta fluorescência. Portanto o mero fato de uma molécula fluorescer, já fornece significativo

informação com respeito às suas características estruturais (Wehry, 1967).

O formato e a posição de uma banda de emissão de um espectro de fluorescência são dependentes da estrutura molecular da substância. Em geral, são os espectros de excitação e emissão de fluorescência de compostos planos que apresentam padrões estruturais semelhantes e a conhecida simetria de espelho (Berlman, 1971).

Os processos de fluorescência são mais prováveis em sistemas conjugados e onde elétrons não estão fortemente ligados, como por exemplo ligações π , que são consideradas de baixa energia. Quando uma radiação eletromagnética, que pode ser de baixa energia, atinge tais sistemas, o elétron é apenas excitado, e então promovido para orbitais de mais alta energia. O elétron tende então a retornar ao seu estado fundamental, liberando assim a energia absorvida em forma de fluorescência. Se porém, os elétrons estão fortemente ligados, como em moléculas saturadas ou envolvidos em ligação σ , a energia necessária para a excitação eletrônica será muito alta, apresentando em geral o rompimento, direto ou indireto, da ligação. A energia dissipada em rompimento de ligação não pode reaparecer como fluorescência (Wehry, 1967).

Sabe-se que o tipo e o grupo de substituinte no anel aromático afetam a intensidade e o comprimento de onda de emissão de fluorescência. Assim, o comportamento fluorimétrico de uma molécula é resultante de um efeito cumulativo dependente dos vários componentes estruturais dessa molécula, e o espectro observado consiste na somatória dos espectros individuais dos vários fluoróforos presentes na molécula.

A complexidade química e estrutural da substância húmica representa obstáculos para a identificação dos componentes responsáveis por sua fluorescência. Os dois tipos de espectros convencionais (excitação e emissão) parecem não possuir estrutura suficiente para permitir a identificação dos componentes estruturais. Segundo O'Haver (1976), a limitação da fluorescência em amostras complexas com multicomponentes reside na larga amplitude de banda inerente destas moléculas. Isto limita a habilidade de medidas

convencionais em resolver a sobreposição de bandas em geral observadas em misturas de compostos fluorescentes.

Segundo Senesi et alii (1991), a fluorescência da substância húmica deve-se a sistemas conjugados insaturados aromáticos além de sistemas capazes de alto grau de ressonância (delocalização eletrônica).

Considerando que a emissão de fluorescência a partir de misturas complexas não é satisfatoriamente resolvida pela técnica convencional de excitação em comprimentos de onda fixo, selecionados especificamente para componentes individuais, Lloyd (1971) introduziu uma terceira técnica, a luminescência sincronizada, que aplicada à fluorescência (fluorimetria sincronizada) oferece espectros com maior resolução do que os de excitação e emissão sozinhos. A figura III.1 mostra um espectro de excitação sincronizada para DOMmar.

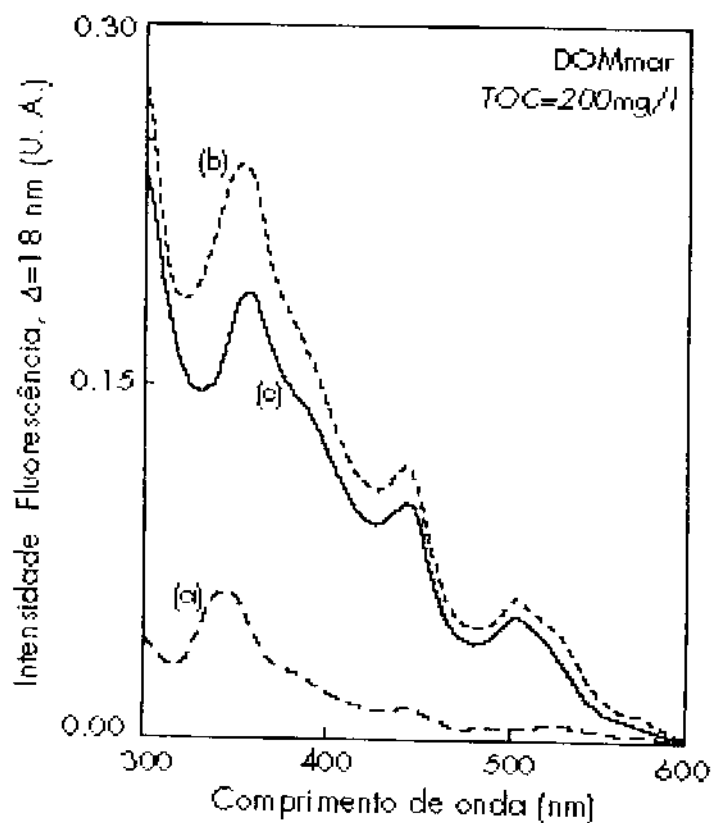


Figura III.1. Espectro de excitação sincronizada. (a) Branco de procedimento, (b) Espectro não corrigido para o branco, (c) Espectro após correção para o branco.

Considerando as técnicas convencionais, um espectro de emissão (Fig. III.2) é produzido através do registro da intensidade de luz emitida em função do comprimento de onda da mesma, com a excitação realizada em comprimento de onda fixo. Já um espectro de excitação (Fig. III.3) é obtido quando a amostra é iluminada (excitada) com uma variedade de comprimentos de onda

e a intensidade de luz fluorescente emitida é registrada em comprimento de onda fixo.

A fluorescência sincronizada consiste no registro do sinal de emissão de fluorescência enquanto simultaneamente e de modo sincronizado fazendo a varredura dos comprimentos de onda de emissão e de excitação. Um intervalo ($\delta\lambda$) constante entre ambos os comprimentos de onda deve ser mantido durante o processo de medida ($\delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). Segundo Vo-Dinh (1978), o sinal fluorimétrico sincronicamente excitado pode ser considerado como um espectro de excitação, porém com a luz fluorescente emitida sendo registrada de modo sincronizado.

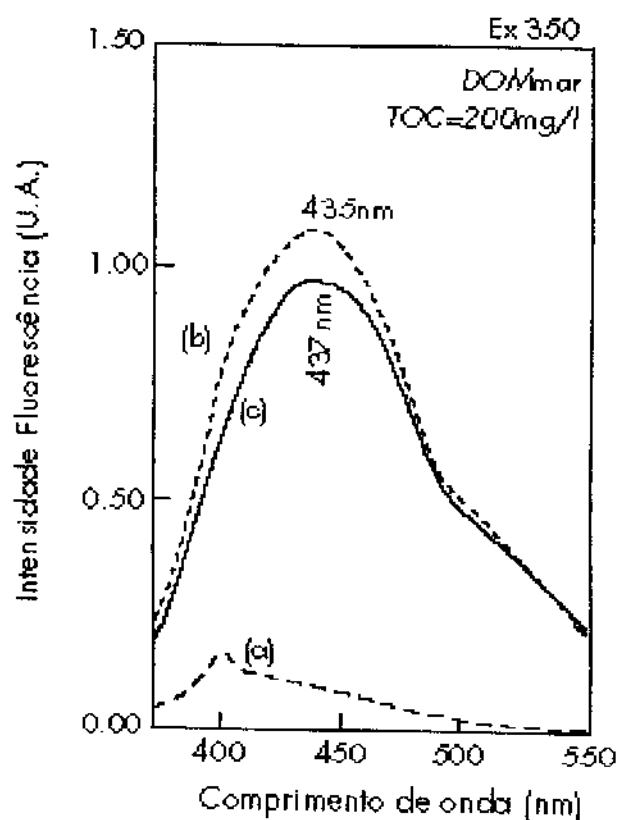


Figura III.2. Espectro de emissão de fluorescência, excitação fixa em 350 nm. (a) Branco de procedimento, (b) Espectro não corrigido para o branco, (c) Espectro após correção para o branco.

O espectro de excitação sincronizado depende tanto do espectro de excitação como também daquele de emissão, e apresenta portanto propriedades combinadas desses dois. Esta característica resulta em uma melhoria na seletividade para análises de multi-componentes, fornecendo espectros mais estruturados, especialmente quando se trata de amostras complexas tais como substâncias húmicas. Esta técnica permitiu, segundo Lloyd (1971), a caracterização de traços de material

fluorescente no campo da poluição causada por óleos, assim como para propósitos forenses.

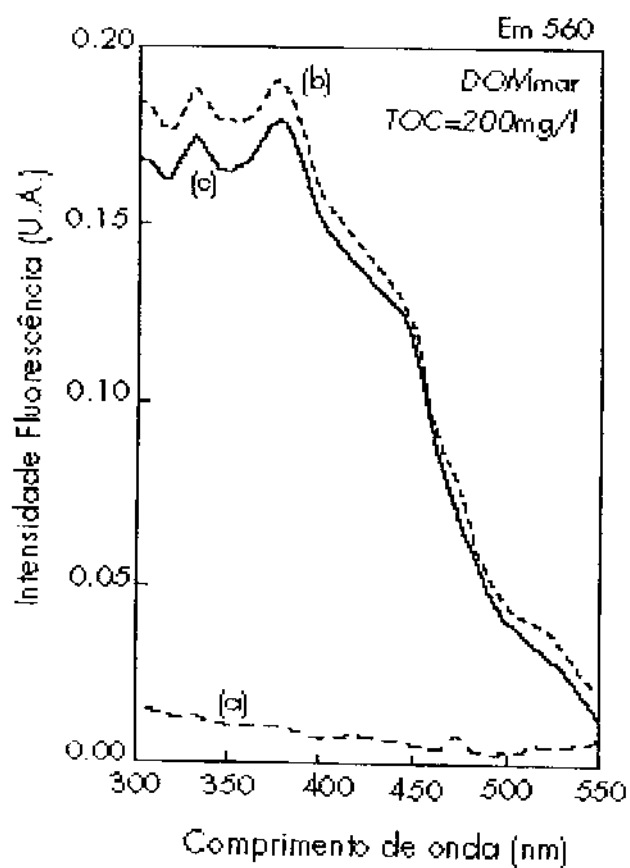


Figura III.3. Espectro de excitação, emissão fixa em 560 nm. (a) Branco de procedimento, (b) Espectro não corrigido para o branco, (c) Espectro após correção para o branco.

III. 3. Materiais e Métodos

III. 3a. Fluorescência

As análises de fluorescência foram realizadas utilizando-se um espectrofluorômetro JASCO (modelo FP 770), equipado com uma lâmpada de xenônio de 150W como fonte de luz. O instrumento inclui em sua configuração interna correção automática para variações de intensidade da fonte de luz além de características espectrais tanto da fonte de luz como também do monocromador de excitação.

O monocromador de excitação, que além de tornar estável a fonte de luz de excitação, possibilita seu controle quanto ao comprimento de onda que se deseja, foi ajustado para 5 nm de amplitude de banda, enquanto o de emissão para 10 nm. A velocidade de varredura foi ajustada para 200 nm·minuto⁻¹ para ambos os monocromadores.

Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados de 370 - 600 nm com o comprimento de onda de excitação ajustado para 350 nm (λ_{ex} 350 nm-primeira classe de fluoróforos) e 450 nm (λ_{ex} 450 nm-segunda classe de fluoróforos). Os espectros de excitação foram obtidos com uma amplitude de varredura de 300 - 550 nm e medida de emissão da radiação em comprimento de onda fixo em 560 nm. Os

espectros de excitação sincronizada foram quantificados através da varredura simultânea de ambos os comprimentos de onda, excitação (varredura de 300 - 600 nm) e emissão, enquanto mantendo constante, em 18 nm, a diferença entre os comprimentos de onda de emissão e excitação ($\delta=18$ nm). O valor desta diferença foi ajustado experimentalmente. O pico Raman em espectro de excitação sincronizado com água Milli-Q como solvente e utilização de $\delta=18$ nm deve encontrar-se próximo de 238 nm, calculado como descrito em Lloyd (1977).

Os valores de amplitude de varredura e comprimento de onda fixo utilizados neste trabalho são parâmetros típicos utilizados em estudos de fluorescência de substâncias húmicas (Miano et alii, 1988; Ryan e Weber, 1982b; Ventry et alii, 1991).

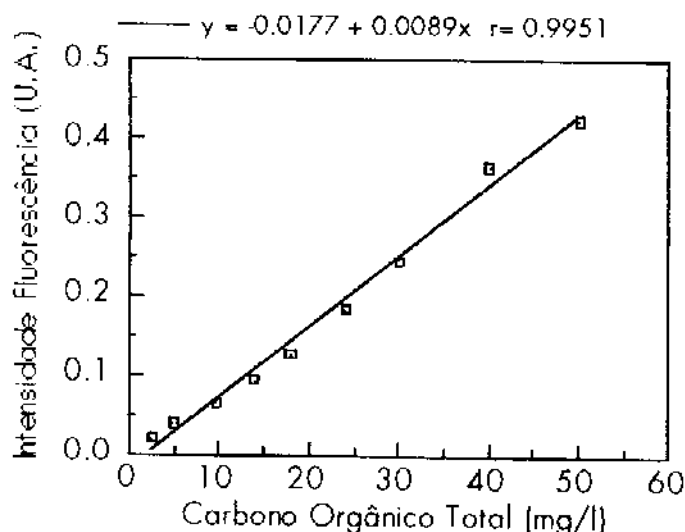


Figura III.4. Concentração de carbono orgânico total (DOMmar) versus intensidade de fluorescência para o método de emissão de fluorescência (λ_{ex} 350 nm).

Os es-
pectros de matéria orgânica foram subtraídos daqueles obtidos com os respectivos brancos de procedimento, e portanto correções para os efeitos de espalhamento foram realizadas. Algumas destas correções podem ser vistas nas figuras III.1, III.2, e III.3. A necessidade de correção do espectro

de emissão de fluorescência de substâncias húmicas para espalhamento da luz de fundo foi demonstrada por Ewald et alii (1983) e De Souza Sierra e Donard (1991). Porém, considerando o espectro de emissão de fluorescência, Senesi (1990), mostra que o comprimento de

onda de máxima emissão para ácidos fúlvicos é o mesmo para espectros corrigidos e não corrigidos. No presente trabalho, a correção mostrou que apesar de haver variação no comprimento de onda de máxima emissão, na grande maioria dos casos, esta foi menor do que 4 nm, e portanto encontra-se dentro do erro instrumental.

Todas as medidas foram feitas em pH 6.5 - 7.0, em solução de KCl ($1.5 \cdot 10^{-2}$ M) e filtradas em filtros de membrana (0.2 μ m de diâmetro de poro, Sartorius). A temperatura ambiental foi mantida em 21 ± 1 °C.

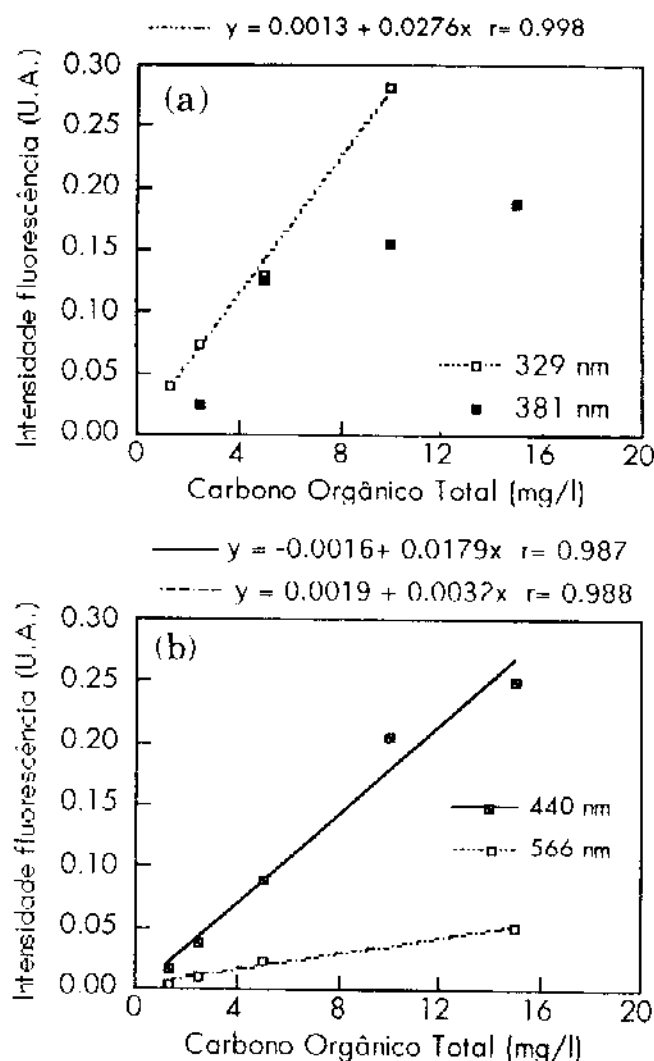


Figura III.5. Concentração de carbono orgânico total (DOM_{mar}) versus intensidade de fluorescência para o método de excitação sincronizada ($\delta=18$ nm, varredura de 300 a 600 nm). Picos registrados em 329 nm e 381 nm (a), 440nm e 566 nm (b).

A calibração do sistema fluorimétrico foi realizada com solução de AFC, e com diluições da DOMmar. No caso da matéria orgânica de origem marinha, a quantificação deu-se através de medidas de Carbono Orgânico Total (TOC). As curvas de calibração do espectrofluorômetro são mostradas nas figuras III.4 e III.5 para a DOMmar, e III.6 para o AFC.

Todas as análises quantitativas do espectro de emissão convencional foram realizadas com 3 réplicas, e aquelas do espectro de excitação sincronizada foram feitas com 2 réplicas. Já para as análises qualitativas, ie, máximo de emissão ou bandas de absorção, foram feitas com 4 réplicas para o espectro de excitação sincronizada e 3 para os de emissão. Isto é devido à realização de análises em amostras tratadas com acetato de sódio, onde não foi possível a realização de medidas de carbono orgânico. Contudo, quer seja acetato de sódio ($5 \cdot 10^{-2}M$) ou KCL ($1.5 \cdot 10^{-2}M$) o solvente utilizado, os espectros com seus respectivos máximos de emissão ou absorção foram semelhantes. Os valores de intensidade de fluorescência por unidade de carbono orgânico apresentados nas figuras III.19 e III.20 são portanto o resultado de duas réplicas, enquanto os valores de comprimento de onda (máximo de absorção) são o resultado de quatro réplicas. O erro para o máximo de absorção esteve sempre dentro de 4 nm, exceto a banda registrada em 486 nm, cujo desvio padrão foi de 6 nm.

Recentemente foi demonstrado (Frimmel et alii, 1992) que a absorção em 254 nm para a matéria orgânica de origem natural não corresponde à concentração de carbono orgânico. Portanto a utilização de medidas de absorção em 254 nm pode resultar em erros aleatórios, de sub- ou super-estimação da matéria orgânica. Apesar disso, a absorção em 254 nm tem sido utilizada como uma medida substitutiva ao TOC.

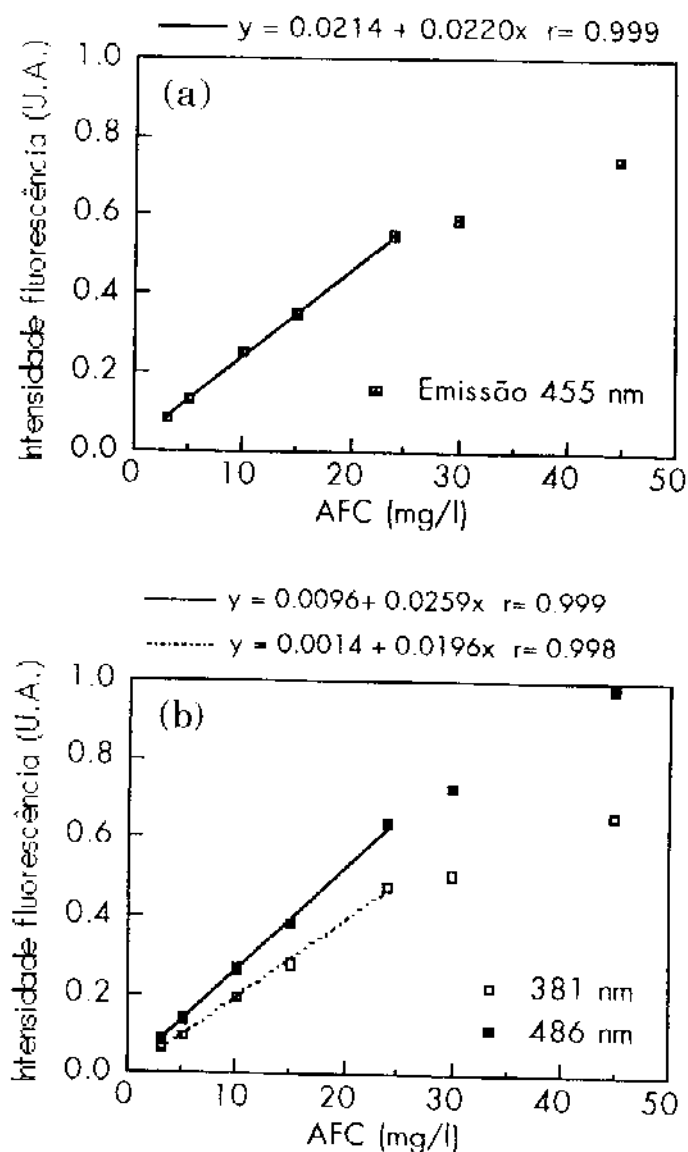


Figura III.6. Concentração de ácido fúlvico de Conway versus intensidade de fluorescência. (a) método de emissão de fluorescência, com λ_{ex} 350 nm; (b) método de excitação sincronizada ($\delta=18$ nm, varredura de 300 a 600 nm) com picos em 381 nm e 486 nm.

III. 3b. Carbono Orgânico Total (TOC)

Com a finalidade de normalizar o sinal fluorimétrico para uma possível comparação entre as diversas amostras e quantificação da DOMmar para fins de calibração, foram feitas medidas de carbono orgânico total nas amostras dissolvidas em solução de KCl. O método empregado foi o de combustão catalítica em altas temperaturas (HTCO) com detecção por infra-vermelho (Dorhamann DC-190), que é considerado atualmente um dos métodos mais adequados para análise de TOC (Wangersky, 1993). No sistema utilizado, a amostra líquida é injetada diretamente em um forno a alta temperatura (680 °C), onde sofre o processo de oxidação, e o CO₂ assim formado é levado, por arraste, até o detector de infravermelho não dispersivo, o que segundo Wangersky (1993) é responsável por um aumento na sensibilidade. A figura III.7 mostra a curva de calibração, realizada com ftalato ácido de potássio (C₈H₅KO₄). Todo o material utilizado foi de vidro, lavado com solução sulfocrômica (24 horas) e enxaguado com água Milli-Q.

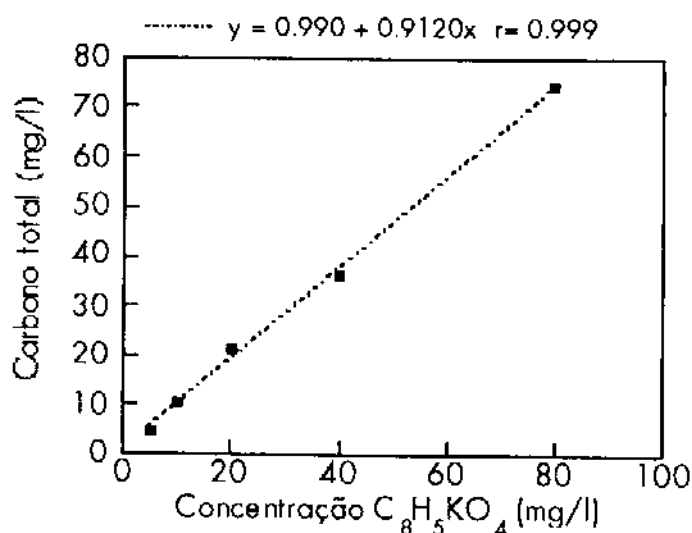


Figura III.7. Curva de calibração para as análises de carbono orgânico total.

III. 4. Resultados e Discussão

III. 4a. Emissão

A literatura é uníssona em apontar que as substâncias húmicas apresentam pelo menos dois tipos de fluoróforos, um primeiro excitável entre 310 - 390 nm e um segundo entre 410 - 470 nm. Acredita-se que carboxifenol esteja presente no primeiro tipo, mas a natureza do segundo continua desconhecida (Bloom e Leenhcer, 1989). Porém, o fato de que para cada comprimento de onda de excitação, variando desde 300 nm até 500 nm, há praticamente um comprimento de onda de máxima emissão, tem-se a certeza de se tratar de classes de fluoróforos.

Considerando a DOMmar e o AFC (matéria orgânica de origem terrestre) antes do fracionamento cromatográfico, a intensidade de emissão de fluorescência por unidade de carbono orgânico para a primeira classe de fluoróforos (λ_{ex} 350 nm) é maior no AFC, do que na DOM de origem marinha, como ilustrado na figura III.8. Estes resultados concordam parcialmente com os de Dornard et alii (1989), que investigando águas continentais e marinhas obtiveram uma fluorescência 20 vezes maior para as águas continentais em relação às marinhas. No presente trabalho, a diferença em intensidade de

fluorescência foi, em média, 5 vezes. Além disso, foi registrada uma diferença quanto ao comprimento de onda de máxima emissão.

A figura III.8 mostra que a passagem do AFC através da

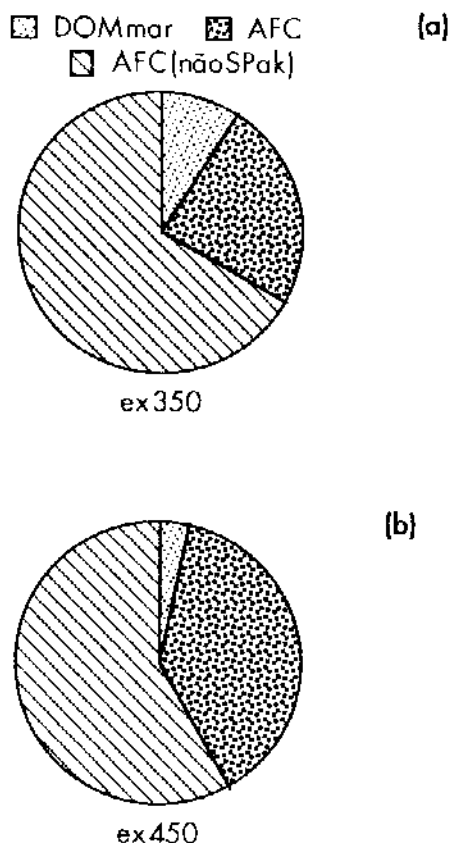


Figura III.8. Intensidade de emissão de fluorescência por unidade de carbono orgânico. Excitação fixa em (a) 350 nm, e (b) 450 nm. AFC(nãoSPak) refere-se ao AFC antes da passagem através da resina Sep-Pak tC18.

resina Sep-Pak tC18 resultou em uma perda de 65% dos fluoróforos excitáveis em 350 nm, e de 34% daqueles em 450 nm. Isto mostra que estes fluoróforos estão associados a compostos hidrófilos, incapazes de serem retidos pela resina, cuja natureza é hidrofóbica. Resultado semelhante foi obtido por Amador et alii (1990), cujo trabalho mostrou haver um componente hidrófilo em águas marinhas que não era retido pela Sep Pak C18 e que era responsável por cerca de 20% do total de fluorescência.

Na figura III.9, vê-se que o comprimento de onda de máxima emissão obtido com a DOMmar (437 nm $\pm$ 4 nm) foi sempre menor do que aquele do AFC, cujo valor médio é de 452 nm ($\pm$ 4 nm).

Tal comportamento, segundo

Senesi et alii (1991), pode indicar a presença de componentes estruturais mais simples e de menor peso molecular na DOMmar em relação ao AFC. É provável que a DOMmar apresente ainda um menor grau de policondensação aromática e baixos níveis de cromóforos conjugados (Senesi et alii, 1991). Donard et alii (1989) também obtiveram

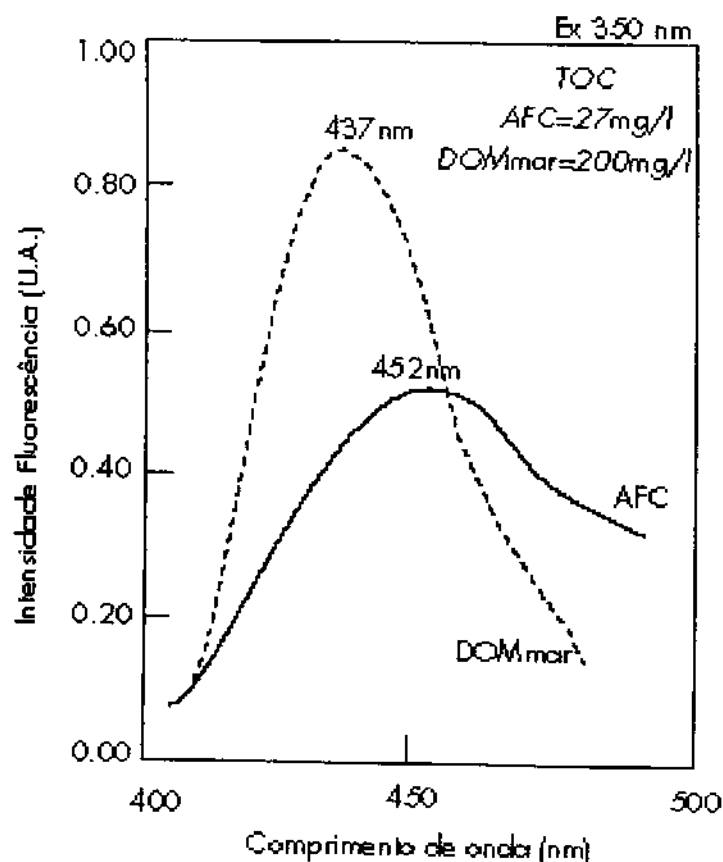


Figura III.9. Espectro de emissão de fluorescência para AFC e DOMmar. Excitação fixa em 350 nm.

marinha. Lignina é encontrada nos vegetais superiores, e sua presença em águas superficiais marinhas mostra a influência da matéria orgânica de origem terrestre na composição da DOMmar, provavelmente despejada no oceano através de rios.

Quando a excitação foi realizada em comprimento de onda fixo de 450 nm, como mostrado na figura III.10, não houve diferença significativa quanto ao comprimento de onda de máxima emissão para qualquer uma das duas categorias de matéria orgânica (DOMmar e AFC). A diferença foi, no caso, apenas quantitativa, e novamente o AFC apresentou uma maior intensidade de fluorescência.

um deslocamento para comprimentos de onda de maior frequência das águas marinhas em relação às continentais.

Ao excitar-se em 310 nm, o comprimento de onda de máxima emissão registrado para a DOMmar foi de 417 nm, resultado que segundo Lundquist et alii (1978), é devido à presença de sistemas contendo cromóforos derivados de lignina, sugerindo a existência destes compostos na matéria orgânica

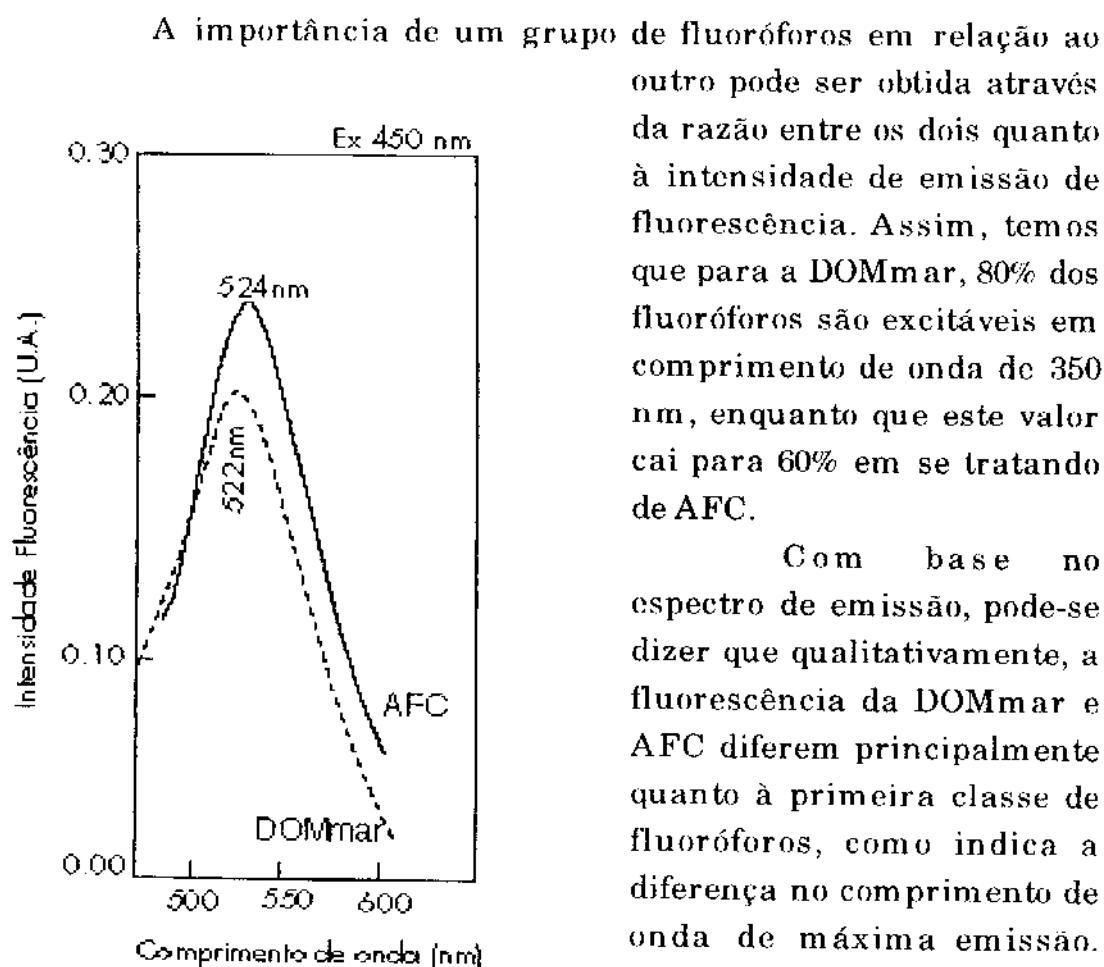


Figura III.10. Espectro de emissão de fluorescência para AFC e DOMmar. Excitação fixa em 450 nm. Concentração de TOC: DOMmar=200 mg/l, AFC=27 mg/l.

fluoróforos.

O espectro de emissão de fluorescência para qualquer uma das frações cromatográficas, tanto do AFC como também da DOMmar foi semelhante quanto ao comprimento de onda de máxima emissão. A principal diferença foi novamente quantitativa. A figura III.11 mostra a intensidade de emissão de fluorescência por unidade de carbono orgânico para cada fração cromatográfica. Observa-se um comportamento inverso para o AFC em relação à DOMmar. Há uma tendência de aumento no sinal fluorimétrico com a diminuição da

polaridade das frações cromatográficas na DOMmar, e o inverso parece ser verdadeiro para a matéria orgânica de origem terrestre. Este comportamento foi semelhante para as duas classes de fluoróforos, ie, quer excitando-se em 350 nm ou em 450 nm. Além disso, esta figura confirma uma maior intensidade de fluorescência no AFC do que na

DOMmar, que pode ser agora detectada nas frações de maior polaridade. Considerando os compostos menos polares (frações 4 e 5), a intensidade de emissão de fluorescência por unidade de carbono orgânico é semelhante para tanto para o AFC assim como para a DOMmar para a primeira e segunda classe de fluoróforos.

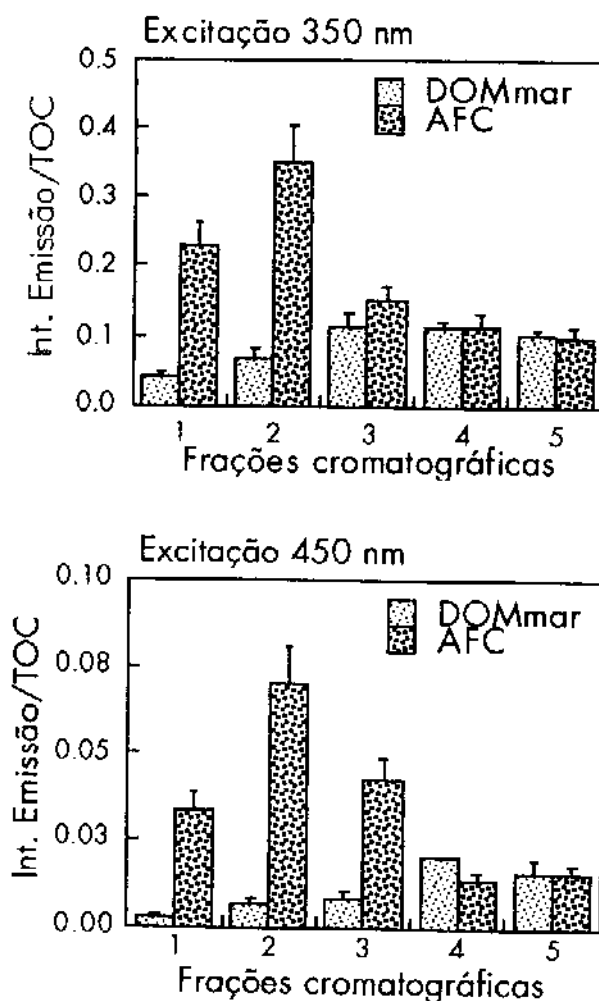


Figura III.11. Intensidade de emissão de fluorescência por unidade de carbono orgânico para cada fração cromatográfica, em ordem decrescente de polaridade.

trado na figura III.3, e para as frações cromatográficas na figura III.12. A excitação convencional resultou em espectros com estrutura pobre, ie, incapaz de detectar diferenças entre as amostras, e portanto

III. 4b. Excitação

O espectro de excitação convencional para DOMmar antes do fracionamento cromatográfico é mos-

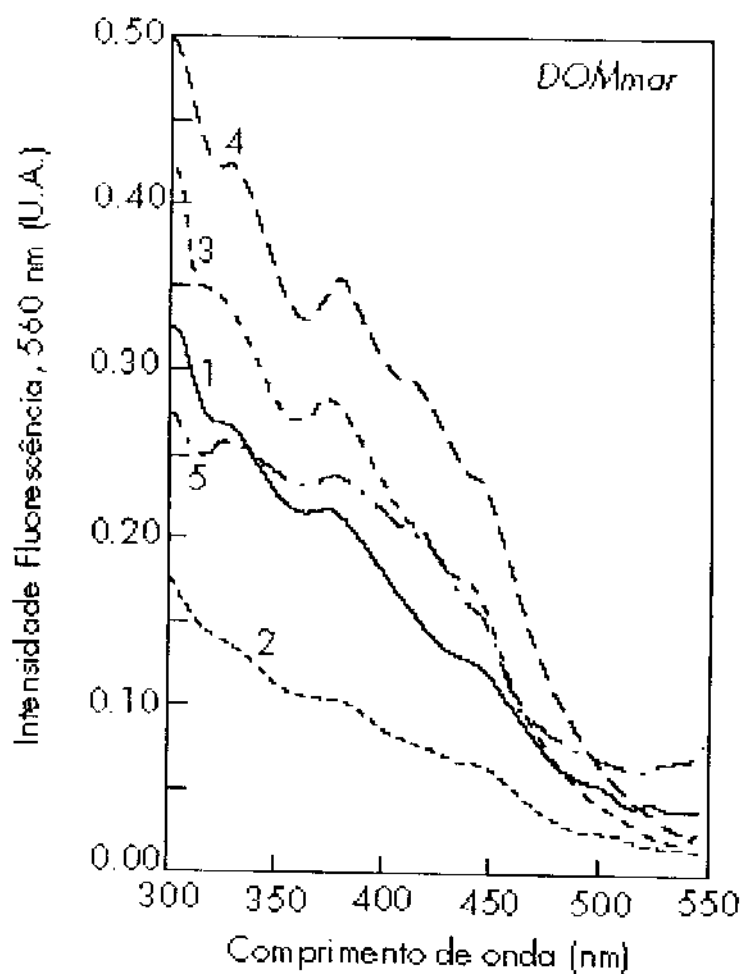


Figura III.12. Espectro de excitação convencional para as diversas frações cromatográficas obtidas com a DOMmar. O número próximo a cada espectro indica a respectiva fração. Emissão fixa em 560 nm.

mostrou ser um método incompleto em se tratando de caracterização de matéria orgânica natural, como pode ser visto na figura III.12. Por isso, neste trabalho será dada ênfase para a excitação sincronizada, que mostrou-se mais eficiente para tal propósito.

O espectro de excitação sincronizada para a DOMmar antes do fracionamento cromatográfico pode ser visto nas figuras III.1 e III.13. Na figura III.1, a concentração de carbono orgânico é 200

mg·l⁻¹, enquanto que na III.13 é 10 mg·l⁻¹. Esta diferença, como pode ser visto, não resulta em alteração no comprimento de onda de máxima emissão das regiões de picos, mas sim em um mascaramento dos picos de fluorescência principalmente na região de 500 - 600 nm. No espectro da solução mais diluída, vêm-se três pequenos picos nesta região, enquanto que apenas um é visto no espectro da solução mais concentrada. Convém mencionar que o espectro apresentado na figura III.1 encontra-se dentro dos limites de linearidade para uma

sensibilidade reduzida em 10 vezes em relação à utilizada na figura III.13. Para a DOMmar, as figuras III.1 e III.13 mostram três bandas principais de picos de fluorescência: $329 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$, $381 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$, $440 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$, e uma região próximo de 500 nm com várias bandas.

Dujmov et alii (1992) obtiveram espectro estruturalmente semelhante, porém com um $\delta=27 \text{ nm}$, resultando em uma diferença de 40 nm entre as suas bandas e as do presente trabalho. Os autores fazem a identificação dos picos e concluem que o primeiro corresponde a sistemas compostos de 3 ou 4 anéis aromáticos, o segundo com 5 anéis aromáticos e o terceiro com 7. A quarta e última região de pico, os autores classificam como sendo material fluorescente recém formado. Isto é corroborado pelo fato de que tanto a amostragem de Dujmov et alii (1992) como a do presente trabalho foram feitas na primavera, época de alto crescimento fitoplanctônico.

É provável que o fluoróforo responsável pela emissão em 566 nm esteja associado à ficoeritrina, um pigmento fotossintético de natureza proteica presente em sua maioria em algas vermelhas e cianofíceas no ambiente marinho (Yentsch, 1983). Sendo excitado em 565 nm , esta cromoproteína apresenta um máximo de emissão próximo a 590 nm , e a DOMmar quando excitada em 560 nm teve seu máximo de emissão em 585 nm . A ausência deste pigmento na matéria orgânica de origem terrestre deixa portanto de ser uma surpresa.

Investigando a fluorescência de DOM extraída com resinas Sep-Pak C18, Coble et alii (1990) mostram evidências de que pelo menos três fluoróforos estão presentes nas águas do Mar Negro. Os autores concluem que a fluorescência de DOM de águas superficiais está associada ao crescimento de organismos vivos.

O espectro de excitação sincronizada para o AFC antes do fracionamento cromatográfico mostra duas regiões principais de picos: $381 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ e $486 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$, que referem-se à primeira e segunda classe de fluoróforos respectivamente. Na segunda classe vê-se ainda duas insinuações de picos, que tornam-se evidentes na primeira fração cromatográfica, como ilustra a figura III.14.

Investigando a fluorescência de substâncias húmicas de solo através do espectro de excitação convencional, Ghosh e Schnitzer (1980)

concluem que independente da origem do ácido fúlvico investigado (diferentes ambientes geológicos e pedológicos), todos exibiram uma banda característica próximo de 360 nm (primeira classe). Os autores acreditam que estruturas fenólicas sejam responsáveis pela fluorescência nas substâncias húmicas.

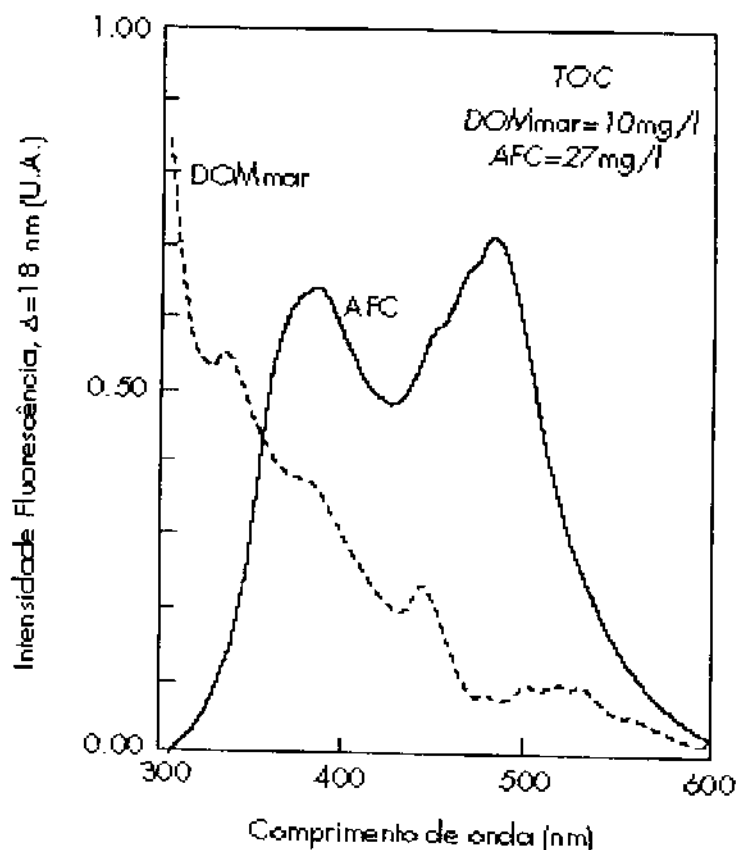


Figura III.13. Espectro de excitação sincronizada para a DOMmar e AFC antes do fracionamento cromatográfico.

estas duas frações são eluídas na mesma polaridade, porém diferindo quanto ao tempo de retenção. Apesar da semelhança em polaridade, os espectros das frações 1 e 2 quando se considera o AFC são totalmente diferentes; a fração 1 aparece semelhante ao AFC antes do fracionamento, mostrando as mesmas duas regiões de picos, enquanto que a fração 2 apresenta várias regiões de picos distintas. Na fig. III.14 pode-se ver também que a fração de maior polaridade para a amostra terrestre, que corresponde a cerca de 70% do total da matéria orgânica, é

Nas figuras III.14 e III.15 são mostrados os espectros de excitação sincronizada das frações cromatográficas 1 e 2 respectivamente. Para a DOMmar, os espectros são semelhantes, mostrando as mesmas regiões de picos. Como apresentado na seção II deste trabalho, cromatograficamente estas duas fra-

representativa da amostra antes do fracionamento cromatográfico, porém o mesmo não pode ser afirmado para aquela de origem marinha.

Os espectros de excitação sincronizada para as frações 3 e 4 podem ser vistos nas figuras III.16 e III.17 respectivamente. Ambas mostram que independente da origem da matéria orgânica, ie, quer esta seja marinha ou terrestre, fluorimetricamente as frações 3 são semelhantes, assim como as frações 4. Estes fluoróforos estão associados a compostos com polaridade de eluição 9.86 - 9.80 para a fração 3 e 9.50 - 9.37 para a 4.

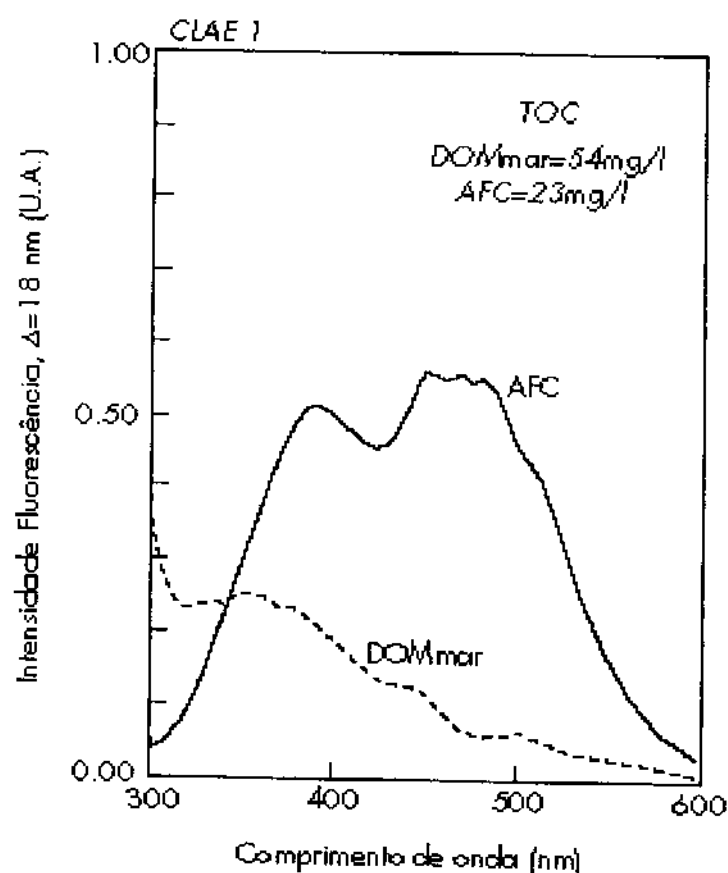


Figura III.14. Espectro de excitação sincronizada para a fração cromatográfica número 1 da DOMmar e AFC. Polaridade da fração 1=10.11.

fluorescência tipo substância húmica quando a emissão dá-se em

Isolado na fração cromatográfica 3, encontra-se um fluoróforo (ou classe de fluoróforos) com banda de absorção em 307 ± 2 nm. A atribuição de emissão de fluorescência em λ de alta frequência à proteínas foi feita por Coble et alii (1993).

Investigando as propriedades de fluorescência de águas marinhas, os autores classificam de

comprimento de onda mais longo: 420 - 450 nm e fluorescência tipo proteína quando a emissão dá-se em comprimento de onda mais curto: 300 - 340 nm. A emissão do fluoróforo presente na fração 3 dá-se em 325 nm, e portanto é provável que seja de natureza protéica.

A figura III.18 mostra o espectro de excitação sincronizada

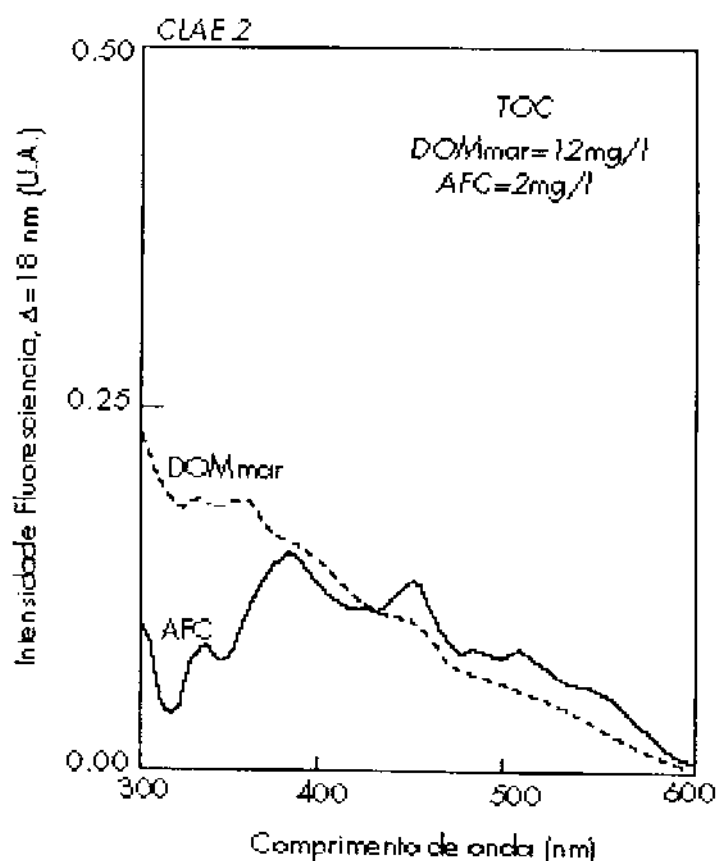


Figura III.15. Espectro de excitação sincronizada para a fração cromatográfica número 2 da DOMmar e AFC. Polaridade da fração 2=10.11, difere da fração 1 pelo tempo de retenção.

III.11), porém qualitativamente o comportamento fluorimétrico é diverso. O fluoróforo excitável próximo de 566 nm é encontrado somente na DOM de origem marinha.

Como pode ser visto nas figuras III.13 a III.18, vários foram os fluoróforos encontrados. Alguns distribuem-se entre as diversas

para a fração cromatográfica 5, a de menor polaridade. Neste caso, as principais diferenças são a presença de um fluoróforo(s) com banda de absorção em 317 nm $\pm$ 2 nm no AFC e outro em 566 $\pm$ 1 nm na DOMmar, que pode ser visto também na figura III.13. Quanto à primeira classe de fluoróforos, quantitativamente a fluorescência da fração cromatográfica de menor polaridade é semelhante qualquer que seja a origem da matéria orgânica (figura

frações cromatográficas, ie, não distingue a origem da matéria orgânica, enquanto outros são mais específicos, aparecendo ou no AFC ou na DOMmar. É o caso dos fluoróforos com banda de absorção em 317 ± 2 nm (frações cromatográficas 3 e 5, AFC), 405 ± 1 nm (fração cromatográfica 5, AFC), 566 ± 1 nm (fração cromatográfica 5, DOMmar).

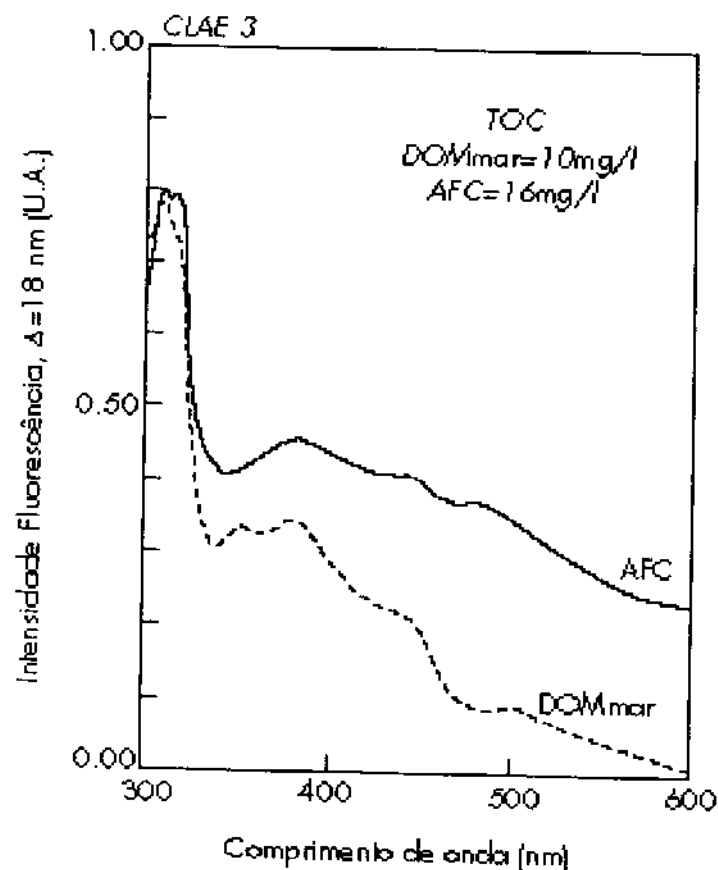


Figura III.16. Espectro de excitação sincronizada para a fração cromatográfica número 3 da DOMmar e AFC. Polaridade da fração 3=9.80.

Analisan-
do o espectro de
excitação sincro-
nizada do AFC e
DOMmar antes do
fracionamento cro-
matográfico (fig.
III.13), é nítida a
diferença entre es-
tas duas categorias
de matéria orgâ-
nica, que seria
natural atribuir às
suas diferentes ori-
gens. Porém, como
ilustra a figura
III.19 e III.20, tipos
semelhantes de
fluoróforos estão
presentes tanto no
AFC como também
na DOMmar, e

portanto independente da origem da matéria orgânica.

A menor diversidade aparente de fluoróforos visto na figura III.19 é o resultado da alta intensidade de emissão das classes de fluoróforos com banda de absorção em 381 nm e 486 nm no caso do AFC, resultando em uma sobreposição dos outros fluoróforos (figura III.20). Fluoróforos cujo sinal fluorimétrico foi menor do que 5% do total não foram incluídos nas figuras III.19 e III.20.

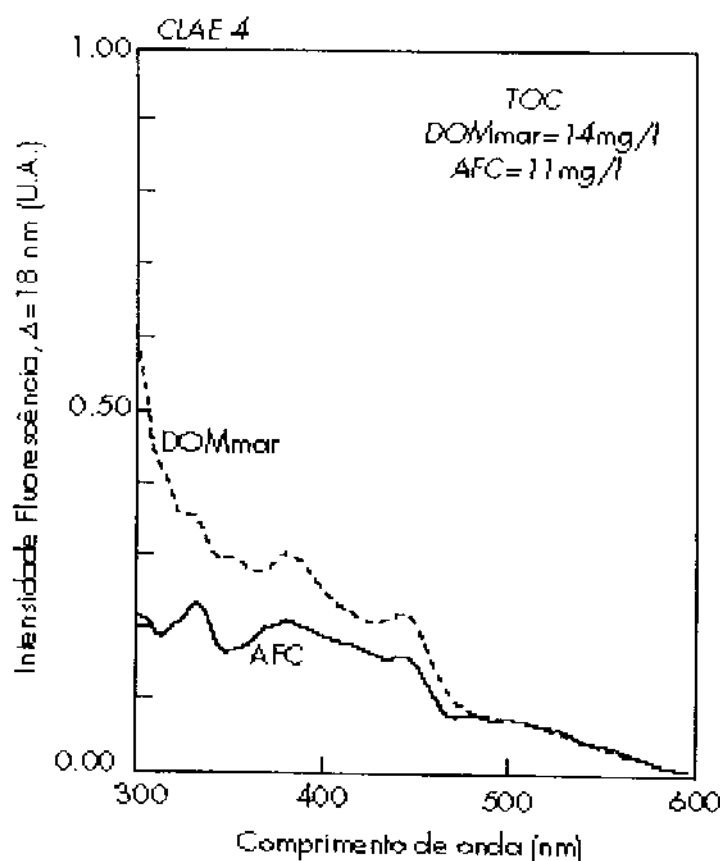


Figura III.17 Espectro de excitação sincronizada para a fração cromatográfica número 4 da DOMmar e AFC. Polaridade da fração 4=9.50.

mente que qualquer etapa de isolamento de matéria orgânica pode resultar em uma redução na diversidade de fluoróforos.

Não pode ser descartada a hipótese da semelhança fluorimétrica entre a DOMmar e o AFC ser devido ao processo de isolamento, como referido em Frimmel et alii (1992). Contudo, uma grande variedade de fluoróforos foi detectada, e o fracionamento cromatográfico permitiu assinalar algumas das diferenças existentes entre a matéria orgânica de origem terrestre e aquela de origem marinha.

Frimmel et alii (1992) examina a matéria orgânica aquática em concentrações naturais e seus ácidos fúlvicos. Os autores concluem que a diferença entre a água natural e seus produtos são maiores do que as diferenças entre os ácidos fúlvicos isolados, ainda que estes sejam de diferentes origens. Como demonstrado em Frimmel et alii (1992) deve-se sempre ter em

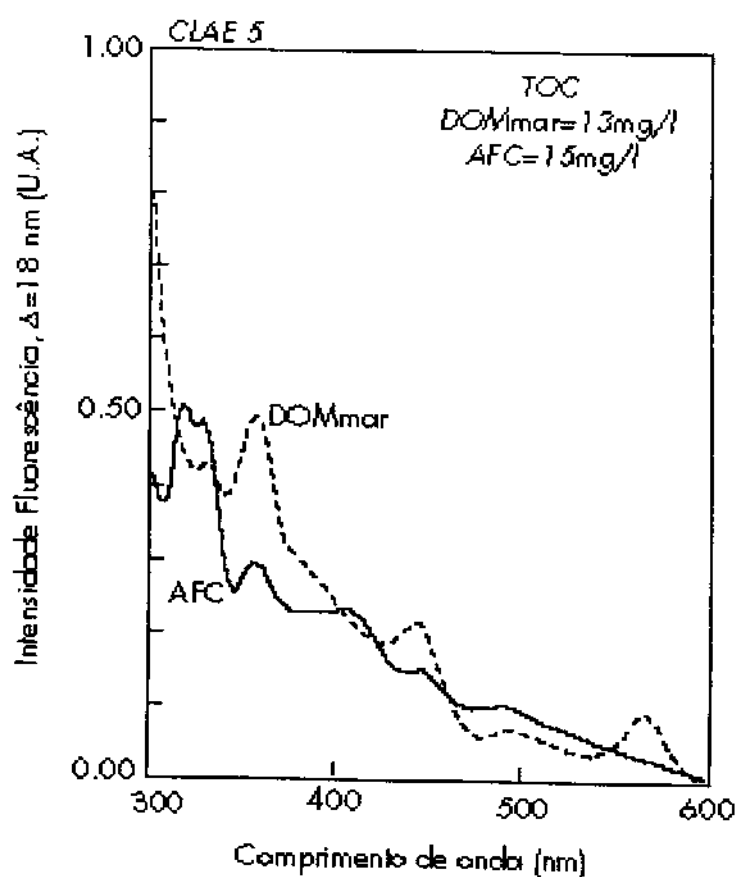


Figura III.18 Espectro de excitação sincronizada para a fração cromatográfica número 5 da DOMmar e AFC. Polaridade da fração 5=8.60.

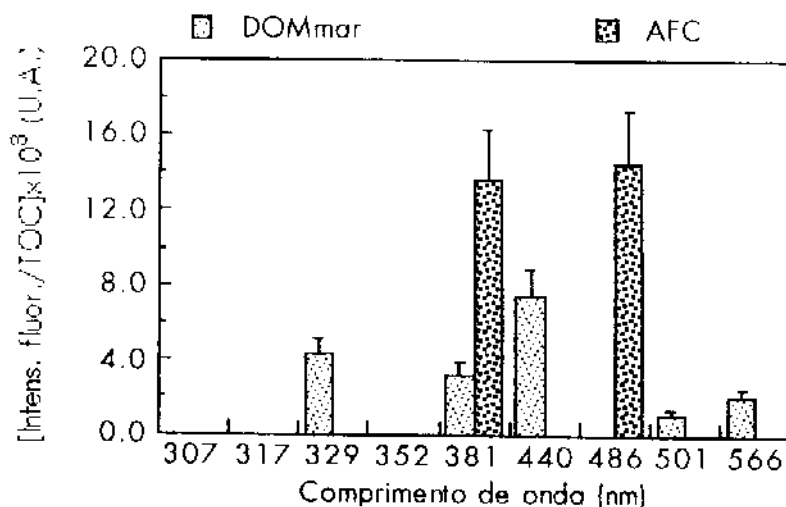


Figura III.19. Intensidade de fluorescência por unidade de carbono orgânico para o AFC e DOMmar antes do fracionamento cromatográfico. Dados obtidos do espectro de excitação sincronizada.

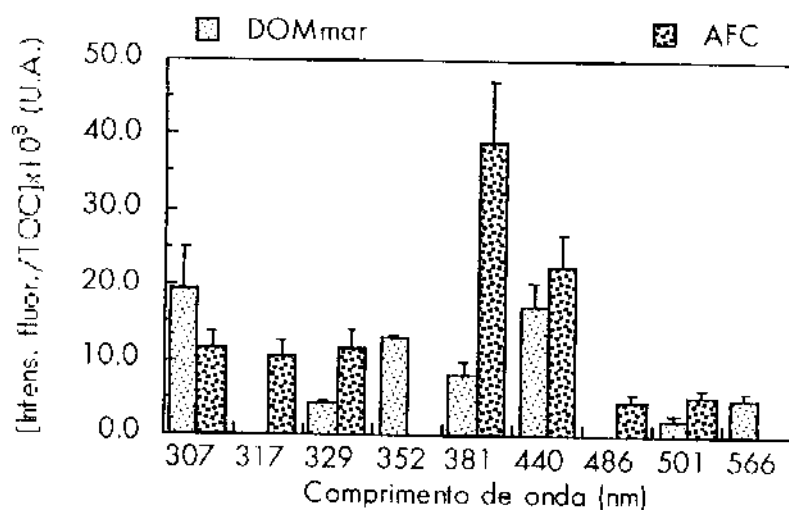


Figura III.20. Intensidade de fluorescência por unidade de carbono orgânico para o AFC e DOMmar após o fracionamento cromatográfico. Os valores de intensidade representam a soma daqueles obtidos para cada fração.

III. 5. Conclusão

O espectro de excitação sincronizada apresenta sensibilidade e seletividade suficientes para ser utilizado na caracterização fluorimétrica de matéria orgânica de origem natural.

Uma das diferenças entre a matéria orgânica de origem terrestre e aquela de origem marinha detectadas através do espectro de emissão convencional foi quantitativa. Além disso, foi registrado um deslocamento para o azul no comprimento de onda de máxima emissão da matéria orgânica dissolvida marinha em relação à terrestre.

O espectro de excitação sincronizada mostrou diferenças qualitativas, ie, que alguns fluoróforos são específicos: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 566/584 nm (DOMmar), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 405/423 nm (AFC), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 317/335 nm (AFC), enquanto a maioria detectada está presente na matéria orgânica independente de sua origem.

Capítulo IV

Complexação da matéria orgânica com íons cobre

IV. 1. Introdução.....	80
IV. 2. Considerações Teóricas	83
IV. 3. Materiais e Métodos	91
IV. 4. Resultados e Discussão	97
IV. 5. Conclusão	111

XV. 1. Introdução

Vários estudos têm mostrado que a matéria orgânica natural forma complexos estáveis com íons metálicos (Jardim e Allen, 1984, Sposito, 1986), e que a maior parte do cobre presente na água do mar encontra-se sob a forma de complexo orgânico (Mills et alii, 1982). Segundo Sunda e Hanson (1987), cerca de 99.8 a 99.9% do total de cobre dissolvido é encontrado como complexo orgânico, e somente os outros 0.03 a 2% é que aparecem como espécies inorgânicas.

Atuando sobre a solubilidade de íons metálicos, a complexação aumenta a concentração total da espécie dissolvida, de modo que a concentração de metal solúvel pode ser considerada como sendo o resultado da soma da concentração de metal livre e da concentração de todos seus complexos (Holm e Barcelona, 1988). Como a mobilidade de um íon metálico é função de sua solubilidade, a complexação pode aumentar o transporte de metais tóxicos no ambiente. Além disso, a complexação pode influenciar a transformação dos metais através da alteração na disponibilidade de metais tóxicos e/ou essenciais aos microorganismos (Sunda et alii, 1984; Holm e Curtiss, 1990).

O grau de interação entre o metal e a matéria orgânica em ambientes naturais, é, segundo Mantoura et alii (1978), controlado por fatores como a constante de estabilidade condicional (força de associação entre a matéria orgânica e o metal) e concentração de ligante.

O valor da constante de estabilidade condicional (K') e da concentração do(s) ligante(s) (CL) podem ser obtidas através de técnicas

que sejam capazes de distinguir entre o ligante complexado e o ligante livre, ou então através da quantificação do metal livre (Saar e Weber, 1980).

A fluorescência, propriedade natural dos materiais orgânicos como ácidos húmicos e fúlvicos, é uma técnica que pode ser utilizada para obtenção dos parâmetros que descrevem a complexação (K' e CL). Uma diminuição do sinal fluorimétrico é observada à medida que a matéria orgânica se liga ao cobre (*extinção de fluorescência*). As vantagens desta técnica são várias: quantifica diretamente a matéria orgânica livre, pode ser utilizada em concentrações naturais (De Souza Sierra, 1992), pois é sensível a baixas concentrações de matéria orgânica (Cabaniss e Shuman, 1988a), além de ser facilmente utilizável em matrizes complexas tais como a água do mar.

O critério de detecção da extinção de fluorescência é determinado pela alteração mínima na fluorescência observável após a adição de metal, que por sua vez depende da sensibilidade e reprodutibilidade do espectrofluorômetro (Holm e Curtiss, 1988).

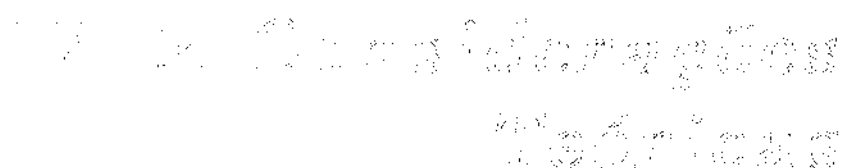
Devido à alta complexidade da matéria orgânica natural, os valores de constante de estabilidade condicional e concentração de ligante são provavelmente valores médios dos ligantes dominantes. Neste sentido, o fracionamento da matéria orgânica tem por objetivo caracterizar e agrupar os ligantes, tornando cada parcela mais homogênea.

A maior parte dos estudos de complexação de metal em frações da matéria orgânica investigam a distribuição quantitativa do metal nas diversas frações, principalmente quando baseadas em diferenças de polaridade (Lee, 1981; Hanson e Quinn, 1983; Mackey, 1985; Zhou e Wangersky, 1989). A informação obtida com tais estudos é, porém, limitada quanto à força de associação entre matéria orgânica e metal, e concentração de ligante. São poucos os estudos que descrevem a cinética de formação do complexo matéria orgânica-metal para frações da matéria orgânica, apesar de neste caso, informações mais detalhadas serem obtidas (Plavsic e Branica, 1986).

Um dos problemas enfrentados pela técnica de extinção de fluorescência é a análise matemática dos dados experimentais, cujo

objetivo é a obtenção da constante de estabilidade condicional e concentração de ligante. Dentre os modelos matemáticos encontrados na literatura, está aquele proposto por Ryan e Weber (1982a). Porém este modelo fornece, em alguns casos, valores irreais de concentração de ligante. Problema semelhante foi verificado por Holm (comunicação pessoal), que sugeriu o desenvolvimento de um modelo com pelo menos dois ligantes. Então, a partir do modelo original de Ryan e Weber (1982a) e com o auxílio do Prof. César R. de Oliveira (Depto. de Matemática, Universidade Federal de São Carlos, Brasil), foi desenvolvido um modelo para n -ligantes, que aplicado aos dados experimentais do presente trabalho forneceu valores coerentes de concentração de ligante, valores estes que estão de acordo com outros da literatura.

Nesta seção, a DOMmar e o AFC, assim como suas respectivas frações cromatográficas foram caracterizadas em relação às suas propriedades de complexação com cobre.



A especiação de um íon metálico em águas naturais é função da concentração do metal, da natureza e concentração dos ligantes orgânicos e inorgânicos, das interações do complexo formado com outros metais e ligantes, bem como do pH, o qual controla todas as chamadas interações secundárias envolvendo metais e ligantes (Holm, 1988; Perdue, 1989). A grande fração dos compostos orgânicos em águas naturais é formada por substâncias húmicas, onde os componentes individuais são desconhecidos e cuja estrutura, até o presente momento, encontra-se descrita de maneira incompleta. Segundo Perdue (1989) não é possível uma descrição completa das reações concorrentes de uma mistura de ligantes cujos componentes individuais são desconhecidos. Esta mistura desconhecida de muitos compostos, definida por Buffle (1988) como 'estrutura detrital dinâmica', é fluorescente e apresenta propriedades complexantes em águas naturais.

Medidas de extinção de fluorescência são baseadas no fato de que metais paramagnéticos, tais como o cobre, ao se ligarem ou simplesmente interagirem de algum modo com a molécula de substância orgânica de origem natural causam uma redução no sinal fluorimétrico por ela emitido originalmente. Sabe-se que um metal paramagnético apresenta spins não pareados em sua configuração eletrônica, gerando assim um campo magnético (Chang, 1981). A aproximação de um metal paramagnético a uma molécula pode

resultar em uma alteração na conformação desta, e qualquer alteração molecular pode, por sua vez, causar uma modificação na fluorescência emitida. Portanto a queda do sinal fluorimétrico pode ou não ser o resultado da ligação do íon metálico com um ligante fluorescente específico. Além disso, o metal paramagnético pode levar a um aumento em processos que competem com a fluorescência.

A extinção da fluorescência em titulações complexométricas quantifica a fração livre da substância orgânica, i.e., a parte não ligada ao metal. Quando aplicada a modelos matemáticos adequados, a variação do sinal fluorimétrico durante a titulação de uma amostra com um íon metálico, possibilita a obtenção de constante de estabilidade condicional (K') e concentração do ligante (CL). Dos métodos disponíveis para estudos de complexação em ambientes marinhos e estuarinos, extinção da fluorescência encontra-se dentro daqueles que causam menor perturbação ao sistema.

A modelagem dos dados experimentais da substância orgânica de origem natural sofre porém diversas dificuldades, e duas parecem ser as causas principais:

- a. Ausência de informações. Até o presente momento não há informação quanto à estrutura molecular da substância orgânica de origem natural; conhecem-se apenas alguns dos seus grupos funcionais reativos com prótons, tais como grupos carboxila, fenólico, quinona, carboxila cetônica, e segundo Perdue (1989), amino e sulfidrilas em menor quantidade
- b. Alteração da estequiometria que descreve as constantes de complexação durante o processo de titulação, i.e., conforme passa-se de baixa para alta concentração de metal no meio. Com isto, segundo Ventry et alii (1991), pode-se passar de uma relação 1:1 do complexo metal/ligante no início da titulação para 2:1 em situações de término de titulação.

As reações entre um íon metálico M, e um ligante orgânico L, que se combina com M para formar o complexo ML, pode ser descrita de acordo com a concentração das várias espécies segundo a equação de ação das massas (1) e de balanço de massas, (3) e (4) (omitindo-se as cargas por simplificação).



$$K' = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (2)$$

$$CL = [ML] + [L] \quad (3)$$

$$CM = [ML] + [M] \quad (4)$$

[M] e [L] referem-se à concentração das formas livres ou não combinadas de M e L, respectivamente,

[ML] refere-se à concentração do complexo formado e,

K' é a constante de estabilidade condicional

A hipótese normalmente assumida ao utilizar a técnica de extinção de fluorescência para obtenção de informações quanto à complexação de um íon metálico com a substância orgânica é:

$$[ML] = B(100 - I); \quad (5)$$

B é uma constante de proporcionalidade, onde para cada par metal-ligante formado, uma diminuição equivalente ocorre no sinal fluorimétrico,

I é a intensidade de fluorescência em cada ponto da curva de titulação complexométrica.

O limite mínimo de fluorescência (I_{ML}), que é a fluorescência ou do complexo formado e/ou da substância orgânica livre, é o caso extremo onde há a saturação de metal no meio, e onde pode-se assumir que os ligantes disponíveis tenham sido preenchidos pelo metal. Nesta situação tem-se que a concentração de ligante [CL] é proporcional a tudo que deixou de fluorescer, i.e., $Q_{\text{máx.}} = (100 - I_{ML})$. Foram estas ideias que levaram Ryan e Weber (1982a) a derivarem a expressão (6) que relaciona a intensidade de fluorescência, quantificada durante o

processo de titulação complexométrica, com a fração de ligante complexado ao metal paramagnético, no caso cobre.

Considerando complexação com um único ligante, tem-se

$$\frac{[ML]}{CL} = \frac{B(100-I)}{B(100-I_{ML})} = \frac{100-I}{100-I_{ML}} \quad (6)$$

Relacionando esta equação com a de balanço de massas (3) e (4), Ryan e Weber (1982a) obtiveram a equação (7).

$$I = \frac{I_{ML} - 100}{2K'CL} \left[(K'CL + K'CM + 1) - \sqrt{(K'CL + K'CM + 1)^2 - 4K'^2 CLCM} \right] + 100 \quad (7)$$

A equação (7) descreve a curva de titulação complexométrica obtida através de extinção de fluorescência e foi utilizada em Ventry et alii (1991) para o ajuste de curva (1:1, metal/ligante) e consequente obtenção da constante de estabilidade condicional e concentração de ligante para ácido fúlvico terrestre. A figura IV.2a (página 98) ilustra uma curva de titulação para o AFC (o mesmo material utilizado em Ventry et alii (1991)) e seu ajuste segundo a equação (7).

A equação (7) quando aplicada aos dados de matéria orgânica dissolvida marinha e ao ácido fúlvico de Conway após o tratamento com a resina Sep-Pak tC18 resultou em valores de CL negativos. Este fato parece ser comum com modelos matemáticos que incluem apenas um sítio de complexação (1:1). Resultados semelhantes, i.e. valores negativos, para a concentração de ligante, foram obtidos por Holm (1988). Segundo este autor (comunicação pessoal), o problema de concentração de ligantes negativos pode ser evitado através da inclusão de dois, ou mais, ligantes no modelo. Assim, como apresentado em de Oliveira et alii (1995) (ver apêndice), foi desenvolvido um modelo com múltiplos ligantes derivado daquele originalmente proposto por Ryan e Weber (1982a) para apenas um ligante.

Para este modelo os parâmetros de interesse básico são as *i* concentrações de ligantes CL_i , e as correspondentes constantes de estabilidade condicional para determinadas condições experimentais.

$$K'_i = \frac{[ML_i]}{[M][L_i]} \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (8)$$

sendo N o número de diferentes ligantes, $[M]$ a concentração de metal livre, $[L_i]$ a concentração do i -ésimo ligante não complexado, e $[ML_i]$ a concentração de metal ligado ao i -ésimo ligante.

O balanço de massa é então dado por

$$CM = [M] + \sum_{i=1}^N [ML_i] \quad (9)$$

$$CL_i = [L_i] + [ML_i] \quad (10)$$

sendo CM a concentração total de metal e CL_i a concentração total de ligantes.

Combinando as equações (8) e (10), obtém-se

$$[ML_i] = \frac{[M]K'_i CL_i}{1 + [M]K'_i} \quad (11)$$

A hipótese fundamental resultante assumida é que a eficiência quântica independe do ligante, i.e., é igual para qualquer ligante e varia linearmente com a complexação. No caso de titulação de ácido fúlvico com $Cu(II)$, foi demonstrado por Cabaniss e Shuman (1986) e, Saar e Weber (1980) que a eficiência quântica varia linearmente com concentrações de metal até $3 \cdot 10^{-5} M$. Assim

$$\sum [ML_i] = B(100 - \sum I_i) \quad (12)$$

$$\frac{\sum [ML_i]}{\sum CL_i} = \frac{(100 - \sum I_i)}{100 - I_{ML}} \quad (13)$$

Considerando então a hipótese fundamental, tem-se

$$\chi = \frac{100 - I}{100 - I_{ML}} = \frac{\sum_{i=1}^N [ML_i]}{\sum_{i=1}^N CL_i} \quad (14)$$

Da equação (9) vem que

$$[M] = CM - \sum_{i=1}^N [ML_i] = CM - \chi \sum_{i=1}^N CL_i \quad (15)$$

Substituindo a expressão (15) na equação (11) e após algumas manipulações, a equação principal é obtida

$$\chi = \left(\frac{CM}{\sum_{i=1}^N CL_i} - \chi \right) \left(\sum_{j=1}^N \frac{K'_j CL_j}{1 + K'_j (CM - \chi \sum_{i=1}^N CL_i)} \right). \quad (16)$$

Para $N=1$, esta equação se reduz ao modelo originalmente proposto por Ryan e Weber (1982a), i.e., a expressão de ajuste de curva (7).

A equação principal modela a curva de titulação de metal em termos da concentração de ligante complexado em função das constantes de estabilidade condicional e concentração de ligante. Partindo dos pontos experimentais de intensidade de fluorescência (I) e concentração total de metal (CM) estima-se os melhores K'_i e CL_i à partir da equação (16).

Para $N=1$, os parâmetros K'_1 e CL_1 podem ser calculados por ajuste de curva através de métodos padrões de regressão não-linear. Observe que para $N \geq 2$, tem-se uma função implícita de χ e como a relação funcional torna-se relativamente complicada, os métodos numéricos padrões (Press et alii, 1988) mostram-se insatisfatórios para estimar os parâmetros de interesse. Um procedimento alternativo para estimá-los, o qual aproveita diretamente a velocidade de cálculo dos atuais micro computadores, é descrito a seguir.

Com a curva de titulação, tem-se os valores de CM e I. Aplica-se então um ajuste de curva não-linear para $N=1$, utilizando-se a equação (7), i.e., aquela descrita por Ryan e Weber (1982a) para a obtenção dos valores de I_{ML} e χ . Considere a função

$$G(CM, \chi) = \left| \chi - \left(\frac{CM}{\sum_{i=1}^N CL_i} - \chi \right) \left(\sum_{j=1}^N \frac{K'_j CL_j}{1 + K'_j (CM - \chi \sum_{i=1}^N CL_i)} \right) \right| \quad (17)$$

($|x|=x$ se $x \geq 0$ e $-x$ se $x < 0$). Se v é o número de pares experimentais, dados por (CM_m, χ_m) , $m=1, 2, \dots, v$, os valores de K'_i e CL_i são estimados como sendo aqueles tais que a função erro

$$E(K'_i, CL_i) = \sum_{m=1}^v G(CM_m, \chi_m) \quad (18)$$

atinge o seu mínimo. O caso ideal é certamente $E=0$.

Uma amplitude de valores de K'_i e CL_i é fixada e um valor arbitrário pertencente a esta amplitude é escolhido por exemplo $K'_i, 0$ e $CL_i, 0$, $i = 1, 2, \dots, N$, e o valor da função E nos pontos escolhidos é calculado [$E(K'_i, 0, CL_i, 0)$]. Então, aleatoriamente, um outro ponto pertencente à amplitude de valores de $K'_i, 0$ e $CL_i, 0$, $i = 1, 2, \dots, N$, é escolhido, por exemplo $K'_i, 1$ e $CL_i, 1$, e a função E é novamente calculada e comparada com a anterior. O par K'_i e CL_i que apresentar a maior função erro será então descartado. Este procedimento é repetido várias vezes, e então a amplitude original de K'_i e CL_i é alterada, de modo que cerca-se o valor de K'_i e CL_i que apresente o menor erro. Após um número suficientemente grande de iterações, uma boa aproximação dos melhores valores de K'_i e CL_i deverá ser encontrada.

Com os candidatos K'_i e CL_i cuja função erro apresente o menor valor, são feitos vários gráficos. Neste, E é lançado em função de K'_i , e verifica-se graficamente se o ponto mínimo é encontrado. E é também lançado em função de CL_i , e então o melhor par K'_i e CL_i é finalmente definido. Nesta etapa final, os valores de K'_i e CL_i que não estão em processo de verificação são mantidos fixos. Este processo de

verificação deve ser feito para cada K'_i e CL_i encontrado. Se o modelo foi realizado para o cálculo de três ligantes, então 6 gráficos de verificação do ponto mínimo serão realizados, se foram dois ligantes, somente 4 destes gráficos serão necessários.

Com a intenção de testar o método, uma mesma amostra foi analisada através dos dois procedimentos, i.e., por regressão não-linear e o método descrito acima para $N=1$. Deste modo os valores de K' e CL considerando somente um ligante devem ser os mesmos. De fato, os valores encontrados reproduziram aqueles obtidos por rotinas padrões para ajustes não-lineares.

Além disso, o teste descrito acima permitiu comparar as condições nas quais foram realizadas os experimentos, pois a amostra utilizada (AFC) é o mesmo material utilizado em Ventry et alii (1991). Os valores encontrados no presente trabalho para um sítio são muito próximos aos de Ventry et alii (1991). Os autores obtiveram $\log K'$ de $5,23 \pm 0,17$ e $\log CL$ de $-4,79 \pm 1,20$ para uma solução de AFC titulada com cobre, enquanto que os obtidos pelo procedimento aqui proposto forneceram os valores de $5,51 \pm 0,12$ para $\log K'$ e $-4,74 \pm 0,07$ para $\log CL$.

2.2.2. Titulações com o íon cobre

As titulações complexométricas foram feitas com três materiais orgânicos. Ácido fúlvico de Conway (AFC) fornecido pelo prof. J. Weber da universidade de New Hampshire, E.U.A. (detalhes do processo de purificação e extração podem ser encontrados em Weber e Wilson, 1975), matéria orgânica dissolvida marinha (DOMmar) extraída através de colunas Sep-Pak tC18 cujo procedimento encontra-se descrito na seção II deste trabalho, e substância húmica comercial, SH, (Fluka Chemie, Suíça, lote. No. 35069989) sem prévia purificação.

As titulações foram feitas com o íon cobre. Uma solução concentrada (10^{-2} M) foi preparada a partir de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (BDH Ltd., Inglaterra) em água Milli-Q e o pH ajustado para 4. A partir desta solução foram feitas as de concentrações mais baixas (10^{-3} M a 10^{-5} M) e filtradas através de filtros de membrana (acetato de celulose) (Sartorius) com $0.45\ \mu\text{m}$ de diâmetro de poro, para utilização diária.

As titulações foram feitas em $\text{pH } 7.00 \pm 0.05$, com HEPES (ácido *N*-2-hidroxietilpiperazina-*N'*-2-etanosulfônico, ultra-puro, Fluka Chemie) em concentração 10^{-2} M como agente tamponante. A utilização deste tampão foi sugerida por Ventry et alii (1991) para experimentos de extinção de fluorescência. Além disso, Good et alii (1966) mostrou que HEPES tem uma baixa afinidade por cobre. A escolha de pH 7.00 foi baseada no fato de que a reação entre um íon metálico e um ligante é em geral favorecida em valores intermediários de pH, onde a hidrólise do metal bem como a protonação do ligante são minimizadas (Perdue, 1989). Quando necessário, o pH era ajustado com soluções diluídas e previamente filtradas de NaOH (Carlo Erba) ou HCl (Merck). O pH foi

monitorado com o auxílio de um pHmetro, pHM82 - Radiometer (Copenhagen).

Para a definição das condições experimentais foi utilizada a substância húmica, SH, e a obtenção dos valores de K' e CL foi feita a partir do modelo que prevê a complexação com dois ligantes.

Espalhamento de luz foi seguido através de medidas de Rayleigh a 450 nm de comprimento de onda de excitação. Quando o valor do espalhamento atingiu o dobro do valor inicial (espalhamento sem a adição de metal), como sugerido por Ryan e Weber (1982a), foi assumido que precipitação ou formação de agregados havia começado. Assim, qualquer valor de fluorescência onde as concentrações de metal eram equivalentes ao espalhamento duplicado ou maior, não foram utilizadas para os cálculos.

Um spectrofluorômetro Jasco mod. FP 770 (Japão), foi usado para as medidas de fluorescência. O comprimento de onda de excitação foi de 350 nm e a emissão registrada em 450 nm para a SH e ácido fúlvico, e 440 nm para a DOMmar. Os monocromadores de excitação e emissão foram ajustados para 5 e 10 nm respectivamente. Todas as outras condições de spectrofluorômetro encontram-se descritas na seção III.2 deste trabalho.

Um estudo de correlação tem por objetivo avaliar a presença ou ausência de uma relação linear entre duas variáveis (Zar, 1984). Mesmo que haja a relação, não há, necessariamente, uma relação de dependência entre as duas variáveis. Assim, o estudo nos fornece indícios de comportamento, sendo de grande valia quando da investigação de diversas variáveis, conhecido então por estudo de correlação múltipla.

O efeito da concentração de HEPES nas características de complexação, i.e., constante de estabilidade condicional e concentração de ligante, foi avaliado através do estudo de correlação múltipla para três concentrações do tampão: 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} M. Estes resultados são mostrados na tabela IV.I.

A correlação inversa entre a concentração de HEPES e o quanto a SH deixou de fluorescer, i.e., $100-I_{ML}$ ($Q_{máx.}$) é significativa, assim como a concentração de HEPES e a concentração de ligante

(CL2). O estudo nos mostra que apesar do tampão contribuir com o valor da concentração de um dos ligantes (CL2), ele não exerce influência detectável nos valores de qualquer uma das constantes de estabilidade condicional ($K'1$ e $K'2$). A relação entre o quanto a SH deixou de fluorescer com $\log K'2$, e $\log CL2$ sugere que entre os dois sítios de complexação existentes no modelo, apenas um deles parece estar diretamente associado com as medidas de extinção de fluorescência.

Tabela IV.I. Correlação múltipla mostrando o efeito da concentração de HEPES na complexação de substância húmica comercial. Condições experimentais: concentração de SH = $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, TOC = $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, concentração KCl = 10^{-2} M .

	[HEPES]	Q máx.	$\log K'1$	$\log K'2$	$\log CL1$	$\log CL2$
[HEPES]	1					
Q máx.	-0.904	1				
$\log K'1$	0.453	-0.791	1			
$\log K'2$	-0.646	0.910	-0.973	1		
$\log CL1$	-0.680	0.302	0.345	-0.120	1	
$\log CL2$	0.958	-0.989	0.690	-0.838	-0.441	1

Nestas titulações, a força iônica das soluções foi ajustada para 0.015 M com KCl (Suprapur, Merck, Alemanha), exceto quando especificado. O efeito da concentração de KCl nas características de complexação pode ser visto através dos resultados apresentados na tabela IV.II. As concentrações de KCl utilizadas foram: 10^{-1} M , 10^{-2} M e nenhuma adição de KCl.

Analisando a tabela IV.II vê-se que a concentração de KCl apresenta uma alta correlação com vários dos parâmetros de complexação. KCl foi utilizado para ajuste da força iônica, pois já encontrava-se presente nas frações cromatográficas, uma vez que faz parte da fase móvel (seção II.2). O coeficiente de correlação negativo entre a concentração de KCl com o quanto a SH deixou de fluorescer e

com K'2, mostra a provável atuação do cloreto como agente competidor com sítios de complexação na matéria orgânica natural, competindo com esta pelos íons Cu(II). A concentração de KCl teve também seu efeito sobre a concentração de ligantes (CL1) e sobre a força de interação entre a MO e o metal cobre (K'1). Está portanto clara, a necessidade de padronização da força iônica para uma comparação entre os resultados deste trabalho e aqueles da literatura.

Tabela IV.II. Correlação múltipla mostrando o efeito da concentração de KCl na complexação de substância húmica comercial. Condições experimentais: concentração de SH = 10 mg.l⁻¹, TOC = 3.0 mg.l⁻¹, concentração HEPES = 10⁻²M.

	[KCl]	Q máx.	log K'1	log K'2	log CL1	log CL2
[KCl]	1					
Q máx.	-0.971	1				
log K'1	0.943	-0.836	1			
log K'2	-0.986	0.997	-0.876	1		
log CL1	0.939	-0.830	1	-0.871	1	
log CL2	0.814	-0.651	0.961	-0.701	0.964	1

Ainda com o intuito de definir as condições experimentais, foram feitos experimentos considerando a modalidade de titulação, entre tipo *contínua*, onde as adições de metal são feitas de modo sucessivo em uma mesma cela titulométrica, até o término da titulação, e do tipo *discreta*, onde há uma cela titulométrica para cada adição de metal. Confirmando os resultados de Ventry et alii (1991), não foram obtidas diferenças significativas entre as duas modalidades. Por questão de simplicidade, foi então escolhido o tipo *contínua* para a realização dos presentes experimentos.

O tempo de equilíbrio da reação entre o metal e a substância orgânica foi também avaliado. Para isto, uma adição de metal resultando em concentração final de 30.10⁻⁶ M foi feita na cela

titulométrica e a fluorescência verificada. Foi obtido que após cerca de três minutos, a resposta fluorimétrica apresentava-se constante. A figura IV.1. mostra estes resultados.

As medidas de extinção de fluorescência nas diversas amostras, oriundas ou não, da separação cromatográfica foram realizadas após avaliação de carbono orgânico total. Este teve por finalidade deixar as concentrações de carbono orgânico constante nas diversas amostras. Esta concentração oscilou entre 5 e 10 mg.l⁻¹, dependendo da fluorescência de cada amostra. Deste modo as condições do fluorômetro foram mantidas constantes. A concentração de carbono orgânico total foi medida pelo método de combustão catalítica em altas temperaturas com detecção através de infravermelho (Dorhamann DC-190).

O processo cromatográfico utilizado para o fracionamento da substância orgânica a ser analisada para extinção de fluorescência é uma modificação daquele descrito em Lombardi, et alii (1992) (ver apêndice). A modificação constou da utilização de uma solução KCl (4 x 10⁻³M, pH 7.00) à qual foi acrescentado 2% de acetonitrila como um dos solventes da fase móvel. Detalhes do procedimento podem ser encontrados na seção II.2.

O procedimento de limpeza do material de laboratório (polipropileno, polietileno, Teflon® ou quartzo) era de lavagem com ácido (HNO₃ 3M), e depois deixados em imersão em solução de HNO₃, 0,8 M até o momento de uso. Todo o material era enxaguado com água Milli-Q imediatamente antes de ser utilizado. Entre uma titulação e outra, as cuvetas de quartzo eram primeiramente enxaguadas com álcool etílico (BDH Ltd. Poole, Inglaterra) e água Milli-Q para remoção da matéria orgânica, e posteriormente com HNO₃ 6M (15 minutos iniciais e depois mais 5 minutos com nova solução) para remoção de metal. Este procedimento foi visto suficiente para a remoção de qualquer traço de matéria orgânica e metal possível de ser detectado através de fluorescência.

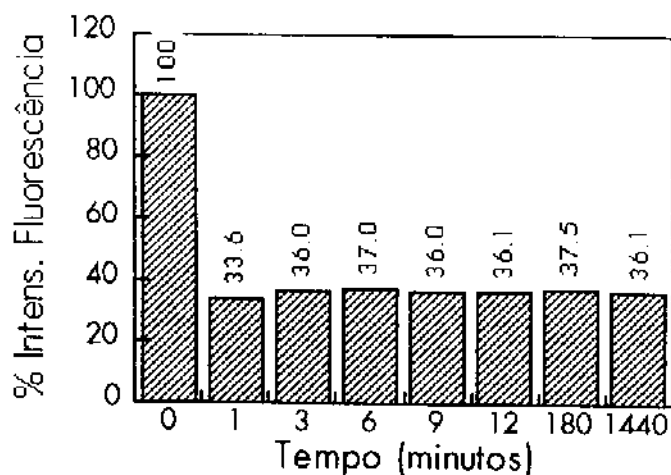


Figura IV.1. Porcentagem da intensidade de fluorescência em função do tempo após adição de metal na cela titulométrica. Tempo zero equivale à fluorescência inicial (sem adição de metal).

As seguintes condições experimentais foram definidas para as titulações: força iônica = $1,5 \cdot 10^{-2}$ M, concentração de HEPES = 10^{-2} M, pH $7,00 \pm 0,05$, tempo de equilíbrio = 3 a 5 minutos após adição de metal. Todo o material era filtrado em filtros de acetato de celulose (Sartorius) com $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro imediatamente antes do início de cada titulação.

IV. 4. Resultados e Discussão

As curvas de titulação são mostradas nas figuras IV.2 e IV.3 para as substâncias orgânicas de origem marinha e terrestre respectivamente. Observa-se que os valores de I_{ML} são em geral mais altos para as amostras marinhas, o que pode estar associado ao fato de que, segundo Milne e Zika (1989), há fluoróforos na DOMmar que são inacessíveis à complexação com o cobre.

O modelo para ajuste de curva com apenas um ligante apresentado em Ventry et alii (1991), apesar de descrever os resultados experimentais, fornece, em alguns casos, valores irrealistas de CL, i.e., negativos, como já mencionado anteriormente (seção IV.2). Portanto apenas com finalidade ilustrativa, este modelo foi utilizado para descrever a curva de titulação do AFC antes do tratamento através da resina Sep-Pak tC18. Os valores de constante de estabilidade condicional foram obtidos com a simulação que descreve a complexação de metal com dois e/ou três ligantes.

Para o AFC, substância orgânica já purificada, e com baixo limite de fluorescência (I_{ML}), a titulação foi feita com cerca de 14 pontos, quantidade suficiente de pontos para a determinação de $K'1$, CL1, $K'2$, CL2, $K'3$, CL3, os 6 parâmetros que descrevem a complexação, enquanto que no caso da DOMmar, as titulações incluíram cerca de 8 pontos. Esta diferença em número de pontos, ou seja, nas várias concentrações de metal adicionado é resultado dos altos valores de I_{ML} .

obtidos com a DOMmar, como pode ser observado nas figuras IV.2. e IV.3.

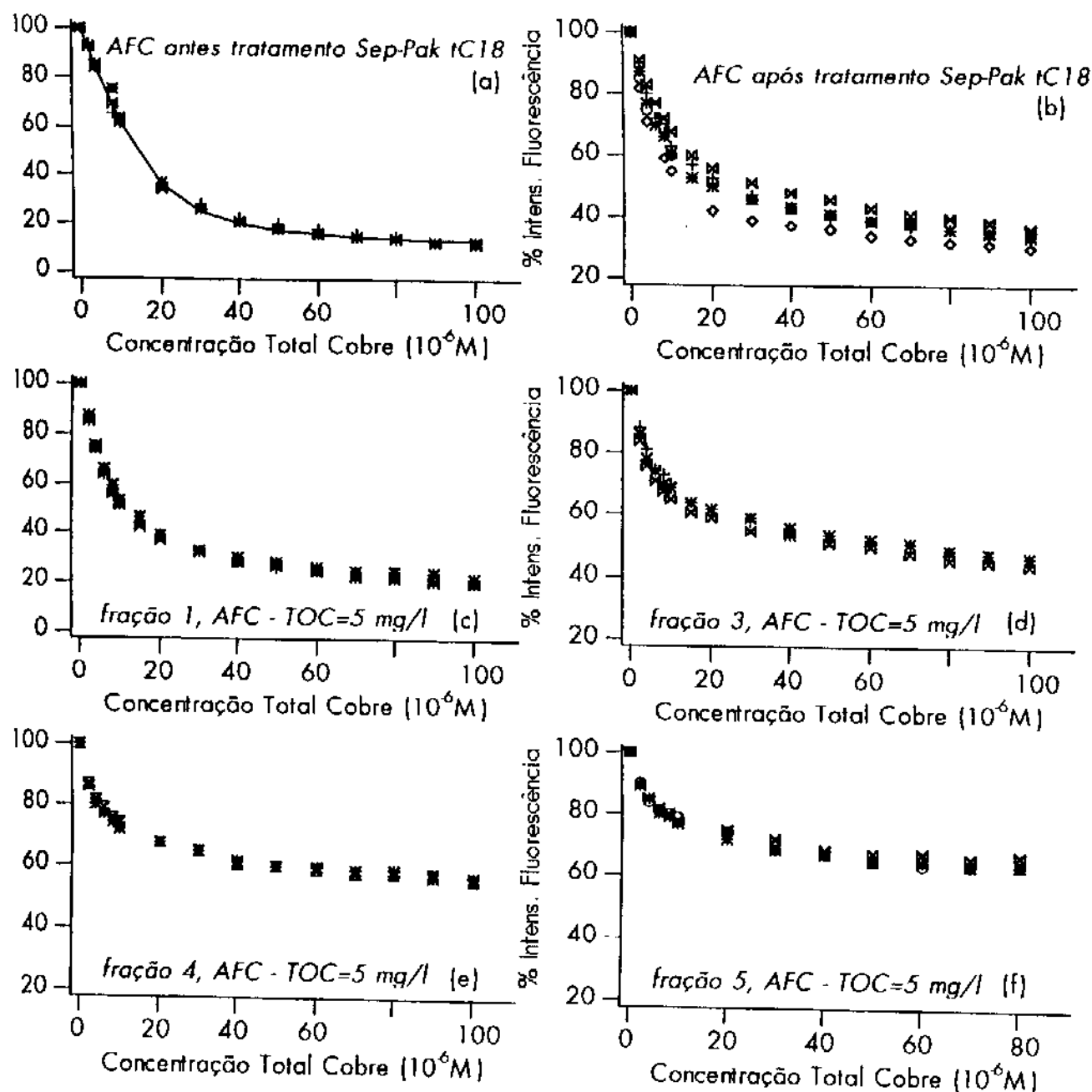


Figura IV.2. Curvas de titulação obtidas através de extinção de fluorescência para o ácido fúlvico de Conway (AFC). Cada símbolo representa uma réplica.

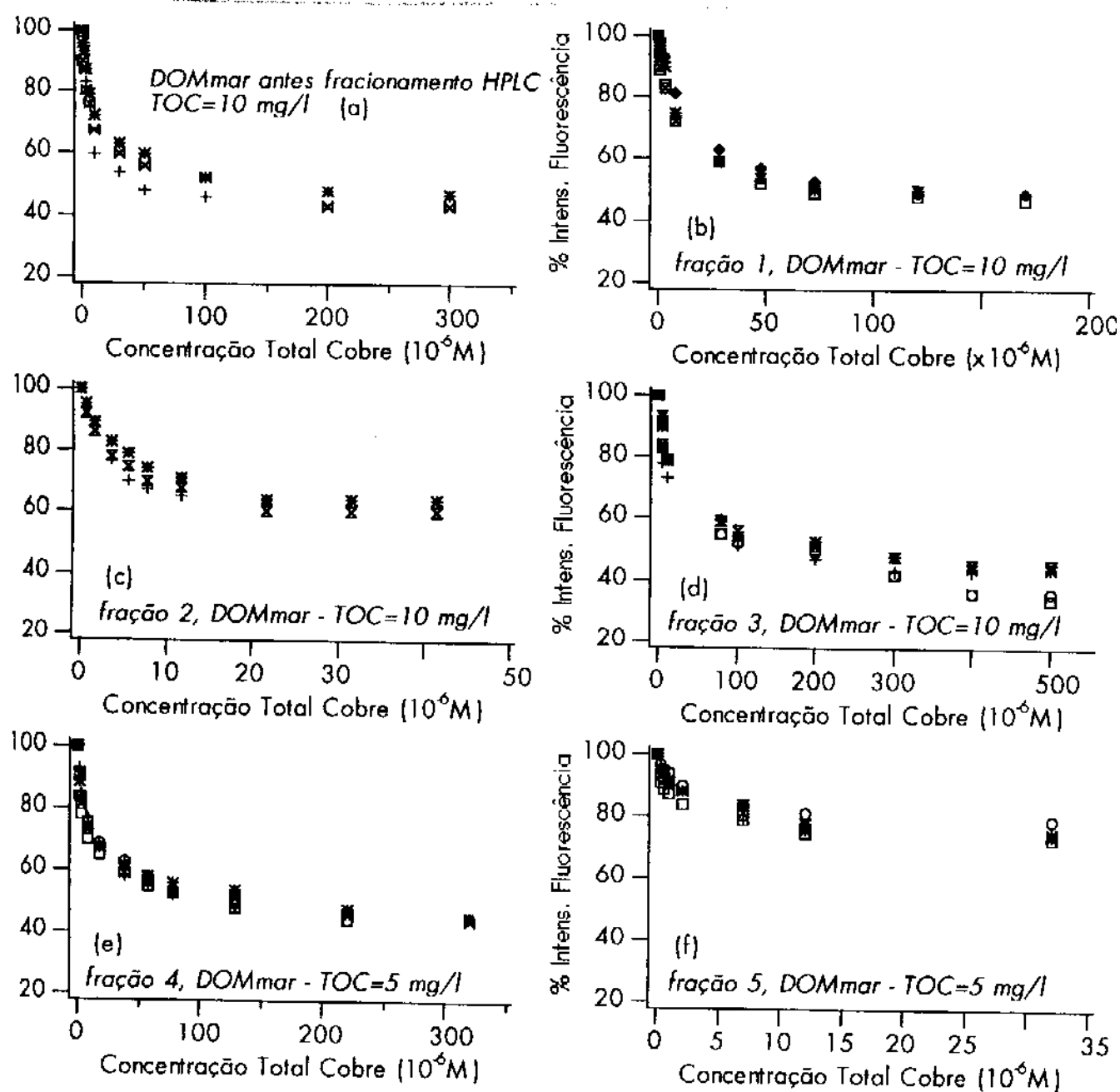


Figura IV.3. Curvas de titulação obtidas através de extinção de fluorescência para a matéria orgânica dissolvida marinha (DOMmar). Cada símbolo representa uma réplica.

Para a determinação de 6 parâmetros são necessários um mínimo de 12 pontos. Um baixo número de pontos tem como consequência uma função erro não bem determinada. Tem-se, por exemplo, que uma variação de 10^6 a 10^{20} no valor de um dos K' resulta em uma variação muito pequena da função erro, i.e., apenas na terceira

casa decimal. Portanto, o valor de K' pode não ser corretamente determinado. Além disso, dois dos valores de K' e dois dos valores de CL obtidos quando realizada a simulação com 3 ligantes para a DOMmar foram equivalentes àqueles obtidos com dois ligantes, e um terceiro K' e CL diversos, e neste caso o valor de CL foi da ordem de 10^{-8} - 10^{-11} M. Devido a estas incertezas, as amostras marinhas foram analisadas apenas para dois ligantes, enquanto que o AFC para dois e tres ligantes.

À partir das análises das curvas de titulação, foram obtidas as tabelas de correlação múltipla para a DOMmar e AFC (Tabela IV.III e IV.IV respectivamente). Os valores apresentados são os coeficientes de correlação, e aqueles em **negrito** são estatisticamente significativos considerando um nível de confiança de 90%. Como anteriormente mencionado, o estudo estatístico de correlação múltipla tem por finalidade detectar possíveis tendências entre as diversas variáveis.

Tabela IV.III. Correlação múltipla para a DOMmar. Características envolvidas no estudo: Polaridade (Polar.), tempo de eluição cromatográfico (Tr), intensidade de emissão de fluorescência para a primeira (λ_{ex} 350) e segunda (λ_{ex} 450) classe de fluoróforos, porcentagem da máxima extinção de fluorescência ($Q_{m\acute{a}x.} = 100 - IML$) e as constantes de complexação ($K'1$, $K'2$, CL1, CL2), apresentadas em log.

	Polar.	$K'1$	$K'2$	CL1	CL2	λ_{ex} 350	λ_{ex} 450	Tr
$K'1$	0.131	1						
$K'2$	-0.364	0.558	1					
CL1	-0.569	-0.681	-0.697	1				
CL2	0.178	-0.770	-0.956	0.723	1			
$\lambda_{ex}350$	-0.578	-0.743	0.117	0.140	0.179	1		
$\lambda_{ex}450$	-0.715	-0.358	0.298	-0.392	-0.064	0.776	1	
Tr	-0.958	-0.349	0.286	-0.422	-0.048	0.766	0.859	1
$Q_{m\acute{a}x.}$	0.580	-0.711	-0.782	0.898	0.811	0.157	-0.159	-0.370

Tabela IV.IV. Correlação múltipla para o AFC. Características envolvidas no estudo: polaridade (Polar.), tempo de eluição cromatográfico (Tr), intensidade de emissão de fluorescência para a primeira (λ_{ex} 350) e segunda (λ_{ex} 450) classe de fluoróforos, porcentagem da máxima extinção de fluorescência ($Q_{m\acute{a}x.} = 100 - I_{ML}$) e as constantes de complexação (K 1, K 2, CL1, CL2), apresentadas em log.

	Polar.	K 1	K 2	CL1	CL2	λ_{ex} 350	λ_{ex} 450	Tr
K 1	0.275	1						
K 2	-0.461	-0.801	1					
CL1	-0.418	-0.154	-0.474	1				
CL2	0.102	0.432	-0.832	0.854	1			
λ_{ex} 350	0.836	0.679	-0.870	0.031	0.541	1		
λ_{ex} 450	0.687	-0.074	-0.491	0.281	0.562	0.640	1	
Tr	-0.949	-0.495	0.718	0.154	-0.381	-0.965	-0.721	1
$Q_{m\acute{a}x.}$	0.861	0.646	-0.846	-0.001	0.517	0.999	0.662	-0.977

Analisando as tabelas acima, torna-se claro a forte correlação positiva entre o $Q_{m\acute{a}x.}$ e a emissão de fluorescência da primeira classe de fluoróforos (λ_{ex} 350). Isto pode significar que o ligante preferencial para cobre esteja associado com esta classe de fluoróforos, fato que não é observado ao se considerar a DOM_{mar}. Deste modo justifica a razão pela qual algumas amostras, quando submetidas à análise por extinção de fluorescência apresentam um alto limite mínimo de fluorescência (I_{ML}), causando sérias dificuldades para o tratamento matemático dos dados.

Holm e Barcelona (1988), em uma investigação sobre as propriedades de complexação de águas subterrâneas através de extinção de fluorescência, obtiveram um limite de fluorescência de até 80 - 90%, o que segundo Holm (com comunicação pessoal), torna muito difícil o tratamento dos dados. A correlação entre $Q_{m\acute{a}x.}$ e λ_{ex} 350 confirma também as observações de Cabaniss e Shuman (1986) de que ligantes fenólicos, do tipo salicílico, estão envolvidos na complexação de cobre com matéria orgânica dissolvida. Observação semelhante foi feita por Ghosh e Schnitzer (1981), que acreditam que grupos de fluoróforos

estejam envolvidos na complexação de cobre com matéria orgânica de origem terrestre.

A correlação inversa entre tempo de eluição cromatográfico (T_r) e Q máx. foi obtida somente para o AFC. Este resultado mostra uma tendência de diminuição dos ligantes fluorescentes com o aumento do tempo de eluição cromatográfico, i.e., com a diminuição da polaridade. Esta correlação, associada àquela obtida entre T_r e λ_{ex} 350 (emissão de fluorescência para a primeira família de fluoróforos) mostra que estes ligantes estão associados a fluoróforos excitáveis em 350 nm. Fato este confirmado pela correlação inversa observada entre T_r e λ_{ex} 350. Este resultado está de acordo com os mostrados na figura III.11 onde observa-se uma diminuição na fluorescência com a diminuição da polaridade das frações cromatográficas.

Em uma verificação dos resultados acima, seria de se esperar uma correlação entre qualquer um dos valores que descrevem a complexação ($K'1$, $K'2$, $CL1$, $CL2$) e λ_{ex} 350 nm. Apesar de ter sido obtido uma correlação de -0.870 entre $\log K'2$ e λ_{ex} 350 nm, e entre $\log K'2$ e Q máx. (-0.846), estes valores não são significativos considerando um intervalo de confiança de 90%.

Ryan e Weber (1982b) obtiveram uma correlação negativa entre K' e CL após a análise dos dados de extinção de fluorescência para águas naturais. Utilizando um modelo que prevê um único ligante na matéria orgânica natural, os autores explicam tal correlação como sendo um artefato resultante do tratamento matemático dos dados. No presente trabalho, uma correlação semelhante foi obtida para a DOMmar, porém não para o AFC. Neste caso, a correlação obtida (negativa) está abaixo do valor estatisticamente significativo, e portanto parece não ser apenas resultante de algum artefato.

Não é surpresa a correlação entre tempo de eluição cromatográfico (T_e) e polaridade. Como pode ser visto na figura II.2, as frações cromatográficas são eluídas à medida em que altera-se a composição (polaridade) da fase móvel, à exceção da fração cromatográfica 2 (DOMmar), que é eluída em uma mesma polaridade que a primeira fração. Neste caso porém, a coluna é lavada por mais tempo com a fase móvel, quando é finalmente eluída a segunda fração.

As tabelas IV.V. e IV.VI. mostram os valores de TOC, CL, e K' obtidos no presente trabalho para as duas classes de matéria orgânica, DOMmar e AFC respectivamente.

Tabela IV.V. Características de complexação para a DOMmar. Valores apresentados em log, $\pm$ desvio padrão de 4 análises. Carbono orgânico total (TOC) em $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Amostra	TOC	K 1	K 2	CL1	CL2
DOMmar	10	4.38 ± 0.12	5.56 ± 0.03	-5.67 ± 0.46	-5.66 ± 0.40
fração 1	10	4.97 ± 0.20	5.25 ± 0.30	-6.55 ± 0.90	-6.24 ± 1.20
fração 2	10	5.24 ± 0.06	6.55 ± 0.32	-6.75 ± 0.42	-7.66 ± 0.12
fração 3	10	3.98 ± 0.20	5.37 ± 0.27	-5.85 ± 0.30	-5.93 ± 0.27
fração 4	5	4.36 ± 0.07	5.81 ± 0.15	-6.68 ± 0.80	-6.46 ± 0.34
fração 5	5	4.84 ± 0.6	6.33 ± 0.70	-7.18 ± 0.40	-7.14 ± 0.70

Tabela IV.VI. Características de complexação para o AFC. Valores apresentados em log, $\pm$ desvio padrão de 3 análises. Carbono orgânico total (TOC) em $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. AFC* corresponde ao AFC antes do tratamento com a resina Sep-Pak tC18.

Amostra	TOC	K 1	K 2	CL1	CL2
AFC*	5	5.41 ± 0.14	5.41 ± 0.14	-4.96 ± 0.22	-5.70 ± 1.00
AFC	5	4.70 ± 0.13	5.49 ± 0.14	-6.11 ± 0.87	-6.06 ± 1.00
fração 1	5	4.80 ± 0.06	5.50 ± 0.10	-5.88 ± 0.17	-5.29 ± 0.04
fração 3	5	4.54 ± 0.02	5.70 ± 0.14	-5.91 ± 0.04	-5.88 ± 0.08
fração 4	5	4.62 ± 0.05	5.80 ± 0.10	-6.50 ± 0.30	-6.58 ± 0.09
fração 5	5	4.65 ± 0.10	5.69 ± 0.07	-7.43 ± 0.24	-7.57 ± 0.32

Análise de variância e teste de contraste múltiplo ('Scheffé F-teste') com 95% de intervalo de confiança realizada com as amostras do AFC mostrou que K'1 é diferente de K'2, exceto para o AFC*. Mostrou também que CL1 é igual ao CL2, exceto para a primeira fração cromatográfica. Para a DOMmar, a análise de variância mostrou que para qualquer uma das amostras analisadas, K'1 é diferente de K'2, e CL1 é diferente de CL2 somente para as frações cromatográficas 2 e 3. CL1 é igual ao CL2 para o restante das frações e também para a DOMmar antes do fracionamento cromatográfico.

Tabela IV.VII. Características de complexação para o AFC. Valores apresentados em log, $\pm$ desvio padrão de 3 análises. AFC* corresponde ao AFC antes do tratamento com a resina Sep-Pak tC18.

Amostra	K'1	K'2	K'3	CL1	CL2	CL3
AFC*	5.46 $\pm$ 0.12	5.49 $\pm$ 0.06	5.57 $\pm$ 0.02	-5.69 $\pm$ 0.95	-5.26 $\pm$ 0.79	-6.81 $\pm$ 1.20
AFC	4.63 $\pm$ 0.23	5.47 $\pm$ 0.46	5.57 $\pm$ 0.64	-5.51 $\pm$ 0.18	-5.76 $\pm$ 0.55	-6.04 $\pm$ 0.59
fração 1	4.80 $\pm$ 0.06	5.47 $\pm$ 0.18	6.30 $\pm$ 0.76	-5.55 $\pm$ 0.08	-5.99 $\pm$ 0.28	-5.60 $\pm$ 0.43
fração 3	4.63 $\pm$ 0.00	6.18 $\pm$ 0.01	7.12 $\pm$ 0.17	-5.53 $\pm$ 0.05	-5.78 $\pm$ 0.11	-6.36 $\pm$ 0.27
fração 4	4.66 $\pm$ 0.06	5.58 $\pm$ 0.25	6.28 $\pm$ 0.16	-6.11 $\pm$ 0.46	-6.66 $\pm$ 0.23	-6.58 $\pm$ 1.06
fração 5	4.71 $\pm$ 0.03	5.92 $\pm$ 0.39	6.37 $\pm$ 0.16	-6.10 $\pm$ 0.77	-6.22 $\pm$ 0.45	-6.28 $\pm$ 0.60

Como anteriormente mencionado, o tratamento matemático com três ligantes foi aplicado somente nas amostras do AFC. Com um intervalo de confiança de 95%, análise de variância e teste de múltiplo contraste mostraram não haver diferença significativa entre CL1, CL2 e CL3, exceto para a terceira fração cromatográfica, onde tem-se que CL1 $\neq$ CL2 $\neq$ CL3. Os resultados da análise estatística para os valores de log K' são mostrados na tabela IV.VIII.

Tabela IV.VIII. Análise de variância (ANOVA) e teste de múltiplo contraste (SCHEFFÉ-F) para os resultados de $\log K'$ obtidos através da simulação com 3 ligantes nas amostras do AFC.

Amostra	ANOVA	SCHEFFÉ-F
AFC*	$\log K'$ s iguais	$K'1 = K'2 = K'3$
AFC	$\log K'$ s diferentes	$K'1 \neq K'2 = K'3$
fração 1	$\log K'$ s diferentes	$K'1 \neq K'2 = K'3$
fração 3	$\log K'$ s diferentes	$K'1 \neq K'2 \neq K'3$
fração 4	$\log K'$ s diferentes	$K'1 \neq K'2 \neq K'3$
fração 5	$\log K'$ s diferentes	$K'1 \neq K'2 = K'3$

Os valores apresentados nas tabelas IV.V - IV.VII encontram-se dentro das oscilações daqueles apresentados na literatura, alguns destes mostrados na tabela IV.IX (página 110). Um levantamento mais completo dos parâmetros K' e CL pode ser encontrado em Buffle (1988). Observa-se que, em geral, os valores de K' obtidos através de extinção de fluorescência são sistematicamente mais baixos do que aqueles obtidos com outros métodos, e na maior parte destes casos, os valores de CL, quer seja por unidade de carbono orgânico ou não, são menores.

O que parece estar acontecendo é que as diversas técnicas medem coisas distintas. Enquanto a extinção de fluorescência investiga constantes de estabilidade condicional fracas, métodos como ISE e aquele apresentado em Sunda e Hanson (1987) quantificam altos valores de constantes de estabilidade condicional. Nestes casos, baixas concentrações de metal são utilizadas, e as concentrações de ligante são, em muitos casos, da ordem de 10^{-8} - 10^{-10} M, com constantes de estabilidade condicional da ordem de 10^{10} - 10^{13} . No presente trabalho, os valores obtidos oscilam entre 10^4 - 10^8 , este último com concentração de ligante bastante baixa (10^{-8} M) e somente detectado quando da aplicação do modelo com 3 ligantes (formação de complexo com estequiometria 1:1 (metal/ligante)). Exceção é feita aos resultados de Turner et alii (1986), cujos valores obtidos através de ISE são da mesma

ordem de grandeza àqueles obtidos através de extinção de fluorescência. Curiosamente porém, os resultados de Holm e Barcelona (1988), também obtidos através de extinção de fluorescência são cerca de uma ordem de grandeza maior, aproximando-se aos outros métodos.

A normalização dos valores de CL para a concentração de carbono orgânico ($\log [\mu\text{M CL/mg TOC}]$), permite uma comparação entre os presentes resultados e destes com outros da literatura.

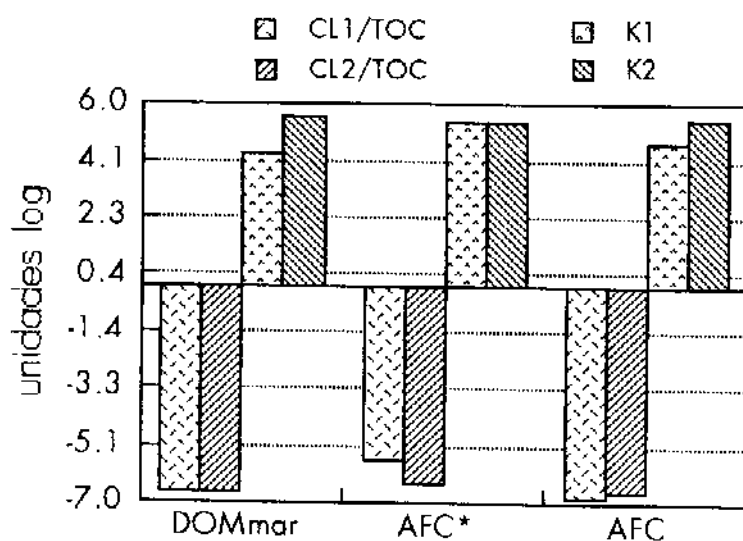


Figura IV.4. Parâmetros da complexação com cobre para os materiais orgânicos antes do fracionamento cromatográfico. Valores apresentados em log.

A figura IV.4 ilustra de modo comparativo os valores de CL/TOC e K para a DOMmar e AFC antes e após o tratamento através da resina Sep-Pak tC18. Desta conclue-se ter havido uma perda de ligantes como resultado do tratamento com a resina, e que estes ligantes, como indicado pela variação no valor de K' 1, são ligantes com alta afinidade por cobre. Esta perda de ligantes, assim como de matéria orgânica fluorescente (fig. III.8) culminou na detecção de ligantes com características de complexação fortes e fracas. Este resultado encontra-se de acordo com aqueles apresentados em Plavsic e Branica (1986). Os autores mostram que o $\log \text{CL}$ para água do mar natural é -4.8, enquanto que do extrato Sep-Pak C18 é -5.1. Convém mencionar que

estes valores não foram normalizados para a concentração de carbono orgânico, e se o fossem, a diferença seria maior. A concentração de carbono orgânico em águas naturais é cerca de 200 vezes menor do que a de um extrato Sep-Pak C18.

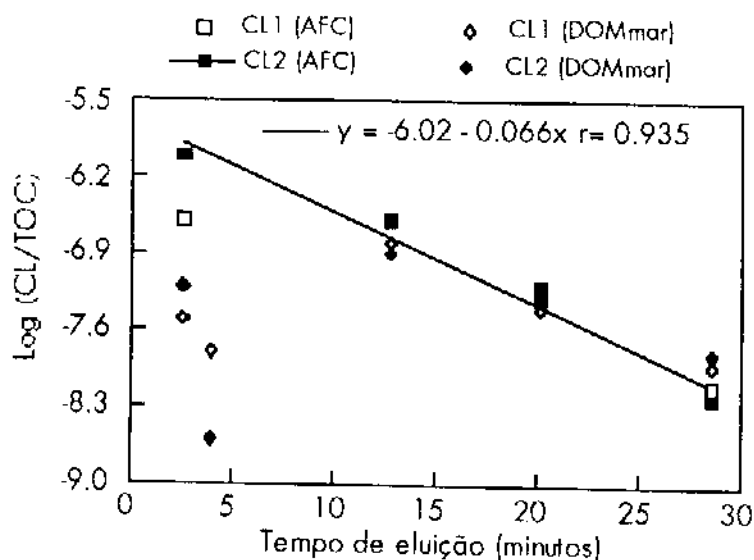


Figura IV.5. Log da concentração de ligante por unidade de carbono orgânico ($\mu\text{M CL} \cdot \text{mg C}^{-1}$) em função do tempo de eluição cromatográfico.

Após o fracionamento cromatográfico, observa-se uma tendência de diminuição da concentração de ligante por unidade de carbono orgânico com o aumento do tempo de eluição (redução da polaridade). Este resultado é mostrado na figura IV.5 e explica o motivo pelo qual vários trabalhos da literatura obtêm uma maior quantidade de metal em frações cromatográficas de maior polaridade. A correlação obtida na figura IV.5 mostra que há uma maior concentração de ligantes na matéria orgânica mais polar e portanto pode-se esperar uma maior complexação com cobre. Zhou e Wangersky (1989) através de cromatografia de camada delgada e posterior detecção por ionização em chama, obtiveram maior quantidade de cobre nas frações mais polares. Mills et alii (1982), obtiveram resultado semelhante com o fracionamento de extratos Sep-Pak C18 através de cromatografia líquida de alta resolução. Lee (1981) e Plavsic e Branica (1986) também

obtiveram resultado semelhante. Já Hanson e Quinn (1983) investigando as propriedades cromatográficas e de complexação com cobre em material orgânico marinho isolado através de resinas Sep-Pak C18, obtiveram uma associação de cobre com o material orgânico qualquer que tenha sido a polaridade de eluição do mesmo.

A propriedade de extinção de fluorescência, representada através da $Q_{\text{máx.}} = (100 - I_{\text{ML}})$ relacionou-se de modo significativo com a concentração de ligante, como pode ser visto na figura IV.6. Nesta, observa-se a tendência de aumento no valor de CL/TOC, com o aumento em $Q_{\text{máx.}}$. Foi sugerido em Berger et alii (1984), que $Q_{\text{máx.}}$ deve relacionar-se com algum parâmetro qualitativo. Como demonstrado no presente trabalho, o parâmetro parece ser CL/TOC, e segundo a figura IV.6, independe da origem da matéria orgânica. Boussemart et alii (1989) obteve resultado semelhante para águas intersticiais.

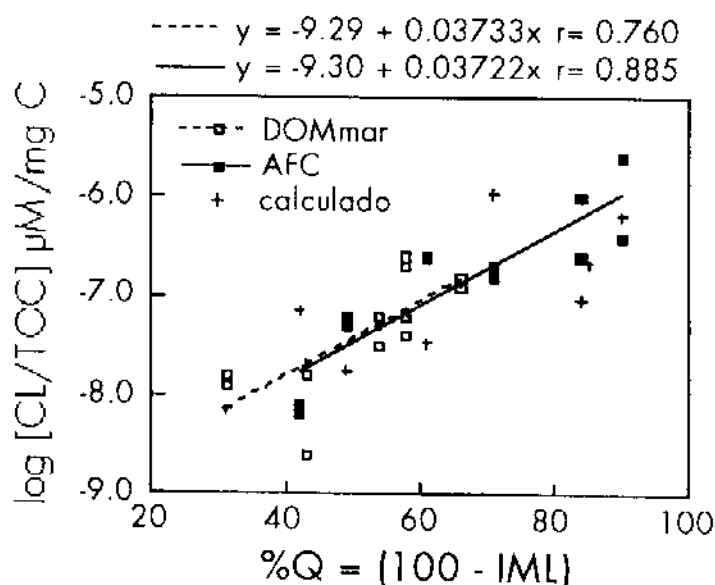


Figura IV.6. Log da concentração de ligante por unidade de carbono orgânico ($\mu\text{M CL} \cdot \text{mg C}^{-1}$) em função da máxima extinção de fluorescência, em porcentagem. Valores de CL1/TOC e CL2/TOC incluídos.

$$\log\left(\frac{\text{CL}}{\text{TOC}}\right) = 0.037(100 - \text{IML}) - 9.29$$

A equação (19) descreve o melhor ajuste para o gráfico apresentado na figura IV.6. Esta equação não necessariamente apresenta significado químico. Ela nos fornece indícios de que, dentre os ligantes presentes nos materiais orgânicos investigados, pelo menos uma mesma classe pertence a ambos os materiais, independente de sua origem.

(19)

Para as condições experimentais definidas no presente trabalho, os valores calculados a partir de $Q_{\text{máx.}}$ são mostrados na figura IV.6, de onde conclui-se ser possível a obtenção do valor de CL/TOC diretamente através da curva de titulação obtida pela técnica de extinção de fluorescência. A diferença no valor de IML obtida para a DOMmar em relação ao AFC reside em uma diferença fundamental entre estas duas categorias de matéria orgânica natural. Ou alguns dos fluoróforos da DOMmar são inacessíveis ao cobre, o que estaria de acordo com os resultados apresentados em Milne e Zika (1989), ou a complexação não causa tanto efeito sobre a fluorescência da DOMmar como causa no AFC.

A figura IV.7 mostra os valores de CL/TOC retirados de Ryan e Weber (1982b) e aqueles calculados através da equação (19). Os autores não mencionam a força iônica utilizada, podendo esta ser a responsável pela diferença de aproximadamente uma ordem de grandeza entre aqueles resultados e os do presente trabalho. É no mínimo curiosa a semelhança nos valores dos coeficientes angulares, fato este merecedor de um estudo mais detalhado no futuro.

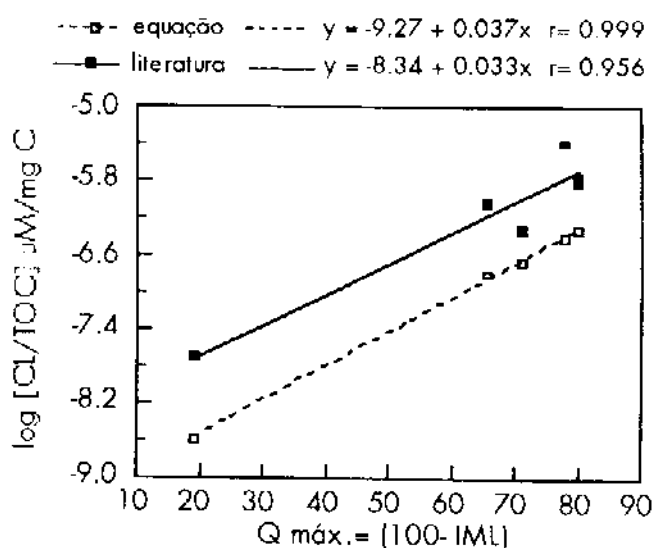


Figura IV.7. Log da concentração de ligante por unidade de carbono orgânico ($\mu\text{M CL} \cdot \text{mg C}^{-1}$) em função da máxima extinção de fluorescência, em porcentagem. Dados retirados de Ryan e Weber (1982b).

Tabela IV. IX. Características de complexação para diversas amostras. Valores de K e CL/TOC apresentados em log. (NM) refere-se a não mencionado; FQ é extinção de fluorescência; ISE é eletrodo íon seletivo; Sep-Pak C18, é o método descrito na referência citada. AFC é ácido fúlvico de Conway, AF é ácido fúlvico, SH é substância húmica (Aldrich) e efluente 2 refere-se a efluente secundário. (*) indica que o valor de CL não foi dividido pela concentração de carbono orgânico.

Amostra	Método	pH	Força iônica	K1	K2	K3	CL1/TOC	CL2/TOC	CL3/TOC	Ref.
AFC	FQ	6.0	0.1 M	5.2			-4.78*			1
AF (rio)	ISE	6.2	0.1 M	5.8	8.1		-5.5	-7.0		2
Rio	ISE	7.0	0.001 M	5.6	7.8	9.7	-5.0	-6.2	-7.2	3
Rio	FQ	6.7	(NM)	4.9			-6.3			4
Rio	ISE	5.9	0.001 M	4.6	6.2	9.0	-5.2	-5.9	-7.5	3
Poço	FQ	7.0	20-10 ⁻³ M	6.8			-5.8			5
Poço	ISE	6.7	50-10 ⁻³ M	11.4	7.8	3.9	-6.6	-5.7	-3.5	5
Efluente 2	ISE	6.6	0.02 M	7.2	5.8		-5.4	-4.9		9
Poço	FQ	7.6	0.1 M	5.8	9.0		-4.6	-4.9		6
Poço	FQ	7.6	0.1 M	5.6	7.9		-4.7	-5.0		6
Costa Peru Sep-Pak C18		8.2	0.1 M	12.3	9.2		-8.4*	-7.1*		7
Mar aberto	ISE	8.1	0.7 M	9.1	7.0		-8.0*	-7.3*		8
SH	ISE	6.6	0.02 M	7.4	5.9		-5.1	-4.7		9
SH	FQ	6.6	0.02 M	6.1			-4.3			9

Referências citadas na tabela: 1- Ventry et alii (1991), 2- Turner et alii (1986), 3- Sunda e Hanson (1979), 4- Ryan e Weber (1982b), 5- Holm (1990), 6- Holm e Barcelona (1988), 7- Sunda e Hanson (1987), 8- Midorikawa et alii (1992), 9- Jardim e Allen (1984).

F. M. Gonçalves

O modelo de Ryan e Weber (1982a) adaptado para uma situação de multiligantes soluciona o problema de CL negativo.

Observa-se uma perda de ligantes associados ao K1 quando a matéria orgânica natural sofre o tratamento através da resina Sep-Pak tC18.

Quanto maior a polaridade da fração cromatográfica, tanto maior a concentração de ligantes, justificando assim a maior habilidade de complexação de cobre nas frações mais polares da matéria orgânica.

O limite mínimo de fluorescência associa-se diretamente com a concentração de ligante por unidade de carbono orgânico (CL/TOC), obedecendo a mesma lei para qualquer uma das categorias de matéria orgânica.

A análise de correlação múltipla mostrou que o ácido fúlvico terrestre (AFC) possui ligantes associados com fluoróforos excitáveis em 350 nm, e que estes ligantes são dominantes nas frações cromatográficas de maior polaridade (frações 1 e 2).

Capítulo V

Conclusão geral

V.1. Conclusão geral.....	112
---------------------------	-----

2.2. Conclusão geral

É difícil falar em contribuição do carbono orgânico terrestre no ambiente marinho quando pouco se conhece sobre o fluxo entre ambos reservatórios. Sabe-se que sua natureza é complexa e que afeta as técnicas analíticas usadas para sua quantificação (Lee e Henrichs, 1993).

Há ainda o problema referente às técnicas de extração da substância húmica a partir de seu ambiente natural. Frimmel et alii (1992) mostram o quanto estas influenciam o material investigado. Wangersky (1994) afirma: *As soon as you decide on a method for taking your sample, you have begun to bias the result.*

Considerando as limitações acima referidas, o presente trabalho mostrou que o ácido fúlvico terrestre é, de modo geral, mais polar do que a substância húmica marinha. Além disso, o comportamento da matéria orgânica natural mediante o fracionamento cromatográfico, sugere que esta seja formada pelo agrupamento de um grande número de compostos de diversas polaridades, o que impede sua separação em compostos puros. Cada fração cromatográfica representa a união de compostos orgânicos cujo ponto em comum é a polaridade.

Como característica espectroscópica, classes de fluoróforos semelhantes encontram-se presentes em ambas as categorias de matéria orgânica. Todavia, isto não representa necessariamente uma contribuição de origem terrestre no ambiente marinho. Uma hipótese é de que apesar da origem e ambiente físico-químico diversos, há um

predomínio do resultado final da atividade microbiológica (semelhante para qualquer um dos ambientes). Algumas classes de fluoróforos se destacaram por serem específicos a uma categoria ou outra da matéria orgânica. Isto sim, pode ser considerado uma diferença real entre a matéria orgânica marinha e a terrestre, pois ambas foram submetidas exatamente ao mesmo tratamento, como já mencionado anteriormente.

Como propriedade geral da molécula de matéria orgânica, revelado através do espectro de emissão, foi um deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão obtido para a matéria orgânica marinha em relação à terrestre.

Apesar de apresentarem fluoróforos semelhantes, os parâmetros obtidos através dos experimentos de complexação sugerem que a matéria orgânica marinha apresenta aspectos distintos daquela de origem terrestre, o que foi demonstrado pelos valores absurdos de concentração de ligantes (CL) obtidos em todos os casos em que a matéria orgânica marinha foi analisada. Portanto, a consideração de diversos sítios de ligação é mais importante para a matéria orgânica dissolvida marinha do que para o ácido fúlvico terrestre. Isto foi confirmado pela aplicação do modelo matemático com pelo menos dois sítios de complexação.

Foram ainda obtidos limites de fluorescência (I_{ML}) mais altos para as amostras marinhas em relação às terrestres. Este fato pode caracterizar diferenças moleculares, mais especificamente quanto aos sítios de ligação com o metal cobre. Neste caso pode-se pensar em duas hipóteses:

1. Menor quantidade de metal se liga a matéria orgânica marinha, e portanto apresenta menor CL.
2. A complexação dá-se de tal modo que a fluorescência não é extinta como é no caso da amostra de origem terrestre.

Mediante a análise dos resultados, os valores de CL são da mesma ordem de grandeza para ambas as categorias de matéria orgânica, e portanto a hipótese 1 está descartada. Baseado na hipótese 2, conclui-se que os sítios de complexação de cobre no ácido fúlvico terrestre diferem daqueles presentes na matéria orgânica marinha. Enquanto os fluoróforos desta parecem ser pouco afetados, aqueles do

ácido fúlvico terrestre são, direta ou indiretamente alterados mediante a complexação.

O efeito da extração através da Sep-Pak tC18 sobre a matéria orgânica terrestre deixou clara a necessidade de padronização de metodologia de extração de matéria orgânica.

Foi demonstrado que há semelhanças, mas também diferenças entre a matéria orgânica de origem marinha e a terrestre. É importante destacar que as diferenças foram obtidas principalmente após o fracionamento cromatográfico, mostrando deste modo a necessidade de acoplamento metodológico para a obtenção de novas informações sobre a substância húmica.

VIII. Referências

- Aiken G. R. (1988) A Critical Evaluation of the Use of Macroporus Resins for the Isolation of Aquatic Humic Substances. In: *Humic Substances and Their Role in the Environment*. Frimmel F. H. e Christman R. F. (eds.) John Wiley & Sons, pp. 15-28.
- Alberts J. J., Filip Z., Price M. T., Williams D. J. e Williams M. C. (1988) Elemental composition, stable isotope ratios and spectrophotometric properties of humic substances occurring in a salt marsh estuary. *Org. Geochem.*, **12**: 455-467.
- Amador J.A., Milne P. J., Moore C. A. e Zika R. G. (1990) Extraction of Chromophoric Humic Substances from Seawater, *Mar. Chem.*, **29**: 1-17.
- Arsenie I., Boren H. e Allard B. (1992) Determination of the carboxil content in humic substances by methylation. *Sci. Total Environ.*, **116**: 213-220.
- Bada J. L. e Lee C. (1977) Decomposition and alteration of organic compounds dissolved in seawater. *Mar. Chem.*, **5**: 523-534.
- Benner R., Pakulski J. D., McCarthy M., Hedges J. I. e Hatcher P. G. (1992) Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science*, **255**: 1561-1564.

- Berger P., Ewald M., Liu M. e Weber J. H. (1984) Application of the fluorescence quenching titration method to the complexation of copper(II) in the Gironde estuary. *Mar. Chem.*, **14**: 289-295.
- Berlman I. B. (1971) Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules. Academic Press, New York, 2a edição. pp. 473.
- Bloom P. R. e Leenheer J. A. (1989) Vibrational, Eletronic and High-Energy Spectroscopic Methods for Characterizing Humic Substances. In: *Humic Substances II. In Search of Structure*. Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L. e Swift R. S. (eds.) John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 409-446.
- Bousemart M., Benamou C., Richou M. e Benaim J. Y. (1989) Comparison of Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry and Spectrofluorometry for Determination of Complexes Between Copper and Organic Matter in Interstitial Waters Extracted From Marine Sediments. *Mar. Chem.*, **28**: 27-39.
- Bruland K. W., Donat J. R. e Hutchins D. A. (1991) Interactive influence of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.*, **36**: 1555-1577.
- Buffle J. (1988) Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach. Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp. 692.
- Cabaniss S. E. (1991) Carboxylic acid content of a fulvic acid determined by potentiometry and aqueous Fourier transform infrared spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **255**: 23-30.
- Cabaniss S. E. e Shuman M. S. (1988a) Fluorescence Quenching Measurements of Copper-Fulvic Acid Binding. *Anal. Chem.*, **60**: 2418-2421.
- Cabaniss S. E. e Shuman M. S. (1988b) Copper binding by dissolved organic matter: I. Suwannee River fulvic acid equilibria. *Geochimica Cosmochimica Acta*, **52**: 185-193.

- Cabaniss E. S. e Shuman M. S. (1987) Synchronous Fluorescence Spectra of Natural Waters: Tracing Sources of Dissolved Organic Matter, *Mar. Chem.*, **21** 37-50.
- Cabaniss E. S. e Shuman M. S. (1986) Combined Ion Selective Electrode and Fluorescence Quenching Detection for Copper-Dissolved Organic matter Titrations. *Anal. Chem.*, **58**: 398-401.
- Cameron D. F. e Sohn M. L. (1992) Functional group content of soil and sedimentary humic acids determined by CP/MAS ^{13}C NMR related to conditional Zn^{2+} and Cd^{2+} formation constants. *Sci. Total Environ.*, **113**: 121-132.
- Carlson D. J., Brann M. L., Mague T. H. e Mayer L. M., (1985) Molecular weight distribution of dissolved organic materials in seawater determined by ultrafiltration. *Mar. Chem.*, **16**: 155-171.
- Carpenter P. D., Butler E. C. V., Higgins H. W., Mackey D. J. e Nichols P. D. (1991) Chemistry of Trace Elements, Humic Substances and Sedimentary Organic Matter in Macquarie Harbour, Tasmania. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **42**: 625-654.
- Casella M. C. (1990) *Estudo dos ácidos húmico e fúlvico extraídos de solo brasileiro (Ilha de Cananéia) por métodos químicos e espectroscópicos*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Física e Química de São Carlos, Dept. de Química Física e Molecular, Campus de São Carlos, USP, SP, Brasil.
- Castelton A., Corrales M., Astruc M., Dottin M., Sterritt R. M. e Lester J. N. (1986) Comparative Study of Heavy-Metal Complexation by Fulvic Acid. *Environ. Technol. Lett.*, **7**: 495-500.
- Chen R. F. e Bada J. L. (1990) A laser-based fluorometry system for investigations of seawater and porewater fluorescence. *Mar. Chem.*, **31**: 427.
- Chen W. e Wangersky, P. J. (1993) A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of marine dissolved

- organic carbon and its comparison with the UV photo-oxidation method. *Mar. Chem.*, **42**: 95-106.
- Coble P. G., Schultz C. A. e Mopper K. (1993) Fluorescence Countoring analysis of DOC Intercalibration Experiment samples: a comparison of techniques, *Mar. Chem.* **41**: 173-178.
- Coble P. G., Green S. A., Blough N. V. e Gagosian R. B. (1990) Characterization of dissolved organic matter in the Balck Sea by fluorescence spectroscopy, *Nature*, **348**: 432-435.
- De Haan H. (1992) Impacts of environmental changes on the biogeochemistry of aquatic humic substances. *Hydrobiologia*, **229**: 59-71.
- De Nobili M., Gjessing E. e Sequi P. (1989) Sizes and Shapes of Humic Substances by Gel Chromatography. In: *Humic Substances II. In Search of Structure*. Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L. e Swift R. S. (eds.) John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 562-591.
- De Souza Sierra M. M. (1992) Caracterisation et Reactivite de la Matiere Organique Fluorescente Dissoute dans des Milieux Cotiers et Marins. Tese de Doutorado, Universidade de Bordeaux. pp. 200.
- De Souza Sierra M. M. e Donard O. F. (1991) Simulation of fluorescence variability in estuaries, *Oceanologica Acta*, **11**: 275-284.
- Dolan J. W. (1991) Using Dead Time, Retention, and the Capacity Factor as Diagnostic Tools. *LC-CG INTL.*, **4**: 16-18.
- Donard O. F. X., Lamotte M., Belin C. e Ewald M. (1989) High-Sensitivity Fluorescence Spectroscopy of Mediterranean Waters using a Conventional or a Pulsed Laser Excitation Source, *Mar. Chem.*, **27**: 117-136.
- Dorsh J. E. e Bidleman T. F. (1982) Natural Organics as Fluorescent Tracers of River-Sea Mixing, *Estuarine, Costal and Shelf Science*, **15**: 701-707.

- Dujmov J., Succvic P. e Antolic B. (1992) UV-Fluorescence Spectrophotometric Assessment and Characterization of Dissolved Fluorescent Matter in Coastal Water of the Central Adriatic, *Netherlands J. Sea Res.*, **29**: 291-292.
- Ewald M., Belin C., Berger P. e Weber J. H. (1983) Corrected Fluorescence Spectra of Fulvic Acids Isolated from Soil and Water. *Environ. Sci. Technol.*, **17**: 501-504.
- Ferrari G. M. e Tassan S. (1991) On the accuracy of determining light absorption by "yellow substance" through measurements of induced fluorescence. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 1253.
- Florence T. M., Powel H. K. J., Stauber J. L. e Town R. M. (1992) Toxicity of lipid-soluble copper (II) complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*: amelioration by humic substances. *Wat. Res.*, **26**: 1187-1193.
- Filip Z., Newman R. H. e Alberts J. J. (1991) Carbon-13 nuclear magnetic resonance characterization of humic substances associated with salt marsh environments. *Sci. Total Environ.*, **101**: 191-199.
- Fox L. E. (1984) The relationship between dissolved humic acids and soluble iron in estuaries. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **48**: 879.
- Fox L. E. (1983) The removal of Dissolved Humic Acid During Estuarine Mixing. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **16**: 431-440.
- Frimmel F. H., Gremm T. e Huber S. (1992) Liquid chromatographic characterization of refractory organic acids. *Sci. Total Environ.*, **117/118**: 197-206.
- Gomez M. J., Martí I. e Donoso L. (1991) Acid-base properties of aquatic humic substances isolated from unpolluted tropical black water rivers. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**: 664-668.

- Good N. E., Winget G. D., Winter W., Connolly T. N., Izawa S. e Singh R. M. M. (1966) Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*, **5**: 467-477.
- Ghosh K. e Schnitzer M. (1981) Fluorescence excitation spectra and viscosity behavior of a fulvic acid and its copper and iron complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**: 25-29.
- Ghosh K. e Schnitzer M. (1980) Fluorescence excitation spectra of humic substances. *Can. J. Soil Sci.*, **60**: 373-379.
- Gough M. A., Fauzi R., Mantoura C. e Preston M. (1993) Terrestrial plant biopolymers in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**: 945-964.
- Grasso D. e Weber Jr. W. J. (1988) Ozone-induced particle destabilization. *J. Am. Water Works Assoc.*, **80**: 73-81.
- Green S. A., Morel F. M. M. e Blough N. V. (1992) Investigation of the Electrostatic Properties of Humic Substances by Fluorescence Quenching. *Environ. Sci. Technol.*, **26**: 294-302.
- Hanson A. K. e Quinn J. G. (1983) The Distribution of Dissolved and Organically Complexed Copper and Nickel in the Middle Atlantic Bight. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **40**: 151-161.
- Harvey G. R., Boran, D. A., Chesal L. A. e Tokar J. M. (1983) The structure of marine fulvic and humic acids. *Mar. Chem.*, **12**: 119-132.
- Hayase K., Tsubota J., Sunada I., Goda S. e Yamazaki H. (1988) Vertical distribution of Fluorescent organic matter in the North Pacific. *Mar. Chem.*, **25**: 373-381.
- Hayase K. e Tsubota H. (1984) Reversed-phase Liquid Chromatography of Molecular Weight-fractionated sedimentary fulvic acid. *J. Chromatography*, **295**: 530-532.

- Hedges J. I. e Bergamaschi B. A. (1992) Seawater carbon measurement. *Nature*, **356**: 302.
- Hedges J. I. (1988) Polymerization of humic substances in natural environments. In: *Humic Substances and their Role in the Environment* (F. H. Frimmel and R. F. Christman (eds.)). John Wiley & Sons, New York. pp. 45-58.
- Hirose K., Dokiya Y. e Sugimura Y. (1982) Determination of conditional stability constants of organic copper and zinc complexes dissolved in seawater using ligand exchange method with EDTA. *Mar. Chem.*, **11**: 343-354.
- Holm T. E (1990) Copper complexation by natural organic matter in contaminated and uncontaminated ground water. *Chem. Speciation and Bioavailability*, **2**: 63-76.
- Holm T. E. e Curtiss III C. D. (1990) Copper complexation by Natural Organic Matter in Ground Water. In: *Chemical Modeling of Aqueous Systems II*. Melchior D. C. e Basset R. L. (eds.) ACS Symposium Series No. 416, Washington, U.S.A.
- Holm T. E. e Barcelona M. J. (1988) Metal Complexation by Natural Organic Matter in Ground Waters. In: *Proceedings of the Ground Water Geochemistry Conference*, 16-18/fevereiro/1988, Colorado, U.S.A. pp. 245-266.
- Horvath C., Melander W. e Molnar I. (1976) Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J. Chromatogr.*, **125**: 129-156.
- Hoyt J. W. (1970) High molecular weight algal substances in the sea. *Mar. Biol.*, **7**: 93-99.
- Ishiwatari R. (1992) Macromolecular material (humic substances) in the water column and sediments. *Mar. Chem.*, **39**: 151-166.

- Jardim W. F. e Campos M. L. A. M. (1988) Photodegradation of some Naturally Occuring Organic Compounds and Their Metal Complexes. *Sci. Total Environ.*, **75**: 243-248.
- Jardim W. F. e Allen H. E. (1984) Measurement of Copper Complexation by naturally occurring Ligands. In: Kramer C. J. M. e Duinker J. C. (eds.) *Complexation of Trace Metals in Natural Waters*. Martinus Nijhoff/Dr Junk Publishers., The Hage, Holanda. pp. 1-15.
- Kango R. A. e Quinn J. G. (1992) A combined Reverse-Phase and Purge and Trap Chromatographic Method to Study the Interaction of Volatile Organic Compounds with Dissolved Humic Acid in Aqueous Solutions. *Environ. Sci. Technol.*, **26**: 163-165.
- Kieber R. J., Zhou X. e Mopper K. (1990) Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: Fate of riverine carbon in the sea. *Limnol. Oceanogr.*, **35**: 1503-1515.
- Laane R. W. P. M. (1984) Comment on the structure of marine fulvic and humic acids. *Mar. Chem.*, **15**: 85-87.
- Lakowicz J. R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum, New York, U.S.A., pp. 496.
- Lee C. e Henrichs S. M. (1993) How the nature of dissolved organic matter might affect the analysis of dissolved organic carbon.
- Lee C. e Wakeham S. G. (1992) Organic matter in the water column: future research challenges. *Mar. Chem.*, **39**: 95-118.
- Lee J. (1981) The use of reverse Phase Liquid Chromatography for Studying Trace Metal-organic Associations in Natural Waters. *Wat. Res.*, **15**: 507-509.

- Lloyd J. B. F. (1977) Raman Peaks in Synchronously Excited Emission Spectra as a Reference for Purity of Fluorescence-grade Solvents, *Analyst*, **102**: 782-785.
- Lloyd J. B. F. (1971) Synchronyzed Excitation of Fluorescence Emission Spectra, *Nature (London) Phys. Sci.*, **231**: 64-65.
- Lundquist K., Josefsson B. e Nyquist G. (1978) Analysis of lignin products by fluorescence spectroscopy. *Holzforschung*, **32**: 27-32.
- MacCarthy P., Peterson M. J., Malcom R. L. e Thurman E. M. (1979) Separation of Humic Substances by pH Gradient Desorption from a Hydrophobic Resin. *Anal. Chem.*, **51**: 2014-2043.
- Mackey D. J. (1985) HPLC Analyses of Metal-organics in Seawater-Interference Effects Attributed to Stationary-Phase Free Silanols. *Mar. Chem.*, **16**: 105-119.
- Mackey D. J. (1983) Metal-Organic Complexes in Seawater - An Investigation of Naturally Occuring Complexes of Cu, Zn, Fe, Mg, Ni, Cr, Mn, e Cd Using High-Performance Liquid Chromatography With Atomic Fluorescence Detection. *Mar. Chem.*, **13**: 169-180.
- Malcolm R. L. e MacCarthy P. (1986) Limitations in the use of Commercial Humic Acids in Water and Soil Research. *Environ. Sci. Technol.*, **20**: 904-911.
- Manahan S. E. (1989) Interactions of Hazardous-Waste Chemicals with Humic Substances. In: I. H. Suffet and P. MacCarthy (Eds) *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. ACS, Washington, pp. 83-92.
- Mantoura R. F. C. e Woodward E. M. S. (1983) Conservative behavior of reverine dissolved organic carbon in the Severn Estuary: chemical and geochemical implications. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **47**: 1293-1309.

- Mantoura R. F. C. (1981) Organo-Metallic Interactions in natural Waters. In: Duursma E. K. e Dawson R. (eds.), *Marine Organic Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 179-223.
- Mantoura R. F. C., Dickson A. e Riley J. P. (1978) The complexation of Metals with Humic Materials in Natural Waters. *Estuar. Coastal Mar. Sci.*, **6**: 387-408.
- Mantoura R. F. C. e Riley J. P. (1975) The natural concentration of humic substances from natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **76**: 97-106.
- Marley N. A., Gaffney J. S., Orlandini K. A., Picel K. C. e Choppin G. R. (1992) Chemical characterization of size-fractionated humic and fulvic materials in aqueous samples. *Sci. Total Environ.*, **113**: 159-177.
- Mart L. (1979a) Prevention of Contamination and Other Accuracy Risks in Voltametric Trace Analysis of Natural Waters. Part I. Preparatory steps, filtration and storage of water samples. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **296**: 350-357.
- Mart L. (1979b) Prevention of Contamination and Other Accuracy Risks in Voltametric Trace Analysis of Natural Waters. Part II. Collection of Surface Water Samples. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **299**: 97-102.
- Meyers-Schulte K. J. e Hedges J. I. (1986) Molecular evidence for a terrestrial component of organic matter dissolved in ocean water. *Nature*, **321**: 61-63.
- Miano T. e Senesi N. (1992) Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry. *Sci. Total Environ.* **117/118**: 41-51.
- Miano T., Sposito G. e Martin J. P. (1990) Fluorescence spectroscopy of model humic acid-type polymers. *Geoderma*, **47**: 349-359.

- Miano T. M., Sposito G. e Martin J. P. (1988) Fluorescence spectroscopy of humic substances, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**: 1016-1019.
- Michaelis W., Richnow H. H. e Jenisch A. (1989) Structural studies of marine and riverine humic matter by chemical degradation. *Sci. Total Environ.*, **81/82**: 41-50.
- Midorikawa T., Tanoue E. e Yukio S. (1992) Interaction between dissolved organic matter in seawater and copper. *Sci. Total Environ.* **117/118**: 499-507.
- Miles C. J. e Brezonik P. L. (1983) High-performance size exclusion chromatography of aquatic humic substances. *J. Chromat.* **259**: 499-503.
- Miller J. N. (1991) Basic Statistical Methods for Analytical Chemistry Part 2. Calibration and Regression Methods. A Review. *Analyst*, **116**: 3-14.
- Milliman J. D. (1993) Water and Sediment Discharge from Rivers to the Oceans: New Perspectives on Old Problems. Notas de aula. EC Course: Biogeochemical Processes in Estuarine and Shelf Seas. 30/agosto a 10/setembro. Plymouth, U.K.
- Mills G. L., McFadden E. e Quinn J. G. (1987) Chromatographic Studies of Dissolved Organic Matter and Copper-Organic Complexes Isolated From Estuarine Waters. *Mar. Chem.*, **20**: 313-325.
- Mills G. L., Hanson A. K. Quinn J. G. Lammela W. R. e Chasteen D. N. (1982) Chemical studies of copper-organic complexes isolated from estuarine waters using C18 reverse-phase liquid chromatography. *Mar. Chem.*, **11**: 355-377.
- Mills G. L. e Quinn J. G. (1981) Isolation of Dissolved Organic Matter and Copper-Organic Complexes From Estuarine Waters using Reverse-Phase Liquid Chromatography. *Mar. Chem.*, **10**: 93-102.

- Milne P. J. e Zika R. G. (1989) Luminescence Quenching of Dissolved Organic Matter in Seawater. *Mar. Chem.*, **27**: 147-164.
- Momzikoff A., Dallot S. e Pizay M.-D. (1992) Blue and yellow fluorescence of filtered seawater in a frontal zone (Ligurian Sea, northwest Mediterranean Sea) *Deep-Sea Res.*, **39**: 1481-1498.
- Mopper K. e Schultz C. A. (1993) Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Mar. Chem.* **41**: 229-238.
- Moran M. A., Pomeroy E. S., Atkinson L. P., Hodson R. E. (1991) Distribution of terrestrially derived dissolved organic matter on the southeastern U. S. continental shelf. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1134-1149.
- Morrison, G. M. P., Batley G. E. e Florence, T. M. (1989) Metal speciation and toxicity. *Chem. Br.*, **25**: 791-794.
- Ogura N. (1974) Molecular Weight Fractionation of Dissolved Organic Matter in Coastal Seawater by Ultrafiltration. *Mar. Biol.*, **24**: 305-312.
- Ogura N. (1975) Further Studies on Decomposition of Dissolved Organic Matter in Coastal Seawater. *Mar. Biol.*, **31**: 101-111.
- O'Haver T. C. (1976) Modulation and Derivative Techniques in Luminescence Spectroscopy. Approaches to Increased Analytical Selectivity. In: *Modern Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1, Wehry E. L. (ed.) pp. 65-81. Plenum Press, NY.
- Parrish C. C., Zhou X. e Herche L. (1988) Flame ionization and flame thermionic detection of carbon and nitrogen in aquatic lipid and humic-type classes with an Iatroscan Mark IV. *J. Chromat.*, **435**: 350-356.
- Pauli, F. W. (1967) *Soil fertility*. London, Adam Hilger. Citado em Ziechmann W. (1988).

- Perdue E. M. (1989) Effects of Humic Substances on Metal Speciation. In: *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. I. H. Suffet and P. MacCarthy (eds.) ACS, U.S.A., pp. 281-295.
- Piotrowicz S. R., Springer-Young J. A. P. e Spencer M. J. (1982) Anodic Stripping Voltammetry for Evaluation of Organic-Metal Interactions in Seawater. *Anal. Chem.*, **54**: 1367-1371.
- Plavsic M. e Branica M. (1986) Voltametric Investigation of Copper (II) Interaction with DOM Isolated on Sep-Pak C18 Cartridges. *Ocean Sci. Engeneering*, **11**: 99-113.
- Press W. H., Flannery B. P., Teukolsky S. A. e Vetterling W. T. (1988) *Numerical recipes in C*. Cambridge University Press, U. S. A. pp. 735.
- Rausa R., Mazzolari E. e Calemma V. (1991) Determination of molecular size distributions of humic acids by high-performance size exculsion chromatography. *J. Chromat.* **541**: 419-429.
- Reuter J. H. e Perdue E. M. (1977) Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters. *Geochimica Cosmochimica Acta*, **41**: 325-334.
- Rice J. A. e MacCarthy P. (1991) Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, **17**: 635-648.
- Ryan D. K. e Weber J. H. (1982a) Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacities and Stability Constants of Fulvic Acid. *Anal. Chem.*, **54**: 986-990.
- Ryan D. K. e Weber J. H. (1982b) Copper(II) Complexing Capacities of Natural Waters by Fluorescence Quenching. *Environ. Sci. Technol.*, **16**: 866-872.
- Saar R. A. e Weber J. H. (1982) Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. *Environ. Sci. Technol.*, **16**: 510A-517A.

- Saar R. A. e Weber J. H. (1980) Comparison of Spectrofluorometry and Ion-Selective Electrode Potentiometry for Determination of Complexes between Fulvic Acid and Heavy-Metal Ions. *Anal. Chem.*, **52**: 2095-2100.
- Saleh F. Y. e Chang D. Y. (1987) Retention Behavior of Suwannee River Fulvic Acid Components in RP-HPLC. *Sci. Total Environ.*, **62**: 67-74.
- Saleh F. Y., Chang D. Y. e Frye J. S. (1983) Cross polarization Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance and Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry of Fractionated Fulvic Acid. *Anal. Chem.*, **55**: 862-866.
- Samanidou V., Papadoyannis I. e Vasilikiotis G. (1991) Mobilization of heavy metals from river sediments of Northern Greece, by humic substances. *J. Environ. Sci. Health*, **A26**: 1055-1068.
- Schulten, H. -R., Plage B. e Schnitzer M. (1991) A chemical structure for humic substances. *Naturwissenschaften*, **78**: 311-312.
- Seitz W, R. (1981) Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water, *Trends Anal. Chem.*, **1**: 79-83.
- Senesi N., Miano T. M., Provenzano M. R. e Brunetti G. (1989) Spectroscopic and Compositional Comparative Characterization of I.H.S.S. Reference and Standard Fulvic and Humic Acids of Various Origin. *Sci. Total Environ.*, **81/82**: 143-156.
- Senesi N. (1990) Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Anal. Chim. Acta*, **232**: 77-106.
- Senesi N., Miano T. M., Provenzano M. R. e Brunetti G. (1991) Characterization, Differentiation, and Classification of Humic Substances by Fluorescence Spectroscopy. *Soil Sci.*, **152**: 259-271.
- Shapiro J. (1957) Chemical and Biological Studies on the Yellow Organic Acids of Lake Water. *Limnol. Oceanogr.*, **II**: 161-179.

- Sieburth J. McN. e Jensen A. (1968) Studies on algal substances in the sea. I. Gelbstoff (humic material) in terrestrial and marine waters. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **2**: 174-189.
- Smith S. V. e Hollibaugh J. T. (1993) Coastal metabolism and the oceanic organic carbon balance. *Rev. Geophysics*, **31**:75-89.
- Snyder L. R. e Kirkland J. J. (1979) *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons, New York. pp. 863.
- Sposito G. (1986) Sorption of Trace metals by Humic Materials in Soils and Natural Waters. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, **16**: 193-229.
- Stevens A. A., Moore L. A., Slocum C. J., Smith B. L., Seeger D. R. e Ireland J. C. (1989) Chlorinated Humic Acid Mixtures: Criteria for Detection of Desinfection Byproducts in Drinking Water. In: *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. I. H. Suffet and P. MacCarthy (eds.) ACS, Washington, pp. 681-695.
- Stuerner D. H. e Payne J. R. (1976) Investigation of seawater and terrestrial humic substances with carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance. *Geochimica e Cosmochimica Acta*, **40**: 1109-1114.
- Stuerner D. H. e Harvey G. R. (1974) Humic substances from seawater. *Nature*, **250**: 480-481.
- Sugimura Y. e Suzuki Y. (1988) A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in seawater by direct injection of a liquid sample. *Mar. Chem.*, **24**: 105-131.
- Sunda W. G. e Hanson A. K. (1987) Measurement of Free Cupric ion Concentration in Seawater by a ligand competition Technique Involving Copper Sorption onto C18 Sep-Pak Cartridges. *Limnol. Oceanogr.*, **32**: 537-551.

- Sunda W. G. e Hanson A. K. (1979) Chemical Speciation of Copper in River Water. In: *Chemical modeling in Aqueous Systems*, Jenne E. A. (ed.) ACS Symposium Series no. 93, Washington, D. C. (USA), pp147-180.
- Sunda W. G., Klaveness D. e Palumbo A. V. (1984) Bioassays of Cupric Ion Activity and Copper Complexation. In: Kramer C. J. M. e Duinker J. C. (eds.) *Complexation of Trace Metals in Natural Waters*. Martinus Nijhoff/Dr Junk Publishers., The Hage, Holanda. pp. 393-409.
- Sunda G. W. e Lewis J. A. M. (1978) Effect of complexation by natural organic ligantes on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.*, **23**: 870-876.
- Susic M. e Boto K. G. (1989) High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Humic Acid in Environmental Samples at the Nanogram level Using Fluorescence Detection. *J. Chromatography*, **482**: 175-187.
- Thurman E. M. e Malcolm R. L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, **15**: 463-466.
- Turner D. R., Varney M. S., Whitfield M., Mantoura R. F. C. e Riley J. P. (1986) Eletrochemical Studies of Copper and lead Complexation by Fulvic Acid. I. Potentiometric Measurements and a Critical Comparison of metal Binding Models. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **50**: 289-297.
- Tuschall J. R. e Brezonik P. L. (1984) Analytical methods for measurement and interpretation of metal binding by aquatic humus and model compounds. In: *Complexation of Trace Metals in Natural Waters*. Kramer C. J. M. e Duinker J. C. (eds.) Martinus Nijhoff/Junk Publishers, Holanda. pp. 83-94.
- van den Berg C. M. G. e Donat J. R. (1992) Determination and data evaluation of copper complexation by organic ligands in sea water

- using cathodic stripping voltammetry at varying detection windows. *Anal. Chim. Acta*, **257**: 281-291.
- Ventry L. S., Ryan D. K. e Gilbert T. R. (1991) A Rapid Fluorescence Quenching Method for the Determination of Equilibrium Parameters for Copper(II) Complexation by Humic Materials. *Microchem. J.*, **44**: 201-214.
- Visser S. A. (1983) Fluorescence phenomena of humic matter of aquatic origin and microbial cultures, in: R. F. Christman e E. T. Giessing (eds.) *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, pp. 183-202.
- Vo-Dinh T. (1978) Multicomponent analysis by Synchronous Luminescence Spectrometry, *Anal. Chem.* **50**: 396-401.
- Whitehouse B. G., Parrish C. C. e Wangersky P. J. (1984) The analysis of organic compounds in seawater, 1978 - 1983. *Report 9, NRCC No. 23609*. Marine Analytical Standards Program. Canada. pp. 87.
- Wangersky P. J. (1994) Sampling and analysis of particulate and dissolved materials. In: *The Biology of Particles in Aquatic Systems*, 2ª edição. Wotton R. S. (ed.) Lewis Publishers, Boca Raton, U.S.A., pp. 7-43.
- Wangersky P. J. (1993) Dissolved organic carbon methods: a critical review. *Mar. Chem.*, **41**: 61-74.
- Wangersky P. J. (1986) Biological control of trace metal residence time and speciation: a reveiw and synthesis. *Mar. Chem.*, **18**: 269-297.
- Wangersky P. J. (1983) The cycle of organic carbon in sea water. *Chimia*, **26**: 559-564. In: *The cycle of organic carbon in the oceans*. Atti del 5º Congresso della Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia, Stresa, 19 - 22/mayo/1982.
- Wangersky P. J. (1972) The cycle of organic carbon in sea water. *Chimia*, **26**: 559-564.

- Weber J. H. e Wilson S.A. (1975) The isolation and characterization of fulvic acid and humic acid from river water. *Water Res.*, **9**: 1079-1084.
- Wehry E. L. (1967) Structural and environmental factors in fluorescence. In: *Fluorescence: Theory, Instrumentation and Practice*. Guilbault GG (Ed.) Marcel Dekker, Inc, New York. pp, 37-132.
- Wein-Brukner A., Eross-Kiss K. e Szakallas G. (1990) IR-Spectroscopic study of Humic Acids Extracted from Different Kinds of Coals. *Acta Chimica Hungarica*, **127**: 489-494.
- Williams P. M. e Druffel E. R. M. (1987) Radiocarbon in dissolved organic matter in the central North Pacific Ocean. *Nature*, **330**: 246-248.
- Williams P. M. e Gordon L. I. (1970) Carbon-13: carbon-12 ratios in dissolved and particulate organic matter in the sea. *Deep-Sea Res.*, **17**: 19-27.
- Wilson M. A., Gillam A. H. e Collin P. J. (1983) Analysis of the structure of dissolved marine humic substances and their phytoplanktonic precursors by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance. *Chem. Geol.*, **40**: 187-201.
- Wilson S. A. e Weber J. H. (1977) A comparative study of number-average dissociation-corrected molecular weights of fulvic acids isolated from water and soil. *Chem. Geol.*, **19**: 285-293.
- Yentsch C. S. (1983) A note on the fluorescence characteristics of particles that pass through glass-fiber filters. *Limnol. Oceanogr.*, **28**: 597-599.
- Zar J. H. (1984) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. pp. 718.

- Zepp R. G. e Schlotzhauer P. F. (1981) Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water: III. Spectroscopic properties of humic substances. *Chemosphere*, **10**: 479-486.
- Zhou X. e Wangersky P. J. (1987) Characterization of marine Organic matter by Thin-Layer Chromatography with Flame Ionization detection. *Mar. Chem.*, **20**: 211-218.
- Zhou X. e Wangersky P. J. (1989) Study of Copper-complexing Organic Ligands: Isolation by a Sep-Pak C18 Column Extraction Technique and Characterization by Chromarod Thin-layer Chromatography. *Mar. Chem.*, **26**: 21-40.
- Zhou X., Slauenwhite D. E., Pett R. J. e Wangersky P. J. (1989) Study of copper-complexing organic ligands: isolation by a Sep-Pak C18 column extraction technique and characterization by chromarod thin-layer chromatography. *Mar. Chem.*, **26**: 21-40.
- Zhou J. L. e Banks C. J. (1991) Removal of Humic Acid Fractions by *Rhizopus arrhizus*: Uptake and Kinetic Studies. *Environ. Technol.*, **12**: 859-869.
- Ziechmann W. (1988) Evolution of Structural Models from Consideration of Physical and Chemical Properties. In: *Humic Substances and Their Role in the Environment*. Frimmel F. H. e Christman R. F. (eds.) John Wiley & Sons, pp. 113-132.

A. 1. Apêndice

Alguns trabalhos resultantes do presente estudo encontram-se já publicados, e outros ainda em fase de submissão ou em preparação. A seguir são apresentadas as respectivas cópias.

Lombardi A. T., Morelli E., Balestreri E. e Seritti A. (1992) Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic Fractionation of Marine Organic Matter. *Environ. Technol.*, 13: 1013-1021.

Lombardi A. T., Seritti A. and Morelli E. (1994) Marine Dissolved Organic Matter. Fractionation by RP-HPLC. In: *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Senesi N. and Miano T. M. (eds.) Elsevier Science, B.V., pp. 851-856.

Lombardi A. T. e Jardim W. F. (1995) Fluorescence spectroscopy of marine and terrestrial dissolved organic materials. Trabalho submetido para publicação.

de Oliveira C. R., Lombardi A. T. e Jardim W. F. (1995) Copper Complexation by Naturally Occuring Organic Matter. A Multiligand Model. Trabalho submetido para publicação.

REVERSE PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC FRACTIONATION OF MARINE ORGANIC MATTER

A.T. LOMBARDI, E. MORELLI, E. BALESTRERI AND A. SERITTI*

C.N.R. - Istituto di Biofisica, Via S. Lorenzo, 26, Pisa, 56100, Italy

(Received 31 March 1992; Accepted 1 September 1992)

ABSTRACT

Marine dissolved organic matter, isolated by adsorption onto tC_{18} Sep-Pak cartridges (SPE-MOM), and soil fulvic acid tC_{18} Sep-Pak processed (SPE-FA) were analysed by RP-HPLC with UV absorption detection (254 nm). The use of a stepwise gradient in sodium acetate/acetonitrile allowed up to six fractions to be separated in both cases. Elution polarity ranged from 10.06 to 8.68. The linearity range, tested with fulvic acid not Sep-Pak processed, was within the values of 7.0 μg and 20.0 μg for all fractions. Methodological aspects and chromatographic differences between SPE-MOM and SPE-FA are discussed.

Keywords: Seawater, RP-HPLC, marine dissolved organic matter, humic substances

INTRODUCTION

In natural waters, dissolved organic matter (DOM) is formed by a large variety of unknown complex compounds, resulting on what can be referred as "dynamic detrital structure". This complex mixture of compounds ends up resulting in serious difficulties for its complete separation and characterization. In spite of this reality, the study of groups of compounds of similar characteristics has led to substantial information on the nature and role of DOM in natural environments (1).

Humic substances, which are believed to be generated by the random polymerization of a variety of biological molecules, constitute a class of compounds that are difficult to degrade. The percentage of these compounds with respect to the total marine DOM is controversial, and in addition different areas of collection influence this variability. Ogura (2) and Duursma (3) report that in surface zone of open seawater, humic substances represent 10-20% of the total DOC, while Mantoura and Riley (4) report that in seawater more than 90% of the DOM is present as complex polymeric fluorescent material. These compounds, which originate from living

biological systems, are operationally fractionated into humic acid, fulvic acid and humin. Fulvic acid, which is soluble in both acid and basic solution, is the most hydrophilic among the three (5).

Literature data suggest similarities between marine DOM and fulvic acid of terrestrial origin (6,7), but it is clear that considerably more data are required before any conclusions are reached.

The necessity of characterization of humic substances has been recently increased due to both its importance in controlling the behaviour and mobility of metals in the environment (8-11), as well as to its importance on biogeochemical processes (12). This has led to increasing efforts on the characterization of aquatic humic substances and as a result, a variety of spectroscopic (NMR, ESR, IR, fluorescence) and separation techniques (13) have been used.

Among the various modes of separation methods proposed for humic substances, molecular size fractionation by high performance size exclusion chromatography (14), traditional gel permeation chromatography (15), capillary isotachopheresis (16), thin layer chromatography with flame ionization detection

(TLC/FID) (17,18) and reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (19-22) are the most used.

Hayase and Tsubota (22) have used a RP-HPLC system for an investigation onto fulvic acid compounds which had previously been fractionated by molecular weight. They report that fulvic acids from marine sediments exhibit increasing hydrophilic character with increasing molecular weight. This coupling of methods as an attempt to a finer characterisation of humic substances may illustrate some of the difficulties involved in such a study.

In this paper the use of a RP-HPLC procedure for the fractionation of marine DOM isolated by tC_{18} Sep-Pak into 6 groups of compounds with differing polarity is reported. The procedure was also applied to a fulvic acid sample extracted from commercial humic substances and the differences in the chromatographic behaviour are discussed.

METHODS

Chemicals and Equipment

Commercial soil humic substances (Fluka, 53680) were purified by dissolving a certain amount of the compound in 0.1 M NaOH. Humic acids were precipitated by acidification with HCl to pH 2 and the supernatant was further centrifuged and filtered through a 0.2 μm Sartorius membrane filter. This solution was then neutralized (pH 7) with NaOH and kept at 4°C for 24 h. The insoluble fraction was removed by centrifugation and filtration. The liquid sample (fulvic acid plus salts) was then dialysed in cellophane tubing (Mediate International, London) to isolate fulvic acids, and further vacuum dried. This procedure is a modification of those described in Boussemart *et al.* (23) and Castetbon *et al.* (24).

Millipore super-Q water (Bedford, MA, USA) was used throughout this work and was suitable for HPLC applications. Acetonitrile (ACN) used for the chromatographic gradient and methanol (MeOH) used for the elution of organic matter from tC_{18} Sep-Pak cartridges were HPLC grade (J.T. Baker - Holland).

Sodium acetate (NaAc) (Carlo Erba, Milan) solution at a concentration of $5 \cdot 10^{-2}$ M was prepared by dissolving the salt with super-Q water and adjusting the pH to 7 with hydrochloric acid (suprapur grade, Merck).

tC_{18} Sep-Pak cartridges (Waters Associates) were preconditioned with 10 ml of MeOH

followed by 10 ml of $3 \cdot 10^{-4}$ M HCl solution and then with 20 ml of super-Q water, as described in Mills *et al.* (10). These tC_{18} cartridges differ from the classic Sep-Pak ones by a higher amount of packing material ($\text{SiC}_{18}\text{H}_{37}$), a trifunctional bonding instead of monofunctional and smaller particle size range (37-55 μm instead of 55-105 μm).

The HPLC system consisted of two LKB 2150 pumps, equipped with a LKB 2152 solvent programmer, a 250 μl injector (Rheodine, California, USA), a 254 nm UV detector (Pharmacia LKB, Uvicord SD) and a Hewlett-Packard computing integrator model HP3396 Series II. Chart speed was 0.2 mm min^{-1} except from 0.8 to 4.0 minutes, where it was kept at 0.5 mm min^{-1} .

A commercial pre-packed (5 μm octadecyl-bonded silica) analytical Spherisorb HPLC column (250 x 4.6 mm I.D.) purchased from Violett (Phase Sep, U.K.) was used in connection with a guard column (50 x 4.6 mm I.D.) containing the same packing material. A 2 μm in-line pre-column Teflon filter (Alltech, USA) was routinely used to protect columns from particulate matter. Wherever possible, teflon and PEEK capillary tubing (Alltech) were used for the chromatographic lines.

Recovery was evaluated by both fluorescence emission and absorption measurements for the HPLC column, and by absorption for the Sep-Pak cartridges. Fluorescence emission spectra were performed with a Jasco Fluorometer (mod. FP 770) by setting the excitation at 320 nm and reading the emission at its maximum, ranging from 410 to 422 nm. Absorption measurements at fixed wavelength (254 nm) were performed using a Jasco UVIDEC-510 spectrophotometer (mod. HMC 538) on a 1 cm quartz cell for the extracts and a 5 cm one for the natural seawater.

All labware was acid cleaned, stored in diluted chloridric acid solution (10% v/v) and rinsed with super-Q water just before use.

Sample Preparation and Analysis

Surface seawater was collected from offshore Tuscan Archipelago (Capraia Island), filtered through preconditioned 0.45 μm Sartorius membrane filter and stored in the dark at 4°C in polyethylene pre-conditioned containers as suggested by Mart (25). All seawater samples were processed within four weeks of its collection.

For each seawater sample, 2 l of seawater at room temperature were brought to pH 2.8-3.0 with

HCl and passed through a conditioned tC_{18} Sep-Pak cartridge under nitrogen at a flow rate of 10 ml min^{-1} ; the cartridge was then rinsed with 20 ml of super-Q water to eliminate seawater salts. Marine DOM retained in these conditions is here called SEP-PAK EXTRACTABLE MARINE ORGANIC MATTER (SPE-MOM) and was eluted with 10 ml of a $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (85:15) v/v solution. The cartridges retained approximately 20% of the total marine DOM. The eluate was evaporated using a centrifuge (Hetovac) linked to a freeze dryer (Edwards-Modulyo). The dried sample was then dissolved in 1 ml of the sodium acetate solution ($5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Sartorius membrane filter. A $250 \mu\text{l}$ aliquot was injected into the HPLC system for analysis.

When fulvic acid solution (0.1 mg l^{-1}) was passed through a tC_{18} Sep-Pak cartridge, the same procedure was used and the eluted organic matter is here called SEP-PAK EXTRACTABLE FULVIC ACID (SPE-FA). A tC_{18} Sep-pak processed seawater followed by U.V. irradiation was used as both solvent for the fulvic acid solution and procedural blank. The U.V. seawater, distributed in teflon capped quartz tubes, was obtained by irradiation with a 1 KW high pressure mercury lamp for 9-10 hours.

For calibration purposes, fulvic acid standard solutions were prepared by diluting appropriate aliquots of a stock solution (0.1 g l^{-1}) with NaAc ($5 \cdot 10^{-2}$) and then filtered through $0.45 \mu\text{m}$ Sartorius membrane filter.

The HPLC elution procedure was a programmed stepwise gradient. The steps were performed by mixing NaAc:ACN (97:3) v/v as solvent A to 100% ACN used as solvent B. The whole chromatographic procedure is illustrated in figure 1. The dead volume was 2.5 ml. The trace amount of ACN previously added to the sodium acetate solution allowed the baseline noise caused by the automatic mixing to be minimized. Moreover, trace amounts of the organic solvent is known to act on the column wetting up (hydrophobic in reverse phase chromatography), thus increasing the equilibrium across the interface of the two highly dissimilar phases (hydrocarbon and aqueous) (26).

RESULTS AND DISCUSSION

RP-HPLC Fractionation

The complexity of chromatographic separation of aquatic DOM is well known (19,22) and the mechanism of retention of this class of organic matter by a reverse phase system is not yet clear. Horvath *et al.* (27) have proposed a mechanism of retention which is based on the solvophobic theory. Despite such uncertainties, RP-HPLC has been shown to be very useful for separation and determination of dissolved organic matter of various origins (20).

The continuous gradient commonly employed by other authors (9,10) seems not to

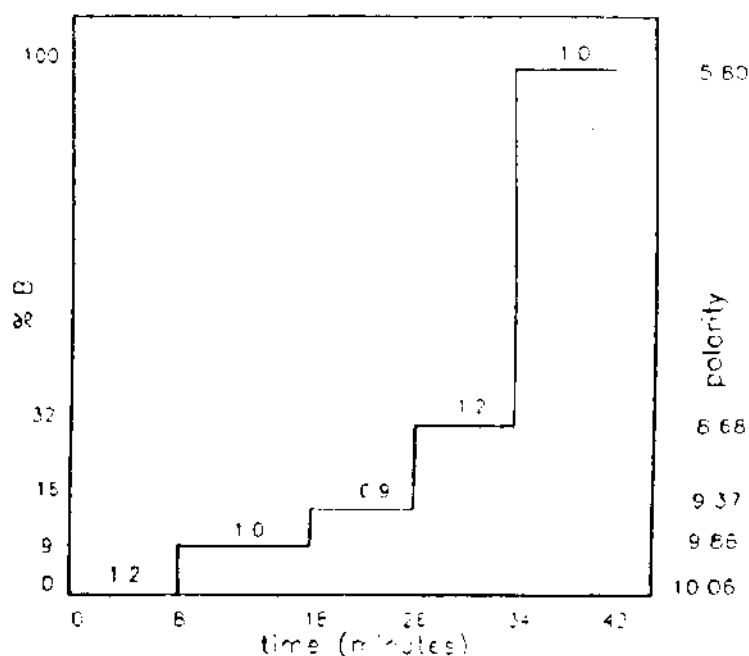


Figure 1. Stepwise elution gradient used for the proposed chromatographic procedure. Numbers above each step indicate flow rate (ml min^{-1}).

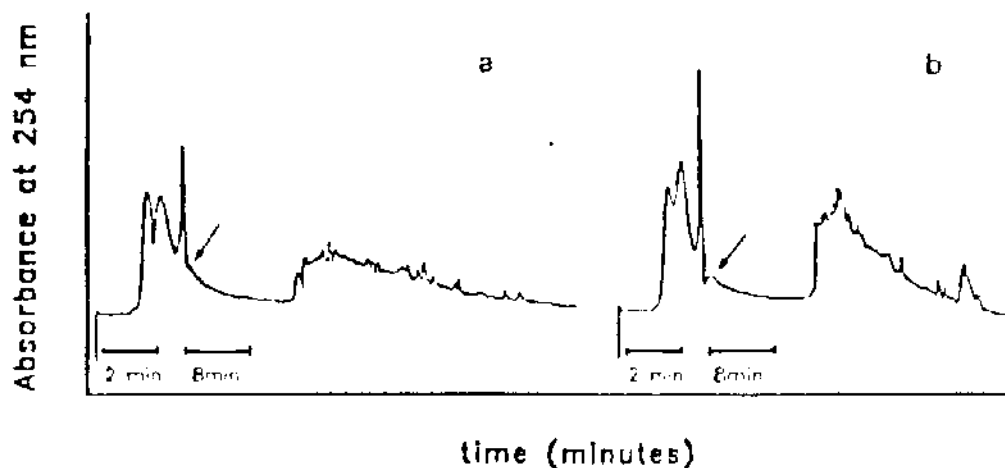


Figure 2. RP-HPLC chromatograms performed with SPE-MOM. Isocratic elution (NaAc:ACN, 97:3 v/v) for the initial 8 minutes and then continuous up to 50% ACN for 30 minutes (a), and for 15 minutes (b). Flow rate 1.2 ml min^{-1} from time 0 to 8 minutes and 1.0 ml min^{-1} thereafter. Arrows indicate change on chart speed, as mentioned on "Methods".

effectively fractionate the marine DOM. Figure 2 shows the results of two elution procedures similar to those used by the above cited authors.

In the isocratic part of the chromatogram, three peaks can be distinguished, while during the gradient, a unresolved "clump" is observed. The height of this "clump" increases with the gradient steepness, but at lower slope of the gradient, a flattening of the clump is observed. This behaviour suggests that humic substances may be formed of a great variety of components with continuous polarity characteristics, which could be the probable reason of all the difficulties encountered in this type of separation.

Typical chromatograms obtained using the proposed stepwise gradient (figure 1) are shown in figure 3. Figure 3a shows the chromatogram of a SPE-MOM sample eluted with NaAc:ACN as mobile phase. When water was used instead of sodium acetate solution (figure 3c), fewer fractions were obtained, with the majority of the organic matter eluting from the column at higher polarity values. In fact, the sum of the areas of chromatograms 3a (sum of fraction areas = $9.5 \cdot 10^6$) and 3c (sum of fraction areas = $10.8 \cdot 10^6$) are similar.

The effect of the sodium acetate can be related to the ionic strength, which played a positive role on the chromatographic separation. In fact, as reported by Snyder and Kirkland (26), the addition of salts to the mobile phase can influence the retention and selectivity of the solute.

The presence of tailing in the SPE-MOM fractions (figure 3a), which could suggest column

overload and other problems (26), was not present in the SPE-FA sample. Besides this, parallel experiments have shown that column overloading and flow rate may be excluded, so a more complex nature of the marine DOM with respect to fulvic acid can be postulated.

Comparison of figures 3a and 3b shows differences in the distribution of the fraction areas along the chromatograms, which can be attributed to a variation in the relative amounts of compounds with similar polarity, although a presence of several chromophoric compounds with the same polarity but different molar extinction coefficients, cannot be excluded.

Table 1 illustrates these data. In seawater, the highly polar peaks (1, 2 and 3) constitute almost 40% of the total SPE-MOM, while they represent 81% of the total organic matter in the SPE-FA. The peak of intermediate polarity (9.68) represents about 40% in seawater, while just 16% in the SPE-FA. The other two fractions are again higher in seawater than in the fulvic acid sample. The difference in distribution of fraction areas shows a major amount of compounds with lower polarity in the SPE-MOM with respect to the SPE-FA. This finding could suggest a different composition between these two classes of compounds, probably due to a major degree of polymerization of the lower polarity compounds (28). However, the overall of the organic matter in both SPE-MOM and SPE-FA, is of rather high polarity, confirming the results of Susic and Boto (20) and Saleh and Chang (19).

Recovery of DOM from the column was checked by measuring sample fluorescence and

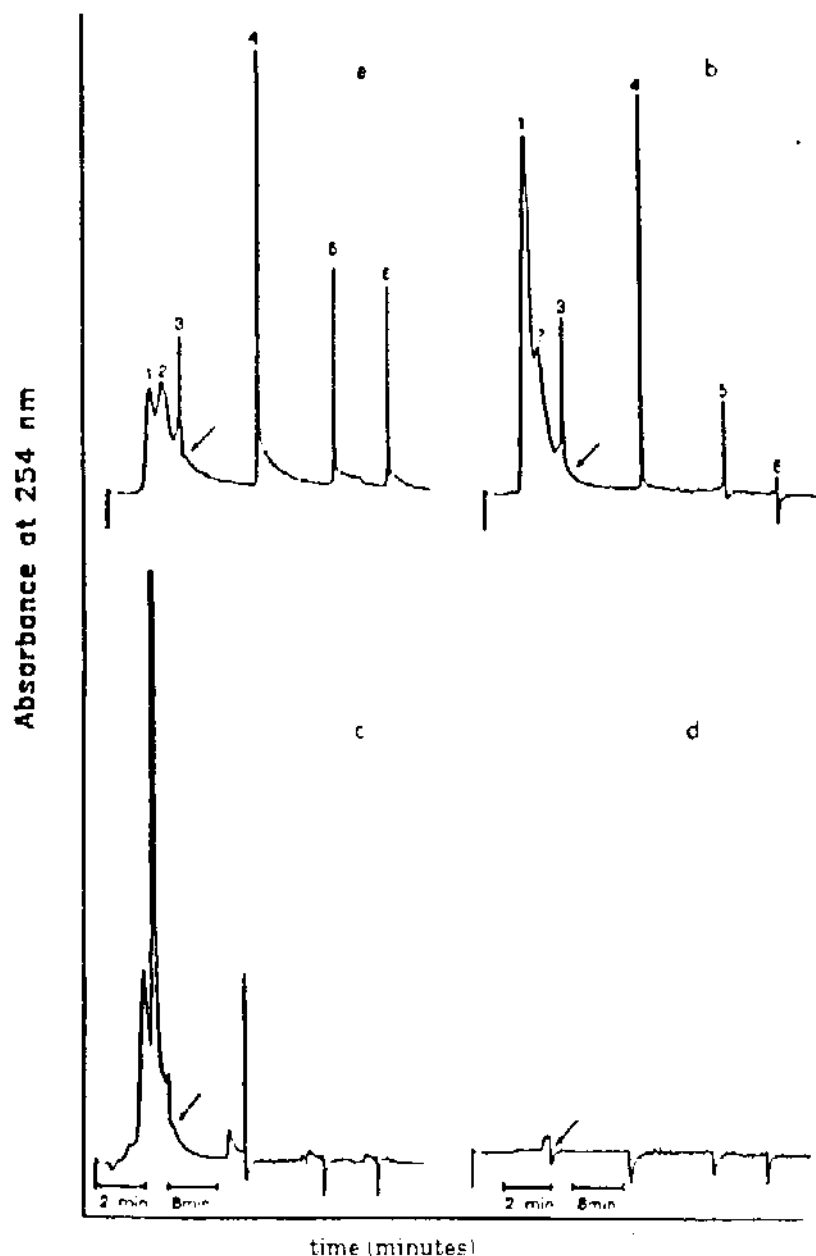


Figure 3. Typical RP-HPLC chromatograms of dissolved organic matter. (a) SPE-MOM; (b) SPE-FA (fractions 1, 2, 3 and 4 were chromatographed using one half reduction in sensitivity); (c) SPE-MOM eluted with water as solvent A; (d) procedure blank. Elution procedure as described in figure 1. Arrows indicate change on chart speed, as mentioned on "Methods".

absorption at 254 nm before injection into the HPLC system and after DOM fractionation. This was performed by collecting the HPLC eluate from column during the whole chromatographic procedure and it was close to the 95% value.

Further, spectroscopic characterizations of each RP-HPLC fraction are in progress in order to point out molecular differences among the fractions.

Calibration

The calibration of the system was performed with fulvic acid extracted from commercial humic substances and not Sep-Pak processed used as standard solutions at increasing concentrations (0-22.5 μg). Although the chromatograms of these standard solutions showed 5 fractions instead of the usual 6 obtained

Table 1. Elution polarity, retention time, and relative area with its respective coefficient of variation (CV) for each fraction of the samples analysed.

Fraction number	Elution polarity P^*	Retention time (min)	SPE-MOM (n=8) % area	CV	SPE-FA (n=8) % area	CV
1	10.06	2.27	12	5	45	2
2	10.06	2.82	18	2	26	3
3	10.06	3.61	9	7	10	2
4	9.86	12.68	36	5	16	4
5	9.37	22.50	14	7	3	9
6	8.68	29.42	12	17	2	27

* calculated as reported by Snyder and Kirkland (29)

$P = \Phi_A \cdot P_A + \Phi_B \cdot P_B$ where Φ_A and Φ_B are the volume fractions of solvents A and B in the mixture and P_A and P_B refer to the P values of the pure solvents.

for SPE-FA and SPE-MOM, it was preferable since higher accuracy in relation to the load injected into the HPLC system was obtained.

Calibration curves for the RP-HPLC fractions are reported in figures 4a and 4b. They show that a better parameter for the determination of the method linearity is the relative fraction areas (figure 4b) instead of the absolute values (figure 4a). It is clear that the relative values should be a constant throughout the different load injected, since the composition of the fulvic acid solution is supposed to be the same independently of its concentration. The limits of the linear regression lines (figure 4a), tested by

y-residual plots, agreed with the values obtained by the relative areas (figure 4b).

As shown by Susic and Boto (20), increased sensitivity may be obtained when using fluorescence detectors. These authors report a limit of detection at nanogram levels (15 ng), with the linearity being maintained between 0.18 and 2.1 μg . In the present work, the limit of detection is at microgram levels, while the linearity ranges from 7.5 to 20 μg .

The probable reason for the non linearity in the range 0-5 μg load injected is a high instrumental error at these low levels of detection. However, an interconversion among

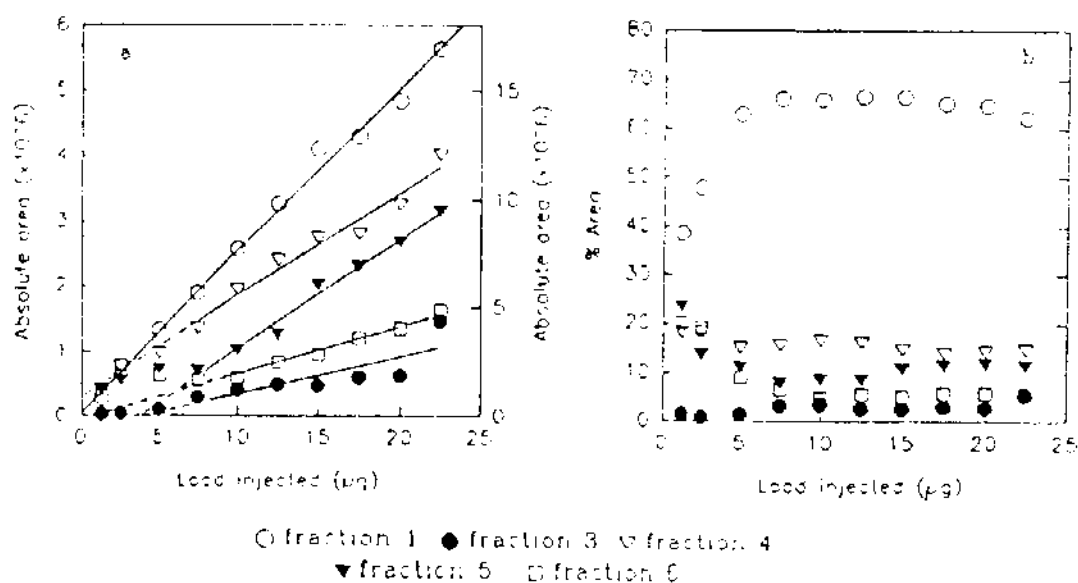


Figure 4. Calibration curves performed with fulvic acid standard solutions. (a) Absolute fraction area as a function of load injected (μg). Curve and experimental points of fraction 1 are referred to the second Y-axis. (b) Relative fraction area values as a function of load injected (μg). In this fulvic acid sample, not Sep-Pak processed, the fraction 2 was not present.

fractions cannot be discarded. Indeed, when each fraction was re-injected, it was found that 0-20% was re-distributed as other fractions in the chromatogram, with the 80-100% being analysable as the same fraction.

Retention

ANOVA at the 95% confidence level showed no significant difference among the retention time values for the same fractions of the different samples. Mean retention time values are shown on Table 1. In this study, retention time of fractions 4, 5 and 6 were a function of gradient change: components were eluted as the polarity was modified. This suggests a separation of families of compounds with a range of polarities having its minimum at the polarity of the step. A similar conclusion was also postulated by Saleh and Chang (19) for Suwannee River fulvic acids processed by RP-HPLC.

In order to test this hypothesis, a change in polarity of the first step of our stepwise gradient has been performed. The non-purity of fractions 3 and 4 together with a variation in polarity is demonstrated in figure 5. A direct relationship is observed between polarity and area of fraction 3, while the inverse is obtained for fraction 4. The regression lines show a passage of organic compounds from one fraction to the other. This

trend seems to support the hypothesis of a continuous polarity scale in these compounds.

DOM Isolation

Comparison of our results with literature data clearly shows the importance of the extraction techniques employed. The polarity of the compounds eluted by the procedure here reported, calculated as described in Snyder and Kirkland (26), was within the values 10.06 for the most polar fraction and 8.68 for the least polar one. In a similar system (RP-HPLC) and also using a stepwise gradient, Saleh and Chang (19) calculated the polarities of fulvic acid components to range from 10.15 to 5.86. The difference in polarity of almost 3.0 for the least polar fraction of Saleh and Chang work (19) with respect to the present results should be noted. Since those authors analysed Suwannee River fulvic acid, and our results refer to both SPE-MOM and SPE-FA, at least for our fulvic acid sample the polarity of elution should have been closer. This difference may be due to the extraction process, since Saleh and Chang (19) followed the procedure described in Thurman and Malcom (29), which differs in various aspects from the one employed by us.

The polarity of elution of our SPE-MOM components are more closely related to those

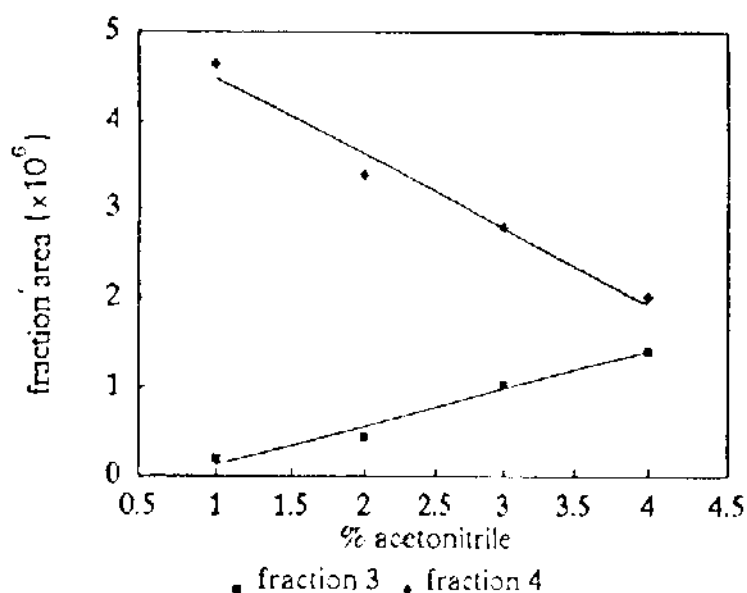


Figure 5. Areas of fractions 3 and 4 as a function of the initial percentage of acetonitrile in solvent A (refers to a change on the first step).

presented in Mills and Quinn (30). These authors reported that most of the marine DOM extracted by Sep-Pak cartridges elutes at polarities lower than 7.90.

CONCLUSION

The use of the proposed stepwise gradient allows the separation of SPE-MOM and SPE-FA in groups of components of similar polarity. The grouping into homologous compounds in polarity the natural DOM could represent a goal in order to improve the knowledge of such a complex

mixture of compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Prof. J. H. Weber for his helpful comments on the manuscript. ATL (Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Dept. Química Analítica, Campinas - SP, 13100, Brazil) acknowledges a scholarship received from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil).

REFERENCES

1. Buffle J., *Complexation Reactions in Aquatic Systems - An analytical approach*. Ellis Horwood Limited, Chichester (1988).
2. Ogura N., Rate and extent of decomposition of dissolved organic matter in surface seawater. *Mar. Biol.*, **13**, 89-93 (1972).
3. Duursma E.K., The dissolved organic constituents of seawater. In: *Chemical Oceanography*, Vol.1, Riley J.P. and Skirrow S. (eds.), Academic Press, London, p. 433-473 (1965).
4. Mantoura R.F.C. and Riley J.P., The analytical concentration of humic substances from natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **76**, 97-106 (1975).
5. Saar R.A. and Weber J.H., Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 510A- 517A (1982).
6. Hanson Jr A.K. and Quinn J.G., The distribution of dissolved and organically complexed copper and nickel in the middle Atlantic Bight. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **40**, 151-161 (1983).
7. Malcom R.L., Application of Solid-state ¹³C NMR Spectroscopy to Geochemical Studies of Humic Substances. In: *Humic Substances II - In search of structure*, Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcom R.L. and Swift R.S. (eds.), J. Wiley and Sons, Chichester, p. 339-372 (1989).
8. Becher G., Oestvold G., Paus P. and Seip H.M., Complexation of copper by aquatic humic matter studied by reversed-phase liquid chromatography and atomic absorption spectroscopy. *Chemosphere*, **12**, 1209-1215 (1983).
9. Mackey D.J., Metal-organic complexes in seawater - an investigation of naturally occurring complexes of Cu, Zn, Fe, Mg, Ni, Cr, Mn and Cd using high-performance liquid chromatography with atomic fluorescence detection. *Mar. Chem.*, **13**, 169-180 (1983).
10. Mills G.L., McFadden E. and Quinn J.G., Chromatographic studies of dissolved organic matter and copper organic complexes isolated from estuarine waters. *Mar. Chem.*, **20**, 313-325 (1987).
11. Wangersky P.J., Moran S.B., Pett R.J., Slauenwhite D.E. and Zhou X., Biological control of trace metal residence times: an experimental approach. *Mar. Chem.*, **28**, 215-226 (1989).
12. Mantoura R.F.C., Organo-metallic interactions in natural waters. In: *Marine Organic Chemistry*, Duursma E.K. and Dawson R. (eds.), Elsevier Oceanography Series, Amsterdam, 179-223 (1981).
13. Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcom R.L. and Swift R.S., *Humic substances II - In search of structure*. J. Wiley and Sons, Chichester (1989).
14. Rausa R., Mazzolari E. and Calemma V., Determination of molecular size distributions of humic acids by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, **541**, 419-429 (1991).
15. Haumaier L., Zech W. and Franke G., Gel permeation chromatography of water soluble organic matter with deionized water as eluent - I. Examination of the method. *Org. Geochem.*, **15**, 413-417 (1990).
16. Kopacek P., Kaniansky D. and Hejzlar J., Characterization of humic substances by capillary isotachopheresis. *J. Chromatogr.*, **545**, 461-470 (1991).
17. Zhou X. and Wangersky P.J., Characterization of marine organic matter by thin-layer chromatography with flame ionization detection. *Mar. Chem.*, **20**, 211-218 (1987).

18. Parrish C.C., Zhou X. and Herche L.R., Flame ionization and flame detection of carbon and nitrogen in aquatic lipid and humic type classes with an Iatroscan Mark IV. *J. Chromatogr.*, **435**, 350-356 (1988).
19. Saleh F.Y. and Chang D.Y., Retention behavior of Suwannee River fulvic acid components in RP-HPLC. *Sci. Total Environ.*, **62**, 67-74 (1987).
20. Susic M. and Boto K.G., High-performance liquid chromatographic determination of humic acid in environmental samples at the nanogram level using fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, **482**, 175-187 (1989).
21. Grasso D., Chin Y.P. and Weber Jr W.J., Structural and behavioural characteristics of a commercial humic acid and natural dissolved aquatic organic matter. *Chemosphere*, **21**, 1181-1197 (1990).
22. Hayase K. and Tsubota H., Reversed-phase liquid chromatography of molecular weight fractionated sedimentary fulvic acid. *J. Chromatogr.*, **295**, 530-532 (1984).
23. Boussemart M., Benamou C., Richeu M. and Benaim J.Y., Comparison of differential pulse anodic stripping voltammetry and spectrofluorometry for determination of complexes between copper and organic matter in interstitial waters extracted from marine sediments. *Mar. Chem.*, **28**, 27-39 (1989).
24. Castetbon A., Corrales M., Astruc M., Dottin M., Sterritt R.M. and Lester J.N., Comparative study of heavy metal complexation by fulvic acid. *Environ. Technol. Lett.*, **7**, 495-500 (1986).
25. Mart L., Prevention of contamination and other accuracy risks in voltammetric trace metal analysis of natural waters. Part I. Preparatory steps, filtration and storage of water samples. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **296**, 350-357 (1979).
26. Snyder L.R. and Kirkland J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons, New York (1979).
27. Horvath C., Melander N. and Molnar I., Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J. Chromatogr.*, **125**, 129-156 (1976).
28. Grasso D. and Weber Jr W.J., Ozone-induced particle destabilization. *Research and Technology*, 73-82 (1988).
29. Thurman E.M. and Malcom R.L., Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, **15**, 463-466 (1981).
30. Mills G.L. and Quinn J.G., Isolation of dissolved organic matter and copper-organic complexes from estuarine waters using reversed-phase liquid chromatography. *Mar. Chem.*, **10**, 93-102 (1981).

Marine dissolved organic matter. Fractionation by RP-HPLC

A. T. Lombardi^a, A. Seritti and E. Morelli^b

C.N.R. Istituto di Biofisica, Via S. Lorenzo 26, 56100 Pisa, Italy

Abstract

Using a Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic technique, tC18 Sep-Pak extracts of marine dissolved organic matter and of soil fulvic acid were fractionated in 5 distinct groups based on their polarity behaviour. The chromatographic data show a higher degree of polarity for the soil sample in relation to the marine. Fluorescence emission spectra were recorded for each HPLC fraction and the distribution of the fluorescent organic matter with respect to the total organic matter has been evaluated. A trend between fluorescence and polarity has been observed for the marine sample, while for the soil fulvic acid fluorescence was equally distributed.

1. INTRODUCTION

The complexity of natural dissolved organic matter together with problems in extraction procedures (specially for matrixes with high content of salts) has lead to difficulties into the investigation of this important constituents of aquatic systems.

In the last years the C18 Sep-Pak technique has been used for the extraction of copper-organic complexes [1] and of fluorescent organic matter [2] from seawater. Comparing Sep-Pak extracts of marine dissolved organic matter (DOM) and terrestrial fulvic acid Hanson and Quinn [3] reported a similar chromatographic behaviour for these two samples. Mills, et al. [4] assumed the presence of fulvic type material in Sep-Pak extracted marine DOM.

Attempts have been made to separate by RP-HPLC the Sep-Pak extracted organic matter [4, 5] but the complexity of the mixture hinders the separation into pure molecules. Nevertheless, the chemical separation into homologous groups of compounds, both for polarity [6, 7] and molecular weight [8] allows further acquisition of some of their properties.

The natural fluorescence of DOM and the high sensitivity of fluorescence spectroscopy make this technique one of the most promising for the investigation of the complex mixture of organic compounds. Without perturbing the system, fluorescence spectroscopy has been applied to the study

^a Permanent address: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, 13900 Campinas - SP, Brazil

^b Correspondence author

of metal complexation by DOM [9], and to the characterization of DOM of various origins [10].

In this study tC18 Sep-Pak extracts of marine and soil organic matter were fractionated by RP-HPLC and each fraction was investigated for the fluorescence contribution to the total organic matter.

2 PROCEDURE

2.1. Sample preparation

Surface seawater was collected 3 miles off-shore the Island of Capraia (Italy) and filtered through pre-washed 0.45 μm membrane filters (Sartorius) after collection. The filtered seawater was stored in the dark at 4 °C in pre-conditioned polyethylene containers and was used within 4 weeks of collection.

Marine DOM was extracted by passing 2 liters of acidified (pH 2.8- Suprapur HCl, Merck) seawater through a pre-conditioned [11] tC18 Sep-Pak cartridge at a flow rate of 10 ml·min⁻¹ under a nitrogen pressured enclosed system. Based in absorbance at 254 nm (A_{254}), extraction efficiency was 20% of the total marine DOM.

A well characterized soil fulvic acid [12] was kindly supplied by Dr. J. H. Weber from the Chemistry Department of the University of New Hampshire (Durham, U.S.A.). The soil eluate was obtained by passing 2 liters of a 0.1 mg·l⁻¹ solution of soil fulvic acid through a tC18 Sep-Pak at the same flow rate used for marine DOM. A tC18 Sep-Pak processed and U. V. irradiated seawater (8 hours, 1 kW high pressure Hg lamp) was used as solvent for the soil fulvic acid solution. This seawater with extremely low amount of fluorescent organic matter was also used for the performance of procedural blanks.

The tC18 Sep-Pak cartridges were rinsed with 20 ml of Milli-Q water for salt removal and eluted with 10 ml of methanol 85% in water. Samples were vacuum dried using a centrifuge (Hetovac) linked to a freeze dryer (Edwards-Modulyo). These dried eluates were dissolved in 500 μl of sodium acetate solution ($5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ - Carlo Erba, Milan) previously adjusted to pH 7 with HCl, and then filtered through 0.45 μm membrane filter. They were further submitted to fluorescence and reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) analysis.

2.2. Chromatography

The HPLC system consisted of two pumps (LKB 2150), a solvent programmer (LKB 2152), a 250 μl loop injector (Rheodine, USA), a 254 nm U.V. detector (LKB Uvicord SD), and a Hewlett Packard computing integrator (mod. HP3396 series II). A 5 μm Spherisorb ODS (Violet, Phase Sep, UK) column with 250 mm L x 4.6 mm ID and a guard column (50 mm L x 4.6 mm ID) containing the same packing material were used for chromatographic analysis. For method details see reference 6.

The stepwise gradient, which was based on sodium acetate ($5 \cdot 10^{-2}\text{M}$, pH 7): acetonitrile, 97:3 (v/v) as *solvent A* and 100% acetonitrile (HPLC grade) as *solvent B* is shown in Fig. 1.

The chromatographic fractions were manually collected according to the intervals of area calculation of the integrator, dried and dissolved in

appropriate volumes of Milli-Q water as to be in the linear range of Fig. 2. Further analysis of fluorescence and absorbance at 254 nm were performed. The chromatographic characteristics for each fraction are shown in Table 1 and the chromatographic profile in Fig. 1. All solvents were HPLC grade.

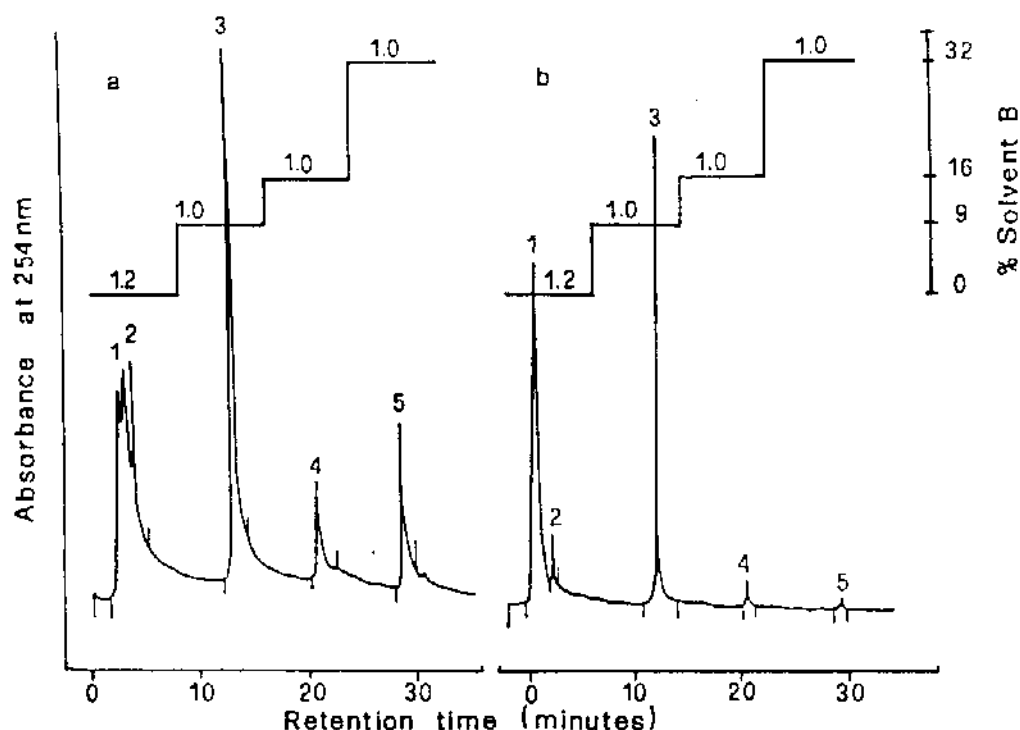


Figure 1. The chromatographic profiles and the stepwise gradient employed for marine eluate (a) and soil eluate (b). Numbers above each step indicate solvent flow rate as ml·min⁻¹. Numbers above each fraction correspond to those in Table 1. (b): sensitivity x 0.5 in relation to (a).

Table 1

Polarity of elution, retention time and relative fraction area with its respective standard deviation (SD) for 4 replicates performed with marine and soil eluates.

Fraction number	Elution polarity* P'	Retention Time (min)	MARINE Eluate		SOIL Eluate	
			% area	SD	% area	SD
1	10.1	2.3 - 2.9	31	1	67	1
2	10.1	3.9	14	1	7	1
3	9.9	12.7	30	3	22	2
4	9.4	20.5	14	3	2	0.5
5	8.7	28.5	11	1	1	0.3

* Polarity was calculated as described in Snyder and Kirkland [13]

2.3. Fluorescence

A Jasco spectrofluorometer (mod. FP770) was used for fluorescence

measurements. The emission spectra were measured at λ_{ex} 350 nm and fluorescence intensity at the wavelength of maximum emission (440 nm for seawater and 460 nm for soil fulvic acid). Excitation and emission monochromators were set to 5 nm and 10 nm respectively. Fluorescence values were procedural blank subtracted, which generally were 10% of the sample values.

It has been shown that A_{254} is a good surrogate parameter for dissolved organic carbon for the humic type organic matter [14]. In fact, a strong relationship between A_{254} and total organic carbon for our marine eluate ($r^2=0.996$) and soil fulvic acid ($r^2=0.998$) has been obtained. Total organic carbon was measured by high temperature catalytic combustion with infrared detection using a Dohrmann DC-190 carbon analyser.

The variation of organic matter concentration among the samples was overcome by measuring A_{254} , used here as an estimation of total organic matter concentration. All fluorescence values are reported as per unit A_{254} , thus allowing a direct comparison among samples. Absorbance measurements were performed on a Jasco UV-DEC model HMC - 358 spectrophotometer.

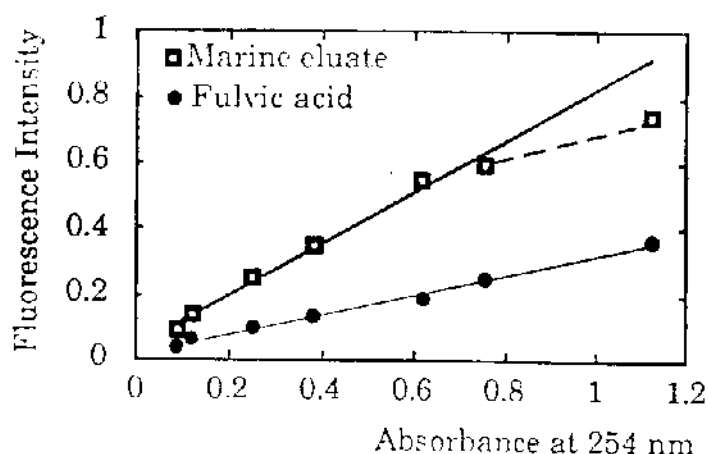


Figure 2. Calibration curves of fluorescence emission versus A_{254} nm for the marine eluate and soil fulvic acid. Excitation was performed at a $\lambda=350$ nm and emission recorded at its maximum intensity. Curve fits are: $y=0.014+0.3x$ ($r^2=0.99$) for soil fulvic acid; $y=0.036+0.8x$ ($r^2=0.99$) for marine eluate.

A calibration curve of A_{254} versus fluorescence emission intensity for both organic matter being investigated (Fig.2) shows the range of linearity. The slopes of the linear regression lines show a higher fluorescence intensity for the marine eluate in relation to the soil fulvic acid. The marine DOM calibration curve was obtained dissolving the marine eluate in Milli-Q water and diluting it to different volumes. For soil fulvic acid different dilutions of a stock solution (100 mg l^{-1}) were prepared.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The chromatographic method employed has fractionated both the marine and the soil eluates into 5 groups of compounds of differing polarity. The process is likely to be a regrouping of the complex organic matter in which parts of it (with a polarity affinity) are eluted together as a unique fraction. Fig.

3 illustrates this regrouping of compounds. Performed with marine eluate, this figure shows that an increase in the percentage of acetonitrile in the elution solvent by just 1%, leads to a consistent passage of organic matter from fraction 3 to fraction 2. This behaviour suggests the presence of a continuous scale of polarity in the natural DOM and it would imply a very difficult separation of the organic matter into pure compounds. The regrouping of compounds may however be promising when used as a preparative technique, and fractions been analysed for other characteristics.

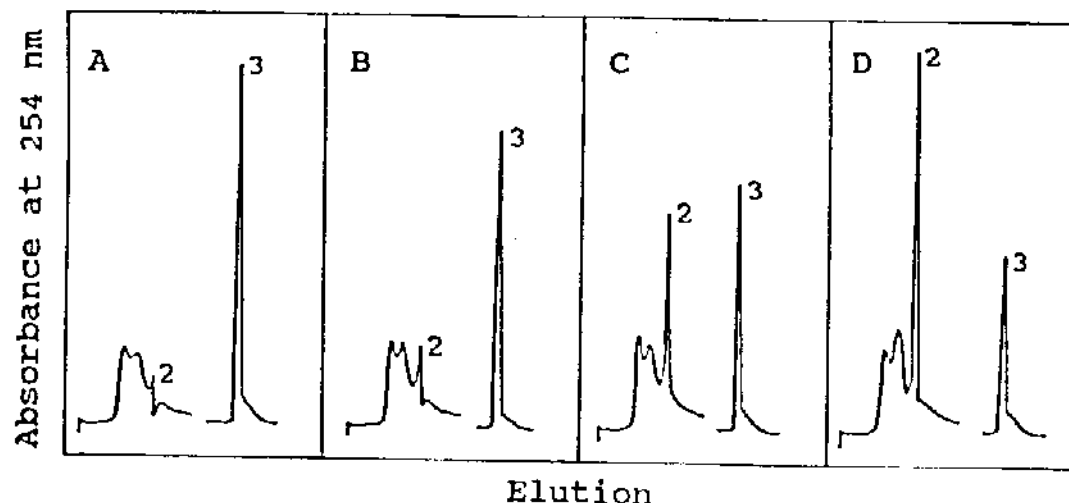


Figure 3. Chromatographic profiles of fractions 2 and 3 illustrating their variation as the percentage of acetonitrile is altered in the elution solvent. A, B, C and D refer to elution with 1%, 2%, 3% and 4% of acetonitrile respectively. Fraction 3 was recorded with sensitivity $\times 0.5$.

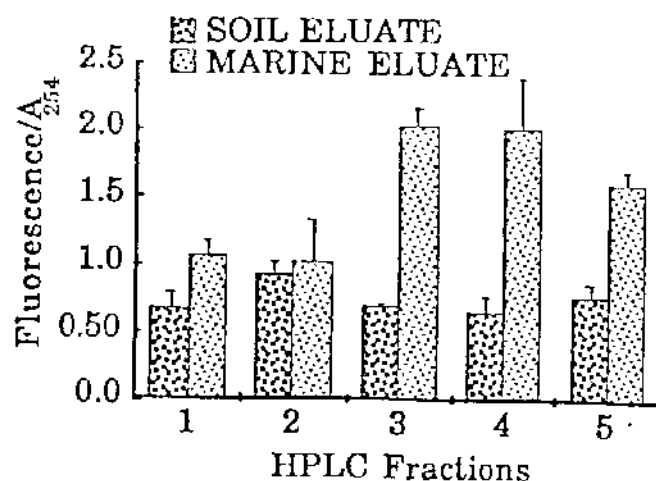


Figure 4. Histogram showing the distribution of the fluorescent organic matter per unit absorbance at 254 nm among the chromatographic fractions.

From the chromatographic profile (Fig.1) and the values reported in Table 1, it is seen that the marine eluate possesses a lower amount of highly polar compounds than the does soil eluate. While the former had about 45%, the latter had 75% of its total organic matter eluted in a polarity of 10.1, which is very close to the polarity of water itself (10.2). An immediate reason why marine eluate needs a greater variation in polarity to have eluted all of its components as compared to the soil eluate could be that in the present isolation

procedure the bulk of the organic matter from seawater has been tC18 Sep-Pak extracted, while in the soil organic matter a previous selection (acidic part of humic substances: fulvic acid) had already been performed. Considering the acidic nature of fulvic acid, this chromatographic behaviour suggests that the acid part of natural organic matter contains components of rather high polarity values. Our results agree with those of Zhou and Wangersky [15]. Using thin layer chromatography with flame ionisation detection they have fractionated marine Sep-Pak eluates into 4 groups of compounds of increasing polarity: lipidic material, base-mobile, methanol-mobile and acid-mobile.

The distribution of the fluorescent material among the fractions of both organic matter investigated is seen in Fig. 4. It shows that the marine fluorescent matter is mostly present in the fractions of intermediate polarity (fractions 3 and 4), while the non-fluorescent organic matter seems to be mainly in the fraction of high polarity value (fraction 1) as suggested by its low fluorescence/A₂₅₄ ratio and its high content of organic matter (31% peak area of Table 1). On the contrary, for the soil eluate the fluorescent matter has been more homogeneously distributed, thus showing no clear trend as detected for the marine sample.

4. ACKNOWLEDGMENT

ATL acknowledges the financial support received from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil).

5. REFERENCES

- 1 G.L. Mills and J.G. Quinn, *Mar. Chem.*, 10 (1981) 93.
- 2 J.A. Amador, P.J. Milne, C.A. Moore and R.D. Zika, *Mar. Chem.*, 29 (1990) 1.
- 3 A.K. Hanson Jr and J.G. Quinn, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40 (1983) 151.
- 4 G.L. Mills, A.K. Hanson Jr, J.G. Quinn, W.R. Lammela and N. D. Chaesteen, *Mar. Chem.*, 11 (1982) 355.
- 5 D.J. Mackey, *Mar. Chem.*, 13 (1983) 169.
- 6 A.T. Lombardi, E. Morelli, E. Balestreri and A. Seritti, *Environ. Technol. Letters* (1992), in press.
- 7 F.Y. Saleh and D.Y. Chang, *Sci. Total Environ.*, 62 (1987) 67.
- 8 K. Hayase and H. Tsubota, *J. Chromatogr.*, 295 (1984) 530.
- 9 D.K. Ryan and J. H. Weber, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 986.
- 10 N. Senesi, T.M. Miano, M.R. Provenzano and G. Brunetti, *Soil Science*, 152 (1991) 259.
- 11 G.L. Mills, E. McFadden and J. G. Quinn, *Mar. Chem.*, 20 (1987) 313.
- 12 J.H. Weber and S.A. Wilson, *Wat. Res.*, 9 (1975) 1079.
- 13 L.R. Snyder and J.J. Kirkland, *Introduction to modern liquid chromatography* (1979), John Wiley and Sons, New York.
- 14 R.S. Summers, P.K. Cornel and P.V. Roberts, *Sci. Total Environ.*, 62 (1987) 27.
- 15 X. Zhou and P.J. Wangersky, *Mar. Chem.*, 26 (1989) 21.

***Fluorescence spectroscopy of marine and terrestrial dissolved
organic materials***

Ana T. Lombardi and Wilson F. Jardim*

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Dept.
Química Analítica, C. P. 6154, Campinas, SP, 13081 - 970 Brazil

* Correspondence author

Abstract

Marine dissolved organic matter and soil fulvic acid extracted using Sep-Pak tC18 cartridges were characterized by fluorescence spectroscopy before and after chromatographic fractionation (RP-HPLC). Based on soil fulvic acid, the Sep-Pak tC18 extraction procedure has led to a loss of 65% of the fluorophores (λ_{ex} 350 nm), and 34% of those at λ_{ex} 450 nm. Conventional fluorescence emission showed a 5 times higher fluorescence for the soil fulvic acid than that for the marine dissolved organic matter ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 350/452 nm) and 11 times higher at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 450/522 nm. Several distinct classes of fluorophores were present on both marine dissolved organic matter and soil fulvic acid as revealed by the synchronous excitation technique. Relatively low polarity materials of marine DOM are more fluorescent than those of the SFA, while the high polarity material of the SFA is more fluorescent than the marine DOM.

Introduction

Natural organic matter, such as humic substances is formed by a complex mixture of compounds. Despite its environmental importance, most of it is still uncharacterized [1]. If the diversity of the natural processes of synthesis and degradation is considered, the number of constituents in the molecule of humic substances could be 'infinite' [2].

Dissolved organic matter (DOM) is thought to be the largest reservoir of organic carbon in the sea [3], being comparable in carbon content to the atmospheric CO₂ [4]. It is important in global biogeochemical processes, such as the partition of CO₂ among the various active reservoirs [4]. It is also capable of complexing metal ions [5-7], and some organic hydrophobic pollutants, such as PCBs [8], and polynuclear aromatic hydrocarbons [9] affecting their solubility.

Marine DOM and soil fulvic acid present intrinsic fluorescence, however their maximum of emission has been shown to be different [10]. As a conservative property, the fluorescence of natural organic matter may be used as a tracer [11], and has been frequently applied to investigations of estuarine mixing processes [12-13].

Although it is thought that just a minor part of humic substances is responsible for its fluorescence, bringing into question whether it does represent the bulk of the molecule [14], literature data has shown that considerable information on molecular and functional properties of the organic molecules may be obtained when applying the luminescent technique [15]. Characterization, differentiation and classification of soil natural organic matter has been investigated by fluorescence spectroscopy [16].

An advantage of fluorescence spectroscopy is its high sensitivity and the possibility of being applied at natural concentrations. This is

particularly useful when investigating the marine environment, because of the difficulties in isolating marine DOM from a highly saline medium.

However, due to the high complexity and heterogeneity of fulvic acids and marine DOM, only limited information is likely to be obtained. In this sense, a coupling of techniques should be promising.

Using liquid chromatographic fractionation of refractory organic acids, Frimmel and collaborators [17], obtained additional information when applying various detection systems, such as fluorescence, UV-visible and organic carbon analysis. Hayase and Tsubota [18] have shown that fulvic acids from Tokyo Bay exhibits increasing hydrophilic character with increasing molecular weight.

In the present investigation, detailed information has been obtained when applying fluorescence spectroscopy to natural organic matter (marine and terrestrial) which had been fractionated by reverse phase high performance liquid chromatography. We show that low polarity material of marine DOM are more fluorescent than the respective of the soil fulvic acid of terrestrial origin while the opposite is true for material of high relative polarity; soil fulvic acid has a higher fluorescence than marine DOM for two classes of fluorophores ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 350/452 nm and 450/522 nm); synchronous excitation technique revealed several distinct classes of fluorophores on both marine dissolved organic matter and soil fulvic acid, but the main difference is quantitative.

Experimental Section

Sample preparation

Surface seawater was collected 3 miles off-shore of the Island of Capraia (Italy) and filtered through pre-washed 0.45 μm membrane filters (Sartorius). This seawater was kept in a dark room at 4°C in pre-conditioned polyethylene containers and used within 4 weeks of collection.

The extraction of marine DOM was performed by passing 2 liters of acidified seawater, pH 3 (Suprapur HCl, Merck) through a pre-conditioned SepPak tC18 cartridge (Water Associates) at a flow of 10 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ under a nitrogen pressured enclosed system. Details of the procedure are described in [19].

After rinsing the cartridge with 20 ml of Milli-Q water, the marine DOM was extracted with methanol:water (85:15, v/v) and the extracts were then vacuum dried using a centrifuge (Hetovac) linked to a freeze dryer (Edwards-Modulyo). Dried samples were kept in the dark in a cold room and were used within 20 days. Methanol was HPLC grade and Milli-Q water was used throughout (Millipore - Bedford, U.S.A.).

Based on absorbance at 254 nm, the SepPak tC18 extraction efficiency was 20% of the total organic matter. Absorbance measurements were done on a JASCO UVIDEK-510 (mod. HMC 538) spectrophotometer.

The soil fulvic acid was graciously supplied by Dr. J. H. Weber from the Chemistry Department of the University of New Hampshire (Durham, U.S.A.). A detailed characterization of such fulvic acid may be found in [20].

As a procedural blank, we have used a clean seawater. This was obtained by passing 2 liters of seawater, pH 3, through 2 Sep Pak tC18 cartridges and further submitting it to U. V. irradiation, 1 KW high pressure Hg lamp in teflon capped quartz tubes for 9 - 12 hours. This

seawater was also used as solvent for a SFA solution ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), which was then submitted to the same extraction procedure as the marine DOM and used as the SFA sample.

All laboratory material was washed with 3.0 M HNO_3 and left in a solution of HNO_3 0.8 M until use, when they were rinsed with Milli-Q water.

Chromatography

Dried samples were resuspended in a KCl (Suprapur grade, Merck) solution ($4\cdot 10^{-3}$ M, pH 7) and chromatographed using a reverse phase high performance chromatography system (RP-HPLC). The solid phase was a $5 \mu\text{m}$ Spherisorb ODS (Violet, Phase Sep, UK) analytical column with 250 mm L x 4.6 mm ID. The HPLC system consisted of two pumps (LKB 2150), a solvent programmer (LKB 2152), a 250 μl loop injector (Rheodine, USA), a 254 nm U.V. detector (Pharmacia, LKB Uvicord SD), and a Hewlett Packard computing integrator (mod. HP3396 series II). Further details may be found in [21].

The mobile phase consisted of a KCl:ACN solution. KCl was employed in a concentration of $4\cdot 10^{-3}$ M (pH 7.0), made up in Milli-Q water with 2% acetonitrile (ACN) added. A stepwise elution gradient was used. Fig. 1 shows typical chromatograms for the marine DOM, soil fulvic acid and procedural blank. Each chromatographic fraction (Fig. 1) was collected and submitted to the vacuum and freeze-drying system. They were kept in the dark in the cold room until the fluorescence analysis. All solvents used were HPLC grade.

Fluorescence

Fluorescence measurements were performed using a JASCO (model FP 770) spectrofluorometer equipped with a xenon 150W lamp as light source. Its internal configuration includes automatic correction for intensity variation of the light source and the spectral characteristics of the light source and those of excitation monochromator. If this is done, the output currents from the monitoring photomultiplier tubes are constant, even if variations of the light source occur. The scan velocity was adjusted to 200 nm·min⁻¹ for both monochromators. All spectra were registered with a 10 nm slit-width for the emission monochromator and 5 nm for the excitation monochromator.

Fluorescence emission spectra were registered from 370 nm to 600 nm with a fixed excitation of 350 nm (λ_{ex350}) and also fixed at 450 nm (λ_{ex450}). Excitation spectra were obtained with fixed emission at 560 nm and a scan range of 300 to 550 nm. Synchronous excitation spectra were registered from 300 to 600 nm with a $\delta=18$ nm. Raman peaks, calculated according to [22], should appear at 238 nm; thus they are absent from our spectra. These values are frequently employed in humic substances fluorescence research [5, 23]. Samples were resuspended in a solution of KCl (Suprapur grade, Merck) at a concentration of $6 \cdot 10^{-3}$ M, pH 7. All spectra were subtracted from their respective procedural blank, thus corrections for possible artifacts due to the sample preparation steps were performed.

All experiments were made with two replicates.

Total organic carbon (TOC)

TOC was measured by high temperature catalytic combustion with infrared detection using a Dorhmann DC-190 carbon analyser (California,

U.S.A.). The linear regression obtained for TOC calibration was $y = 0.99 + 0.912x$, $r = 0.9990$.

Calibration curves were performed for fluorescence and TOC techniques using solutions of both marine DOM and SFA (not processed by Sep-Pak tC18 cartridge). The parameters obtained are shown in Table I and II for the marine DOM and SFA respectively.

Results and Discussion

Emission

It is a general consensus that organic matter of natural origin or humic substances presents at least 2 classes of fluorophores [24]. The intensity of fluorescence emission per unit organic carbon for the marine DOM and SFA studied here is shown in Fig. 2. The fluorescence intensity for the first class of fluorophores (λ_{ex350}) is 2.5 times higher in the SFA than it is in the marine DOM. If one considers the fluorescence of the SFA before the Sep-Pak tC18 cartridge treatment, then the difference goes up to almost 8 times. The fluorescence emitted by the second class of fluorophores (λ_{ex450}), is 11 times higher in the SFA.

Donard and collaborators [10], investigating the fluorescence of marine and continental waters at natural concentrations, obtained a fluorescence 20 times higher for continental when compared to marine waters. The difference between the results obtained in [10] and the ones of the present investigation may be due to the extraction procedure. The Sep-Pak tC18 extraction of the SFA has led to a loss of 65% of the first class of fluorophores and 34% of the second class (Fig. 2). It has been shown that a hydrophilic component in marine waters was not retained by Sep-Pak C18, and that this fraction was responsible for 20% of the total fluorescence [25]. Once the marine DOM and SFA were submitted to the same extraction procedure, so that the fluorophore selection has been at least similar for both, the only explanation for almost 50% difference between the present results and those of [10] is that the SFA had already been submitted to a selection procedure at the time of its preparation [20], which may have resulted in a reduction of the variety of fluorophores.

A shift to lower wavelengths was observed when comparing the maximum of emission of the marine DOM ($437 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$) to that of the

SFA ($452 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$) for the first class of fluorophores (Fig. 3). According to [16] this suggests simpler structural components and lower molecular weight for the marine sample than for the SFA. A similar observation was obtained in [10], where the authors show a shift to higher frequency wavelengths for marine waters in relation to continental ones.

The second class of fluorophores seems to be similar for both marine DOM and SFA, since no shift in wavelength has been observed (Fig. 3). In this case, the difference was only quantitative and again SFA showed higher fluorescence signal per unit organic carbon. Figure 2 also shows the relative importance of each class of fluorophores. The first class is responsible for 80% of the marine DOM fluorescence, but only for 60% of that of the SFA. Thus, the second class of fluorophores is more important in the SFA extract than in the marine DOM.

No significant difference was detected when analysing the maxima of emission among the fractions and between marine DOM and SFA. The main difference is again quantitative. However, it should be kept in mind that natural organic matter is formed by a complex mixture of compounds [2], including fluorophores, as indicated by the concomitant variation in the maximum of emission when exciting it in different wavelengths. The fluorescence emission spectra of such mixtures are thus meaningless for detailed qualitative investigations. In such cases it is an excellent tool for quantitative analysis.

The first class of fluorophores is well distributed among all chromatographic fractions for both natural organic materials investigated (Fig. 4). What is clear is an inverse behavior of the marine DOM in relation to the SFA for the two most polar chromatographic fractions (1 and 2). A highly fluorescent material is present in these two

fractions of the SFA extract, while in the marine DOM, it is present the least fluorescent material.

All chromatographic fractions of the SFA extract show fluorescence when excited at 450 nm, but for the marine DOM, this fluorescence is present almost uniquely on the two least polar chromatographic fractions.

Synchronous

The conventional excitation spectroscopy was not a powerful tool for characterizing the chromatographic fractions, as the synchronous excitation mode, with a $\delta\lambda=18\text{ nm}$ ($\lambda_{em} - \lambda_{ex} = \delta\lambda$). Lloyd (1971)^[26] has been able to characterize traces of fluorescent material in water polluted by oils, and suggests its use in forensic investigations. The basic difference between the synchronous excitation and the conventional excitation is that in the first, the emitted light is registered synchronically (in the present work always 18 nm ahead of the excitation wavelength). Further details of the synchronous excitation spectroscopy are described in details in [27].

The synchronous excitation spectra of the marine DOM and SFA before chromatographic fractionation are shown in Fig. 5a. Five peak areas were obtained on marine DOM, but only two for the SFA.

Investigating the fluorescence of surface waters of the Adriatic, structurally similar spectra has been obtained in [28]. The authors classify the last peak area (566 nm) as newly formed fluorescent material. In our work, this fluorescent material has been isolated in the least polar of the chromatographic fractions (Fig. 5f). It should be noted that both investigations were carried out in spring, period of high phytoplanktonic growth.

The two peak areas (381 ± 4 nm and 486 ± 6 nm) obtained in the synchronous excitation spectra of the SFA before chromatographic fractionation (Fig. 5a) correspond to the first and second class of fluorophores, respectively. They show a higher fluorescence signal than their correspondents of the marine DOM. Literature data shows that independent of the origin of their fulvic acid, these compounds always showed a characteristic band at 360 nm on conventional excitation spectra [29].

After fractionation (Fig. 5b - 5f) a variety of fluorophores is seen for both the marine DOM and SFA. Apparently it is the high fluorescence of the SFA that results in the usually detected two classes only. Although the fluorescence of these two classes seems to overlap the others, two shoulders are seen in the peak area of the second class of fluorophores (Fig. 5a). These shoulders come as real peaks in the chromatographic fraction 1 (Fig. 5b). In fraction 2 (Fig. 5c), a wider variety of fluorophores is seen.

The spectra of the chromatographic fractions 3 and 4 for both classes of organic matter are very similar. Fraction 3 (Fig. 5d) shows a characteristic absorption band at $307 \text{ nm} \pm 2$, which presents a higher signal in the marine DOM than in the SFA. This may be indicative of protein-type fluorescence, as has been suggested [30]. Investigating the fluorescence of marine waters, the authors classify as humic substance-type fluorescence those presenting $\lambda_{\text{em}} 420\text{-}450$ and protein-type fluorescence at $\lambda_{\text{em}} 300\text{-}340$. The protein-type fluorescence shows that the material may be of recent biological activity, as suggested in [31].

The least polar chromatographic fraction of the marine DOM shows a band at $566 \text{ nm} \pm 1$ (Fig. 5f). A fluorophore responsible for this fluorescence may be associated with phycoerithrine, a colored

photoreceptor pigment of proteic nature present in red, blue-green and cryptomonad algae. This pigment shows an emission band at 590 nm when excited at 565 nm. The last chromatographic fraction has an emission band at 585 nm when excited at 560 nm. Investigating the fluorescence of the Black Sea, Coble and collaborators [32], conclude that the fluorescence of surface seawater is associated with the growth of microorganisms.

A selection of the fluorophores detected on both marine DOM and SFA before and after chromatographic fractionation is seen in Fig. 6. It is now clear that the high fluorescence of the already stabilised two classes of fluorophores in the SFA had overlapped all others. Although of such different origin, most of the fluorophores or fluorophore classes detected in either the the marine DOM or SFA in the present work are similar. Nevertheless, some fluorophores detected are exclusive to one sample. These are: $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 405/423 nm (chromatographic fraction 5, SFA), $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 525/543 nm (chromatographic fraction 2, SFA), $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 566/584 nm (chromatographic fraction 5, marine DOM) as detected by the synchronous excitation technique.

Acknowledgments

ATL thanks the financial support received from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and the hospitality of the Istituto di Biofisica, CNR (Pisa, Italy), where part of this work was done. The U. S. L. no. 12 (Italy) is acknowledged for making available the TOC analyser. We also thank Dr. P. J. Wangersky for critically reading the first version of the manuscript.

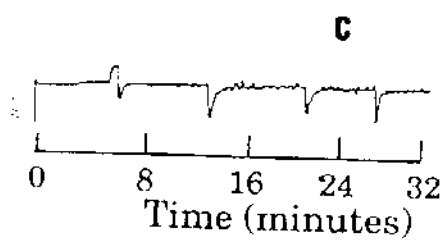
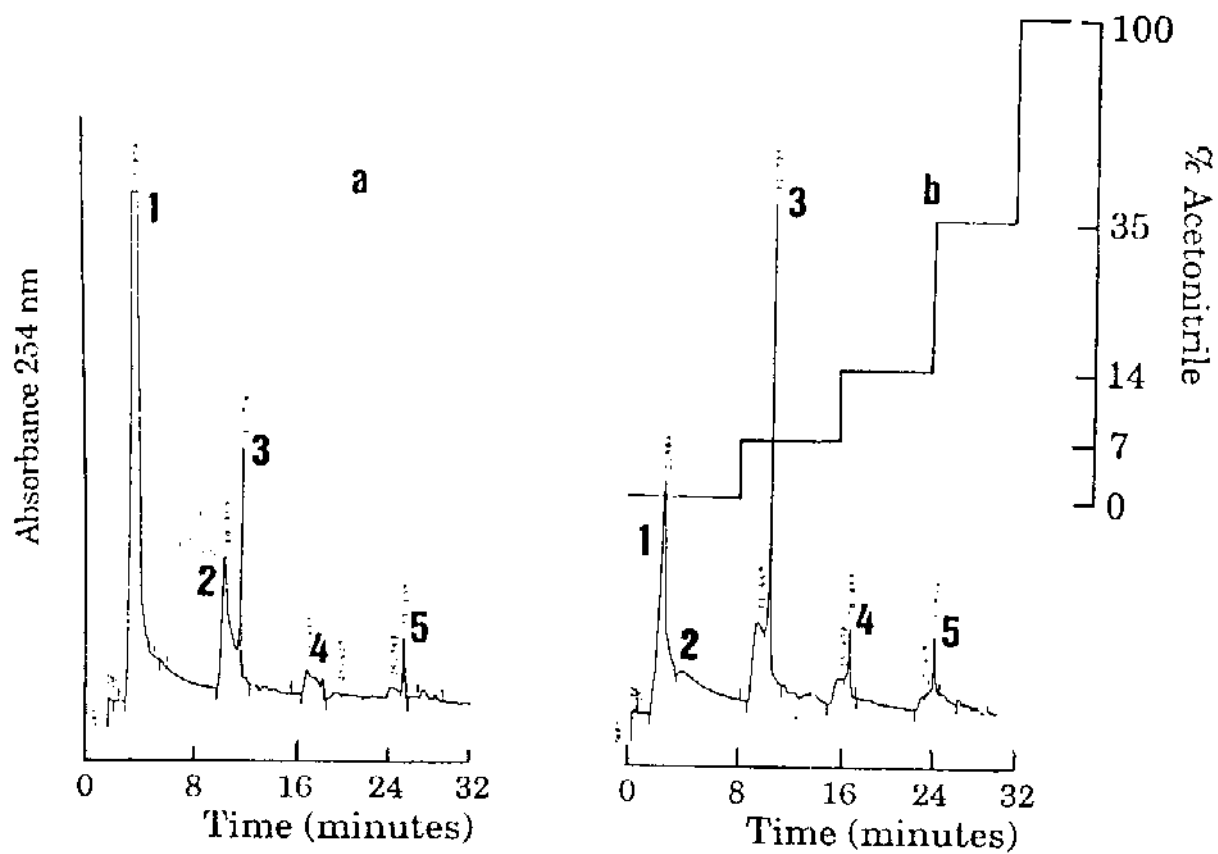
References

- [1] M. H. B. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcom and R. Swift, Structures of Humic Substances: The Emergence of 'Forms', in: M. H. B. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcom and R. Swift (Eds.) *Humic Substances II, In Search of Structure*. Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, U.K., 1989, pp. 690-733.
- [2] J. Buffle, *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*. Ellis Horwood Ltd. Chichester. U.K., 1988, pp. 90-145.
- [3] A. Momzikoff, S. Dallot and M.-D. Pizay, Blue and yellow fluorescence of filtered seawater in a frontal zone (Ligurian Sea, northwest Mediterranean Sea) *Deep-Sea Res.*, **39** (1992) 1481-1498.
- [4] J. Farrington, Macromolecular organic matter working group report. *Mar. Chem.*, **39** (1992) 39-50.
- [5] D. K. Ryan and J. H. Weber, Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacities and Stability Constants of Fulvic Acid, *Anal. Chem.* **54** (1982) 986-990.
- [6] D. E. Slauenwhite, B. D. Jonhson and P. J. Wangersky, Effect of a spring phytoplankton bloom on dissolved copper speciation in Bedford Basin, *Mar. Pollut. Bull.*, **23** (1991) 137-144.
- [7] X. Zhou and P. J. Wangersky, Study of Copper-complexing Organic Ligands: Isolation by a Sep-Pak C18 Column Extraction Technique and Characterization by Chromarod Thin-layer Chromatography, *Mar. Chem.*, **26** (1989) 21-40.
- [8] S. E. Manahan, Interactions of Hazardous-Waste Chemicals with Humic Substances, in: I. H. Suffet and P. MacCarthy (Eds) *Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. ACS, Washington, 1989, pp.83-92.

- [9] B. G. Whitehouse, The effects of dissolved organic matter on the aqueous partitioning of polynuclear aromatic hydrocarbons, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **20** (1985) 393-402.
- [10] O. F. X. Donard, M. Lamotte, C. Belin and M. Ewald, High-Sensitivity Fluorescence Spectroscopy of Mediterranean Waters using a Conventional or a Pulsed Laser Excitation Source, *Mar. Chem.*, **27** (1989) 117-136.
- [11] E. S. Cabaniss and M. S. Shuman, Synchronous Fluorescence Spectra of Natural Waters: Tracing Sources of Dissolved Organic Matter, *Mar. Chem.*, **21** (1987) 37-50.
- [12] J. E. Dorsh and T. F. Bidleman, Natural Organics as Fluorescent Tracers of River-Sea Mixing, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **15** (1982) 701-707.
- [13] M. M. De Souza Sierra and O. F. Donard, Simulation of fluorescence variability in estuaries, *Oceanologica Acta*, **11** (1991) 275-284.
- [14] W. R. Seitz, Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water, *Trends Anal. Chem.*, **1** (1981) 79-83.
- [15] S. A. Visser, Fluorescence phenomena of humic matter of aquatic origin and microbial cultures, in: R. F. Christman and E. T. Giessing (Eds.) *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, 1983, pp. 183-202.
- [16] N. Senesi, T. M. Miano, M. R. Provenzano and G. Brunetti, Characterization, Differentiation, and Classification of Humic Substances by Fluorescence Spectroscopy, *Soil Science*, **152** (1991) 259-271.
- [17] F. H. Frimmel, T. Gremm and S. Huber, Liquid chromatographic characterization of refractory organic acids, *Science Total Environ.* **117/118** (1992) 197-206.

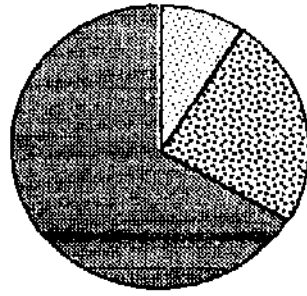
- [18] K. Hayase and H. Tsubota, Reversed-phase liquid chromatography of molecular weight-fractionated sedimentary fulvic acid, *J. Chromatography*, **295** (1984) 530-532.
- [19] G. L. Mills, E. McFadden and J. G. Quinn, Chromatographic Studies of Dissolved Organic Matter and Copper-organic Complexes Isolated from Estuarine Waters, *Mar. Chem.* **20** (1987) 313-325.
- [20] J. H. Weber and S. A. Wilson, The isolation and characterization of fulvic acid and humic acid from river water, *Water Res.* **9** (1975) 1079-1084.
- [21] A. T. Lombardi, E. Morelli, E. Balestreri and A. Seritti, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic Fractionation of Marine Organic Matter, *Environmental Technology* **13** (1992) 1013-1021.
- [22] J. B. F. Lloyd, Raman Peaks in Synchronously Excited Emission Spectra as a Reference for Purity of Fluorescence-grade Solvents, *Analyst*, **102** (1977) 782-785.
- [23] T. M. Miano, G. Sposito and J. P. Martin, Fluorescence spectroscopy of humic substances, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52** (1988) 1016-1019.
- [24] P. R. Bloom and J. A. Leenheer, Vibrational, Electronic, and High-energy Spectroscopic Methods for Characterizing Humic Substances, in: M. H. B. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcom and R. Swift (Eds.) *Humic Substances II, In Search of Structure*. Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, U.K., 1989, pp. 409-446.
- [25] J.A. Amador, P. J. Milne, C. A. Moore and R. G. Zika, Extraction of Chromophoric Humic Substances from Seawater, *Mar. Chem.*, **29** (1990) 1-17.
- [26] J. B. F. Lloyd, Synchronyzed Excitation of Fluorescence Emission Spectra, *Nature (London) Phys. Sci.*, **231** (1971) 64-65.

- [27] T. Vo-Dinh, Multicomponent analysis by Synchronous Luminescence Spectrometry, *Anal. Chem.* **50** (1978) 396-401.
- [28] J. Dujmov, P. Sucevic and B. Antolic, UV-Fluorescence Spectrophotometric Assessment and Characterization of Dissolved Fluorescent Matter in Coastal Water of the Central Adriatic, *Netherlands J. Sea Res.*, **29** (1992) 291-292.
- [29] K. Gosh and M. Schnitzer, Fluorescence excitation spectra of humic substances, *Can. J. Soil Sci.*, **60** (1980) 373-379.
- [30] P. G. Coble, C. A. Schultz and K. Mopper, Fluorescence Countoring analysis of DOC Intercalibration Experiment samples: a comparison of techniques, *Mar. Chem.* **41** (1993) 173-178.
- [31] K. Mopper and C. A. Schultz, Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components, *Mar. Chem.* **41** (1993) 229-238.
- [32] P. G. Coble, S. A. Green, N. V. Blough and R. B. Gagosian, Characterization of dissolved organic matter in the Balck Sea by fluorescence spectroscopy, *Nature*, **348** (1991) 432-435.



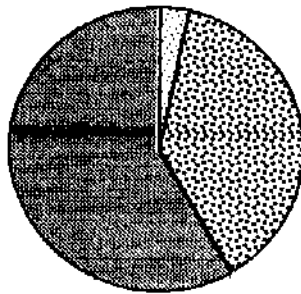
□ Marine DOM
▨ SFA
■ SFA (*)

(a)

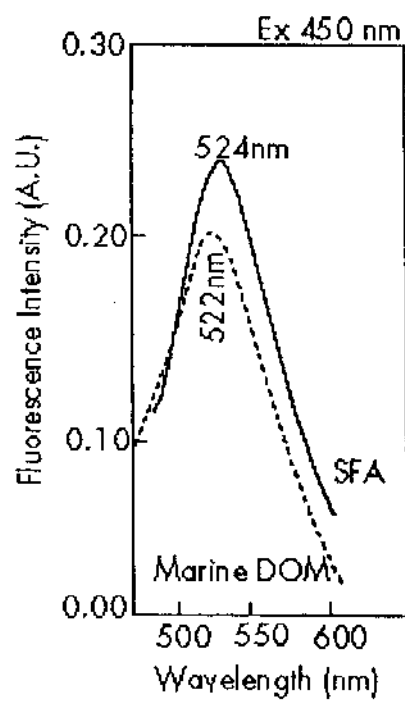
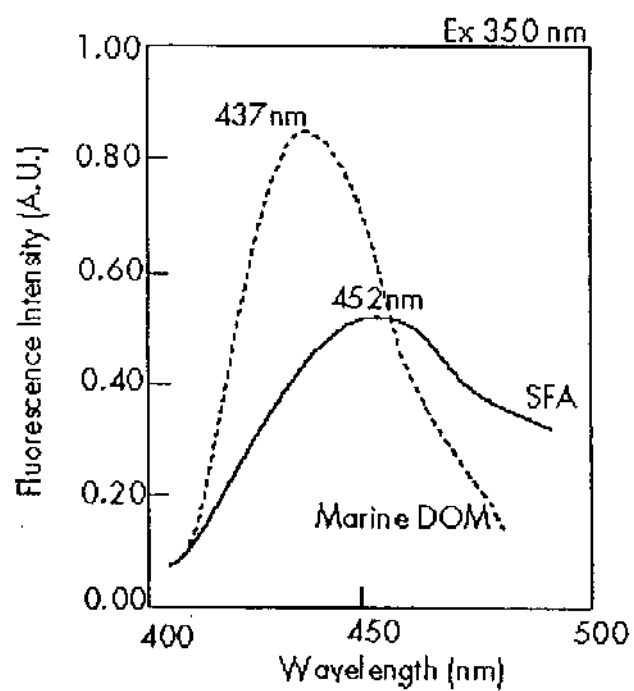


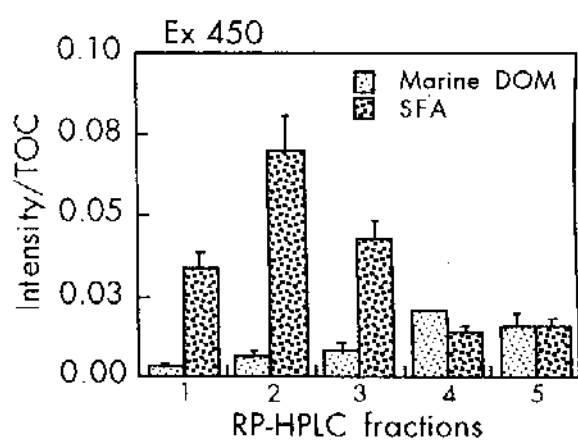
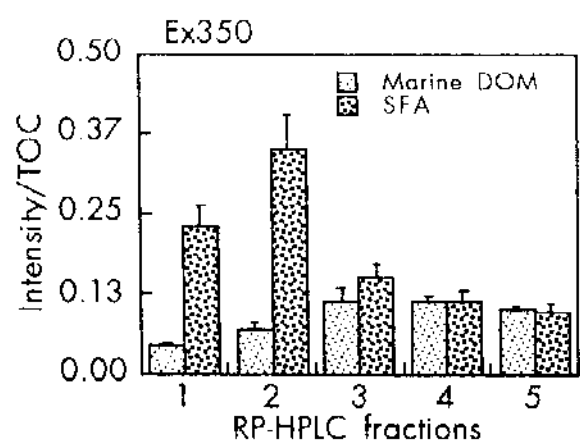
Fluorescence Intensity/TOC (Ex350)

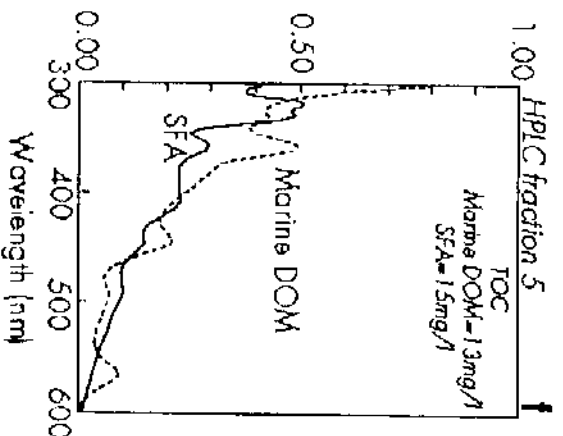
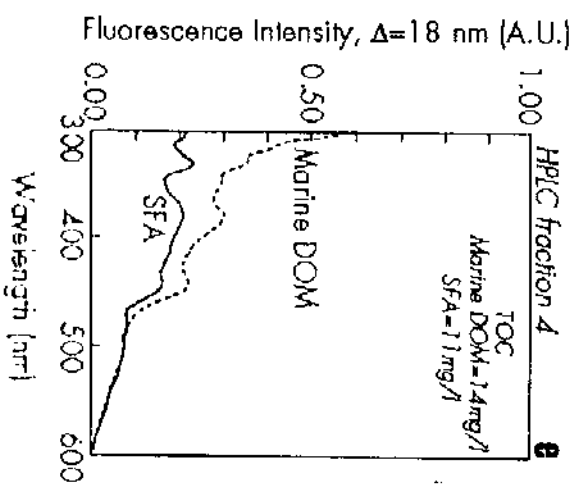
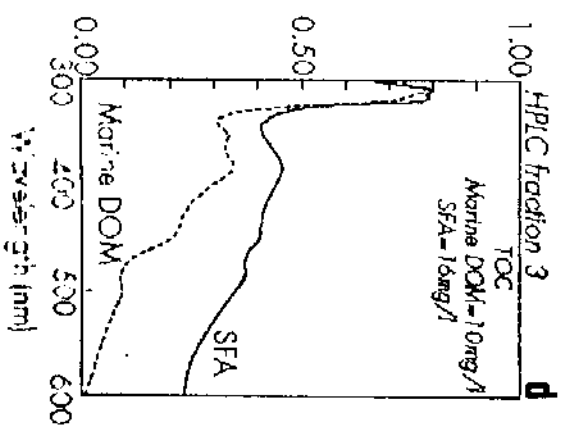
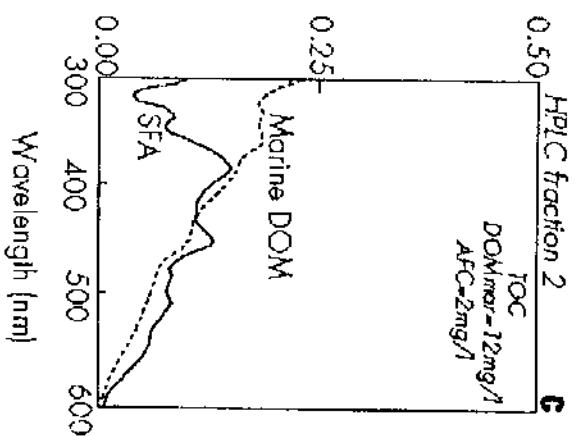
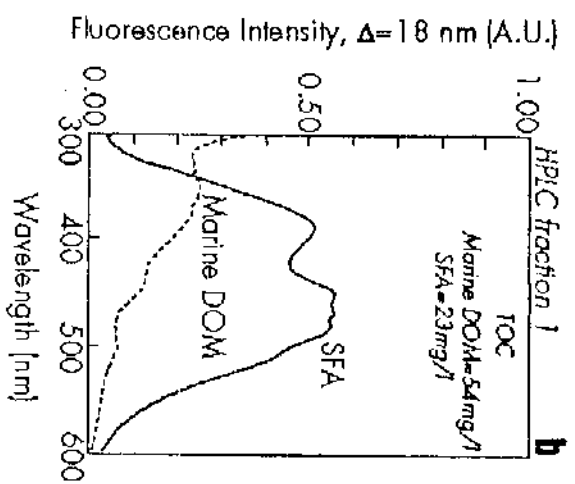
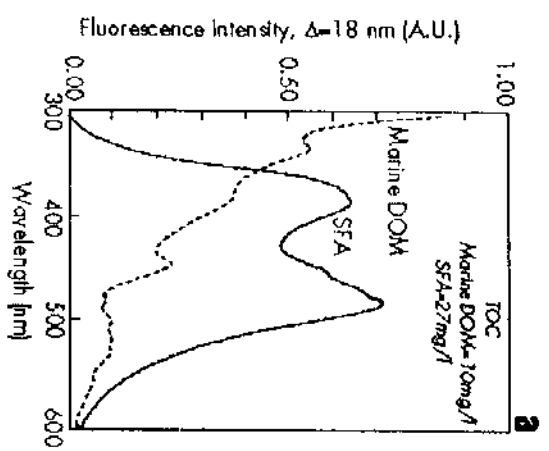
(b)



Fluorescence Intensity/TOC (Ex450)







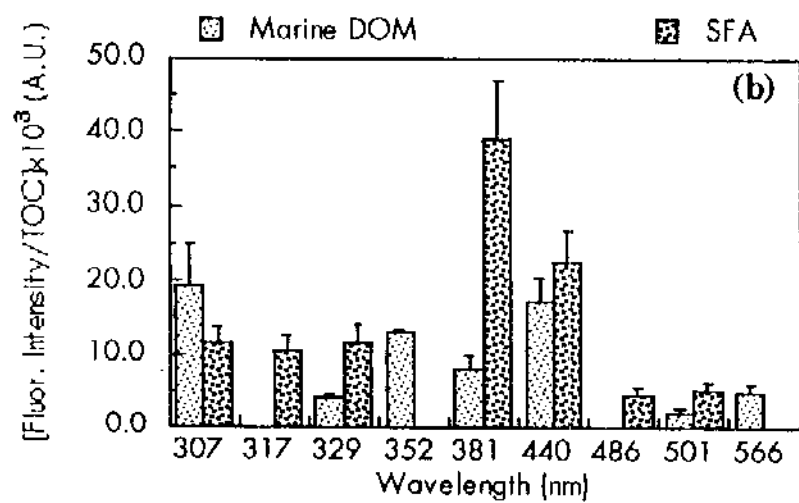
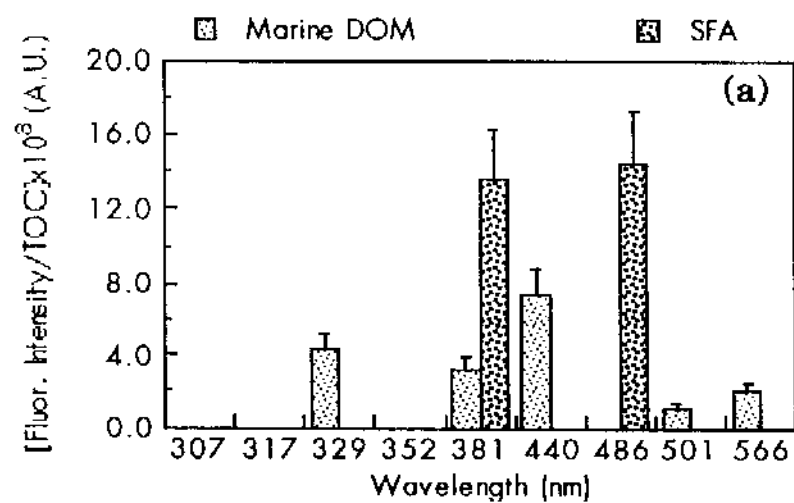


Table 1. Calibration parameters for the marine DOM. Synchronous excitation had a $\delta=18$ nm.

Method	Linear regression	
Conventional Emission ($\lambda_{ex}350$ nm)	$y = -0.0177 + 0.0089x$	$r=0.9951$
Synchronous Excitation (band 330nm)	$y = 0.0013 + 0.0276x$	$r=0.9982$
Synchronous Excitation (band 383nm)	$y = 0.0306 + 0.0114x$	$r=0.8984$
Synchronous Excitation (band 440nm)	$y = -0.0016 + 0.0179x$	$r=0.9872$
Synchronous Excitation (band 564nm)	$y = 0.0019 + 0.0032x$	$r=0.9883$

Table II. Calibration parameters for the SFA. Synchronous excitation had a $\delta = 18$ nm.

Method	Linear regression equation	
Conventional Emission ($\lambda_{\text{ex}} 350$ nm)	$y = 0.0214 + 0.0220x$	$r = 0.9997$
Synchronous Excitation (band 380nm)	$y = 0.0096 + 0.0259x$	$r = 0.9996$
Synchronous Excitation (band 465nm)	$y = 0.0014 + 0.0196x$	$r = 0.9989$

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Typical chromatograms for SFA (a), marine DOM (b), and procedural blank (c). Mobile phase: KCl:ACN ($4 \cdot 10^{-3}$ M, 2% ACN):100% ACN.

Figure 2. Conventional emission. Fluorescence intensity per unit organic carbon. Fixed excitation at 350 nm (a), and 450 nm (b). SFA (*) refers to the SFA before being passed through the Sep-Pak tC18 cartridge.

Figure 3. Conventional emission spectra showing the maximum of emission. Fixed excitation at 350 nm and 450 nm for both marine DOM and SFA. TOC: marine DOM=200 mg·l⁻¹, SFA=27 mg·l⁻¹.

Figure 4. Conventional emission. Fluorescence intensity per unit organic carbon (arbitrary units) for the chromatographic fractions. Fixed excitation at 350 nm and 450 nm for both marine DOM and SFA. Polarity of elution: fraction 1=10.11; fraction 2=10.11; fraction 3=9.80; fraction 4=9.50; fraction 5=8.60.

Figure 5. Synchronous excitation spectra for the marine DOM and SFA before (a) and after chromatographic fractionation (b, c, d, e, f). Polarity of elution: fraction 1=10.11; fraction 2=10.11; fraction 3=9.80; fraction 4=9.50; fraction 5=8.60.

Figure 6. Synchronous excitation. Fluorescence intensity per unit organic carbon for the marine DOM and SFA, (a) before chromatographic fractionation, and (b) after chromatographic

fractionation. X axis refers to absorption bands taken from the synchronous spectra. Intensity values of (b) represent the sum of those obtained for each fraction.

Copper Complexation by Naturally Occurring Organic Matter. A Multiligand Model

César R. de Oliveira*

*Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Matemática,
C.P. 676, São Carlos, SP, 13560-970 Brazil*

Ana T. Lombardi and Wilson F. Jardim

*Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Química Analítica,
C.P. 6154, Campinas, SP, 13081-970 Brazil*

January 9, 1995

*Correspondence author.

Abstract

Extending the fluorescence quenching single-ligand model of Ryan-Weber, a multiligand model that does not require a direct measurement of the free metal ion concentration is proposed. It is shown that the problem of inconsistent negative ligand concentrations, commonly predicted by single-ligand models, may be overcome by using multiligand models. Finally, particular results concerning the conditional stability constants and ligand concentrations for one-, two- and three-ligand cases are presented for soil fulvic acid, both before and after reverse phase HPLC fractionation.

1 Introduction

The understanding of some physical-chemical properties of natural organic matter, usually referred as humic and fulvic acids, is very important due to their ability to buffer toxic metals in the environment. Metal complexation can increase the mobility of toxic metal ions and control the proportion of metal ions used as nutrients by microorganisms as well. Complexation may also increase the exchange of toxic metals at the interface solid/aqueous phase of natural mineral sites.

A direct method for studying the metal binding properties of dissolved organic matter was proposed by Ryan and Weber (RW)^[1]. The method models the fluorescence quenching of humic substances by a paramagnetic metal ion such as Cu(II). Other models have also been proposed, e.g., a multiligand model used by Holm^[4, 5] and the Perdue and Lytle^[2] model which assumes that the ligand concentrations are normally distributed in respect to the logarithm of the stability constant. See Sposito^[6] for a review of related models.

An adaptation of the RW model to include multiligands was reported in Ref.^[7]; however, the final result was an equation identical to the single-ligand model, except that the one-ligand stability constant was replaced by an "average stability product." In the present work a modification of the original RW model is proposed in order to include multiligands with 1:1 complex formation. A difficulty we have faced, is that the obtained equation does not seem amenable to standard numerical regression methods needed to calculate the parameters of interest, i.e., stability constants and the concentrations of

binding ligands. In the second half of *Section 2* an approach is indicated to solve this problem.

The aims of this work can be summarized as follows.

(i) Presenting a multiligand generalization of the RW 1-ligand model, and to show how the parameters of interest can be estimated.

(ii) Showing that the problem of negative ligand concentration values (so common in 1-ligand fittings^[5, 8, 9, 10, 11, 13]) may be overcome by using multiligand models.

(iii) Comparing the results of N -ligand cases with $N = 1, 2$ and 3 , for some experimental data.

2 Theory

The measured fluorescence intensity I is the sum of the fluorescence of the free ligands and the bound ligands in the sample. The maximum fluorescence signal will be normalized to 100 and the minimum fluorescence IML is obtained from a titration curve. Experimental conditions are set in a way that metal complexation by inorganic ligands and hydrolysis are considered negligible.

The basic parameters of interest are the i th ligand concentration CL_i , and the corresponding conditional stability constants at given experimental conditions

$$K_i = \frac{[ML_i]}{[M][L_i]} \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (2.1)$$

where N is the number of different ligands, $[M]$ is the free metal concentra-

tion, $[ML_i]$ the concentration of metal bound to the i th ligand and $[L_i]$ the total concentration of uncomplexed i th ligand.

Mass balances are given by

$$CM = [M] + \sum_{i=1}^N [ML_i] \quad (2.2)$$

$$CL_i = [L_i] + [ML_i] \quad (2.3)$$

here CM is the total metal ion concentration.

By combining 2.1 and 2.3

$$[ML_i] = \frac{[M] K_i CL_i}{1 + [M] K_i}. \quad (2.4)$$

The fundamental hypothesis usually made when using fluorescence measurements is that quantum efficiencies do not depend on the ligand and that they vary linearly with binding. In the case of titration of fulvic acids with Cu(II) the quantum efficiencies has been found to vary linearly with metal concentrations up to 3×10^{-5} M^[12, 14]. Under the above hypotheses

$$\frac{100 - I}{100 - IML} = \frac{\sum_{i=1}^N [ML_i]}{\sum_{i=1}^N CL_i}$$

with, as already anticipated, I being the measured fluorescence intensity. In what follows we shall make use of the relative fluorescence χ defined by

$$\chi = \frac{100 - I}{100 - IML}.$$

From 2.2

$$[M] = CM - \sum_{i=1}^N [ML_i] = CM - \chi \sum_{i=1}^N CL_i.$$

after substituting this expression into 2.4 and making some simple manipulations one obtains the *main equation*

$$\chi = \left(\frac{CM}{\sum_{i=1}^N CL_i} - \chi \right) \left(\sum_{j=1}^N \frac{K_j CL_j}{1 + K_j (CM - \chi \sum_{i=1}^N CL_i)} \right). \quad (2.5)$$

Notice that for $N = 1$ this equation is reduced to the original RW model^[1].

The main equation describes the titration of a metal ion as a function of stability constants and ligand concentrations in the medium. By using fluorescence intensity I (or the corresponding χ) and metal ion concentration CM one should be able to estimate the best K_i and CL_i values from 2.5.

For $N = 1$ the parameters K_1 and CL_1 can be calculated from curve fitting by standard nonlinear regression methods. Notice that the main equation is an implicitly function of χ for large N ; below it is described an approach to estimate K_i and CL_i by means of the main equation.

From the titration curve a nonlinear fitting with $N = 1$ is applied to obtain the value of IML and then the χ values are calculated. Now consider the function

$$G(CM, \chi) = \left| \chi - \left(\frac{CM}{\sum_{i=1}^N CL_i} - \chi \right) \left(\sum_{j=1}^N \frac{K_j CL_j}{1 + \chi \sum_{i=1}^N CL_i} \right) \right|$$

($|x|$ denotes the absolute value of x). If the ν experimental pair of points are given as (CM_m, χ_m) , $m = 1, 2, \dots, \nu$, the best K_i and CL_i values are estimated as the values such that the error function

$$E(K_i, CL_i) \doteq \sum_{m=1}^{\nu} G(CM_m, \chi_m)$$

attains its minimum. Certainly, the ideal case is $E = 0$.

Since E is a rather involved function of the parameters K_i and CL_i , we have found the standard numerical routines^[15] were not able to minimize E ; one is then forced to try an alternative way to compute its minimum, such as to estimate it from direct evaluations. First fix a wide range of K_i and CL_i values, choose an arbitrary point in this domain, say $K_{i,0}$ and $CL_{i,0}$, $i = 1, 2, \dots, N$, and calculate $E(K_{i,0}, CL_{i,0})$. Then another point $K_{i,1}$ and $CL_{i,1}$ is selected at random (with uniform distribution) in those ranges and $E(K_{i,1}, CL_{i,1})$ compared with $E(K_{i,0}, CL_{i,0})$: discard the point with larger error function value and, if necessary, rename the other as $K_{i,0}, CL_{i,0}$. Repeat this loop several times. Then change properly the ranges of K_i and CL_i values and again repeat the whole procedure.

After a sufficiently large number of iterations this procedure should find a good approximation for the best fit values of K_i and CL_i . The final step is performed by fixing the found K_i and CL_i , except K_1 , and plotting E as a function of K_1 in a neighborhood of the candidate for K_1 , and graphically check if a minimum has actually been found. Then verify that E has a minimum near the candidate for CL_1 by plotting it against CL_1 with the found $K_1, K_2, CL_2, \dots, K_N, CL_N$ fixed, and so on.

The above described method has succeeded in finding minimum values of the error function E . In order to test the method, it was applied to the case $N = 1$ and the results compared to the values obtained from nonlinear regression: the agreement was excellent. In *Section 4* this procedure is applied to some experimental data with $N = 1, 2$ and 3 . We remark that all numerical calculations were done on a microcomputer (Macintosh Quadra 840AV).

3 Experimental Section

A well characterized soil fulvic acid (SFA) was gently provided by Prof. J. H. Weber from the Department of Chemistry of the University of New Hampshire, USA. Details of its isolation, extraction and characterization procedures are described elsewhere^[17].

In the present investigation, the SFA has been fractionated by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) as described in^[13] using a KCl:acetonitrile as part of the mobile phase instead of sodium acetate:acetonitrile. KCl (Suprapur grade, Merck, Germany) was used at a concentration of 4×10^{-3} M and added 2% acetonitrile. All other conditions as well as the RP-HPLC equipment were the same as described in^[18].

As part of a broader project which investigates the complexing properties of seawater, the SFA was processed in a similar way as the marine samples, to make possible any future comparison. The isolation procedure consisted of passing a solution of SFA (0.1 mg.l^{-1}) through a conditioned Sep-Pak tC18 cartridge. The conditioning procedure is described in^[19]. A seawater sample poor in fluorescent organic matter was used as base for dissolving the SFA and also for procedural blank to be used in the chromatographic fractionation. Organic matter removal was obtained by acidifying it to pH 3 with HCl (Suprapur grade, Merck, Germany), passing through two Sep-Pak tC18 cartridges, and then submitted to U.V. irradiation (1 kW) for 9 to 10 hours in Teflon capped quartz tubes.

After treating the SFA solution through the Sep-Pak tC18, the cartridge was washed with 20 ml of Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA)

to remove salts. The retained SFA was eluted with a solution of methanol (HPLC grade, J. T. Baker):H₂O, 85:15 (v/v). The eluate was then freeze dried. The dried sample (SFAsp) was then resuspended in 1 ml of 4×10^{-3} M KCl, filtered through 0.45 μ m membrane filter (Sartorius) and finally injected into the HPLC system for the chromatographic fractionation. Four fractions of differing elution polarity were collected and freeze dried. Each of these fractions were considered as independent samples and titrated with copper and the fluorescence quenching monitored.

SFA1 refers to the first chromatographic fraction and the most polar one, having a polarity of 10.11. SFA3 corresponds to the third chromatographic fraction and its polarity is 9.80. SFA4, the fourth chromatographic fraction, presents a polarity of 9.50. The last and least polar of all chromatographic fractions is the sample referred as SFA5. Its polarity has been calculated to be 8.60.

All laboratory material was washed with 3M HNO₃ and then left in a solution of 0.8M of HNO₃ until use. All material was rinsed with Milli-Q water immediately before use. The fluorescence quenching measurements were performed in quartz cuvetes first washed with alcohol (BDH Ltd., Poole, England) and rinsed with Milli-Q water to remove organic matter, washed twice with 6M HNO₃ (Analytical grade, Fluka Chemie) to remove metal and finally rinsed with Milli-Q water.

Due to its low copper complexing capacity,^[20] HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, high purity, Fluka Chemie, Switzerland) was used as a buffering agent in all titration experiments. The utilization

of HEPES in fluorescence quenching has been suggested by Ventry, et al., (1991), once it does not interfere on the fluorescence measurements.

The ionic strength was adjusted to $1.5 \times 10^{-2}\text{M}$ with KCl (Suprapur, Merck). During titration the pH was kept at 7.00 ± 0.05 (Standard pH meter, model pHm82-Radiometer, Copenhagen) and whenever necessary it was adjusted with either NaOH (Carlo Erba) or HCl (Merck) diluted and filtered solutions ($0.45\mu\text{m}$ membrane filters, Sartorius).

A 10^{-2}M copper ion stock standard solution was prepared using the nitrate salt (BDH Ltd., England) in Milli-Q water and adjusted to pH 4. Daily use copper solutions were prepared from the stock and filtered through $0.45\mu\text{m}$ membrane filters (Sartorius), and used throughout. These ranged from 10^{-5}M to 10^{-3}M of copper concentration.

A Jasco spectrofluorometer (mod. FP 770) was used in fluorescence measurements. Fluorescence values were measured at the maximum emission (450 nm) with excitation at 350 nm. The excitation and emission monochromators were set to 5 and 10 nm respectively. Scatter was followed by Rayleigh measurements at 450 nm excitation wavelength. As suggested in,^{1, 7} when scattering value had doubled over the initial metal-free reading it was assumed that precipitation or aggregate formation had begun, thus any experimental point at higher metal concentrations was not used in the calculations. Working temperature was kept at $21 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Total organic carbon (TOC) was analyzed in all samples and a concentration of approximately 5 mg.l^{-1} was present in the titration cell. For this purpose a Dohrmann DC-190 TOC analyzer was used.

4 Results and Discussion

In Table 1 the average values of the stability constants and N -ligand concentrations are presented for $N = 1, 2$ and 3 . The presented errors are standard deviations from three replicas. The inconsistent values, i.e., with negative ligand concentrations, are referred as 'inconsistent;' this phenomenon has been found only under the hypotheses of $N = 1$ (recall that in this case the parameters were also computed by direct nonlinear fitting of the data). In what follows we shall take into account the ANOVA and Scheffé's Multiple Contrast Test^[16] performed at a significance level of 0.1 , whose results are also summarized in Table 1. It is assumed that $K_1 \leq K_2 \leq K_3$.

In Figure 1 a typical titration curve is presented, as well as the 1-ligand model curve using the best fitting parameters. In Figure 2 an example of the error function $E(K_i, CL_i)$, defined in *Section 2*, is presented: its minimum is for the estimated values of K_i, CL_i . For $N = 2$ four of such plots have to be checked and, for $N = 3$, six plots.

There have been some controversies about the nature of negative CL values: it has been attributed to (i) very small ligand concentration,^[8, 9, 11] (ii) insufficient number of titration points to get a proper convergence fitting,^[8, 9, 10] (iii) questions related to the numerical technique employed,^[11] (iv) the possibility of strong covariance among the fitting parameters,^[12, 13] and also (v) the necessity of multiligand models^[4, 5]. Figure 3 supports the latter explanation: it shows four 1-ligand curves, with fitting parameters $(K_1, CL_1), (K_2, CL_2), (K_3, CL_3)$ obtained from our 3-ligand model and the "unphysical" parameters from 1-ligand fitting where $K = 6.76 \times 10^4$ and $CL =$

-1.16×10^{-5} . All curves were plotted using $IML = 39.6$. For small total metal concentrations the “unphysical” curve closely follows the curves with larger values of K , i.e., K_3 and K_2 ; however, for large total metal concentrations it approximates the curve with the smallest stability constant, i.e., K_1 . This behavior has been observed in all cases with inconsistent CL values that we have checked. Although it strongly indicates the failure of single-ligand models to describe such titration curves, the 1-ligand model visually fits quite well the experimental data, even if inconsistent parameter values take place.

It is outstanding how the SFA-sample can be very well described by a single-ligand model, since the 2- and 3-ligand models reproduce the 1-ligand stability constant, and the ANOVA test indicates that also the ligand concentrations do not change with increasing number of ligands, as it is shown in Table 1. On the other hand, although the SFA1-sample does not lead to inconsistent CL value for 1-ligand model it should be described by N -ligand models with N at least equal to 2. The single-ligand model seems useless for SFAsp, SFA3, SFA4 and SFA5, since the found stoichiometric concentrations were negative in those cases. For the samples SFA3 and SFA4 at least 3-ligand models should be used, and for SFAsp and SFA5 2-ligand models seem to be adequate.

Notice that the CL variability from sample to sample is relatively small, maybe this is due to the fact that each sample represents, in some way, a part of the total SFA.

5 Conclusions

A multiligand adaptation of the RW single-ligand model was proposed. It enabled a multiligand study of the metal binding properties of dissolved organic matter, with 1:1 complex formation, that does not require a direct measurement of the free metal ion concentration. Unlike the single-ligand case, the (K, CL) parameters in the multiligand model are difficult to be estimated by standard numerical routines and, taking advantage of the power of current microcomputers, a procedure based on direct evaluation of the error function is proposed. Its application to some experimental data showed that the problem of negative ligand concentrations, commonly found in the single-ligand case, may be overcome by using multiligand models.

Simple inspection of the titration curve does not seem to be enough to predict the minimum number of ligands necessary to describe the metal complexation. Different possibilities can occur: samples very well described by single-ligand models; samples with nonnegative single-ligand CL values but that require at least 2-ligand models to be characterized; samples with negative single-ligand CL values that are well characterized by 2-ligand models, and those requiring at least 3-ligand models.

The model here described is being used as a tool to study the complexation properties of marine dissolved organic matter fractionated according to its polarity, as indicated in *Section 3* of the present work. These results will appear in a future publication.

Acknowledgments

CRO thanks the computing facilities supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) under contract 93/2853-5. ATL thanks the hospitality of Istituto di Biofisica, CNR, Pisa, Italy, where part of this work was done, and CNPq (Brazil) for financial support. We thank Prof. J. H. Weber for providing us a well characterized soil fulvic acid.

References

- [1] Ryan, E. K.; Weber, J. H. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 986-990.
- [2] Perdue, E. M.; Lytle, C. R. *Environ. Sci. Technol.* **1983**, *17*, 654-660.
- [3] Fish, W.; Dzombak, D. A.; Morel, F. M. M. *Environ. Sci. Technol.* **1986**, *20*, 676-583.
- [4] Holm, T. R. *Chem. Spec. Bioavail.* **1990**, *2*, 63-76.
- [5] Holm, T. R.; Barcelona, M. J. In *Ground Water Geochemistry Conference*; National Water Well Association and Water Well Journal Publishing Co.: Denver, 1988; pp 245-266.
- [6] Sposito, G. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* **1986**, *16*, 193-229.
- [7] Ryan, E. K.; Weber, J. H. *Environ. Sci. Technol.* **1982**, *16*, 866-872.
- [8] Berger, P.; Ewald, M.; Liu, D.; Weber, J. H. *Mar. Chem.* **1984**, *14*, 289-295.

- [9] Ryan, D. K.; Thompson, C. P.; Weber, J. H. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 1505-1509.
- [10] Ryan, D. K.; Ventry, L. S. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1523-1526.
- [11] De Souza Sierra, M. M., *Caracterisation et Réactivation de la Matière Organique Fluorescente Dissoute Dans des Milieux Côtiers et Marins*, Thèse, L'Université de Bordeaux I, 1992.
- [12] Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 398-401.
- [13] Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2418-2421.
- [14] Saar, R. A.; Weber, J. J. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2095-2100.
- [15] Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T. *Numerical Recipes in C*, Cambridge University Press, Cambridge, 1988.
- [16] Zar, J. H. *Biostatistical Analysis*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1984.
- [17] Weber, J. H.; Wilson, *Water Res.* **1975**, *9*, 1079.
- [18] Lombardi, A. T.; Morelli, E.; Ballestreri, E.; Seritti, A. *Environ. Technol.* **1992**, *13*, 1013-1021.
- [19] Mills, G. L.; McFadden, E.; Quinn, J. G. *Mar. Chem.* **1987**, *20*, 313-325.
- [20] Good, N. E.; Winget, G. D.; Winter, W.; Connolly, T. N.; Izawa, S.; Singh, K. M. M. *Biochemistry* **1966**, *3*, 467-477.

Figure Captions

Figure 1

Titration curve (o) of a SFA replica. The dashed line is the 1-ligand theoretical curve with (K, CL) values obtained from nonlinear best fitting. Here $IML = 9.13$, $K = 2.34 \times 10^5$, $CL = 1.55 \times 10^{-5}$.

Figure 2

The Error Function for a replica of SFA5. K_i and CL_i are kept fixed and equal to the best fitting values, but CL_3 that covers a range containing the candidate for the the minimum of $E(K_i, CL_i)$ (here $CL_3 = 1.39 \times 10^{-6}$). This graphical test has to be done for each value of K_i and CL_i .

Figure 3

Comparison of theoretical 1-ligand curves for different (K, CL) values taken from the best fittings for one replica of SFA3: full line, 1-ligand model ($K = 6.76 \times 10^4$ and $CL = -1.16 \times 10^{-5}$). The other curves for (K_i, CL_i) from the multiligand model 2.5, with $N = 3$: (K_1, CL_1) ; - - - - (K_2, CL_2) ; - - - - (K_3, CL_3) . In all cases $IML = 39.6$.

Table Caption

Table 1

K and CI values obtained with the one-, two- and three-ligand model simulations in (base 10) logarithmic scale. SD indicates Standard Deviations from the mean of triplicate values. On the last line of each row the statistically significant differences obtained from ANOVA and Scheffé's tests are presented. 'inconsistent' stands for predicted negative ligand concentration.

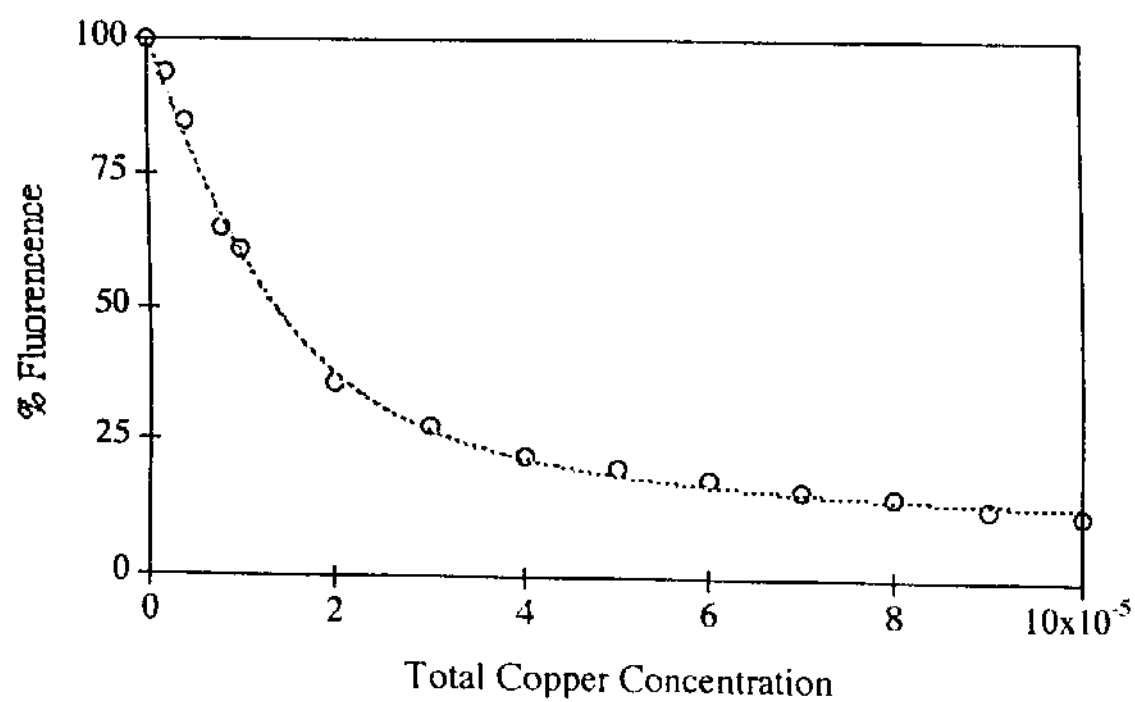


Figure 1

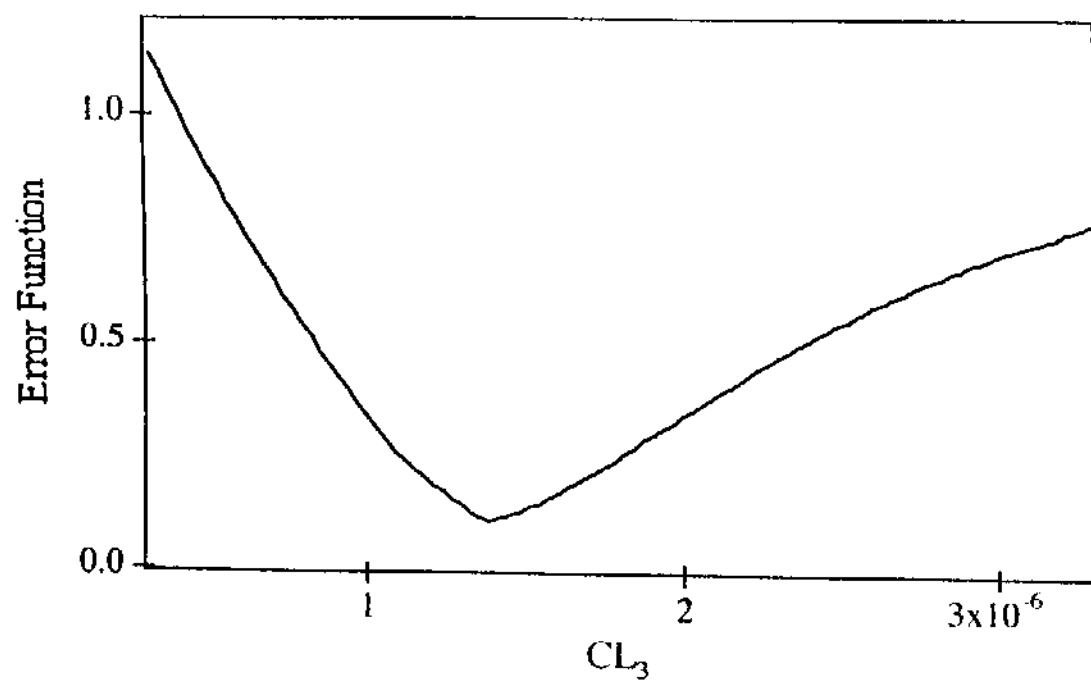


Figure 2

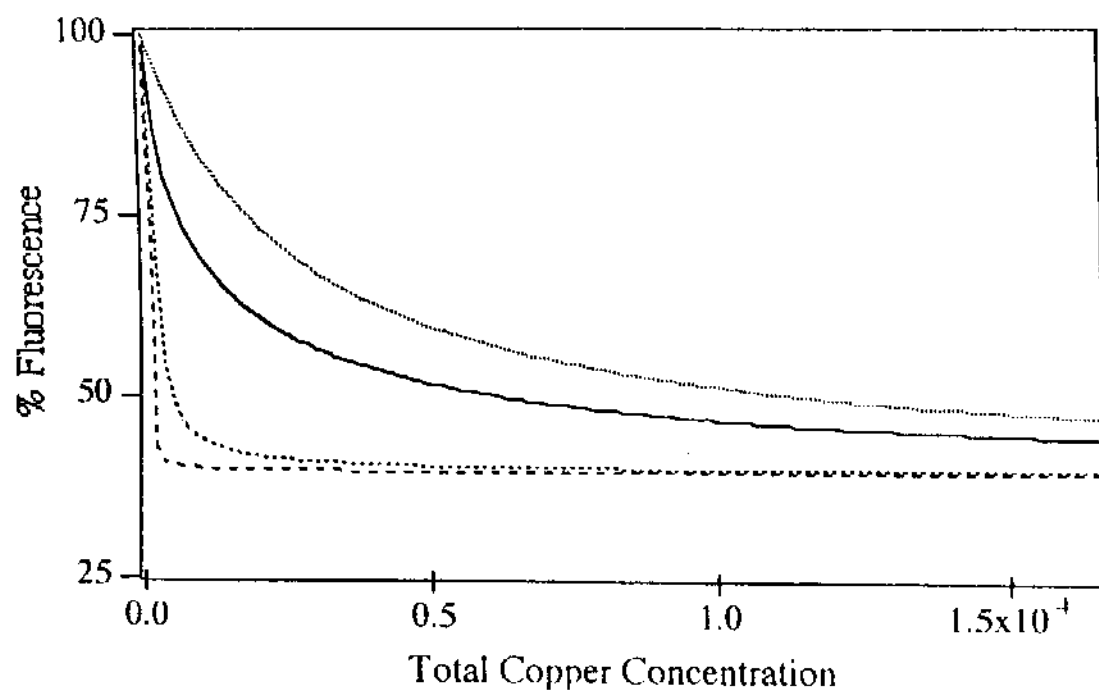


Figure 3

Sample	1-Ligand Model		2-Ligand Model		3-Ligand Model	
	$K \pm SD$ (log)	$CL \pm SD$ (log)	$K_i \pm SD$ (log)	$CL_i \pm SD$ (log)	$K_i \pm SD$ (log)	$CL_i \pm SD$ (log)
SFA	5.51 ± 0.12	-4.74 ± 0.07	5.41 ± 0.14 5.41 ± 0.14	-4.96 ± 0.22 -5.70 ± 1.0	5.46 ± 0.12 5.49 ± 0.06 5.57 ± 0.02	-5.69 ± 0.95 -5.26 ± 0.79 -6.81 ± 1.21
	(ANOVA) $\rightarrow$		$K_1 = K_2$	$CL_1 = CL_2$	$K_1 = K_2 = K_3$	$CL_1 = CL_2 = CL_3$
SFA _{sp}	inconsistent		4.70 ± 0.13 5.49 ± 0.14	-6.11 ± 0.87 -6.06 ± 1.00	4.63 ± 0.23 5.47 ± 0.46 5.57 ± 0.64	-5.51 ± 0.18 -5.76 ± 0.55 -6.04 ± 0.59
	(ANOVA) $\rightarrow$		$K_1 \neq K_2$	$CL_1 = CL_2$	$K_1 \neq K_2 = K_3$	$CL_1 = CL_2 = CL_3$
SFA1	5.24 ± 0.03	-5.41 ± 0.11	4.80 ± 0.06 5.50 ± 0.10	-5.88 ± 0.17 -5.29 ± 0.04	4.80 ± 0.06 5.47 ± 0.18 6.30 ± 0.76	-5.55 ± 0.08 -5.99 ± 0.28 -5.60 ± 0.59
	(ANOVA) $\rightarrow$		$K_1 \neq K_2$	$CL_1 \neq CL_2$	$K_1 \neq K_2 = K_3$	$CL_1 = CL_2 = CL_3$
SFA3	inconsistent		4.54 ± 0.02 5.70 ± 0.14	-5.91 ± 0.04 -5.88 ± 0.08	4.63 ± 0.0 6.18 ± 0.01 7.12 ± 0.17	-5.53 ± 0.05 -5.78 ± 0.11 -6.36 ± 0.27
	(ANOVA) $\rightarrow$		$K_1 \neq K_2$	$CL_1 = CL_2$	$K_1 \neq K_2 \neq K_3$	$CL_1 \neq CL_2 \neq CL_3$
SFA4	inconsistent		4.62 ± 0.05 4.80 ± 0.10	-6.50 ± 0.30 -6.58 ± 0.09	4.66 ± 0.06 5.58 ± 0.25 6.28 ± 0.16	-6.11 ± 0.46 -6.66 ± 0.23 -6.58 ± 1.06
	(ANOVA) $\rightarrow$		$K_1 \neq K_2$	$CL_1 = CL_2$	$K_1 \neq K_2 \neq K_3$	$CL_1 = CL_2 = CL_3$
SFA5	inconsistent		4.65 ± 0.10 5.69 ± 0.07	-7.43 ± 0.24 -7.57 ± 0.32	4.71 ± 0.03 5.92 ± 0.39 6.37 ± 0.16	-6.10 ± 0.77 -6.22 ± 0.45 -6.28 ± 0.60
	(ANOVA) $\rightarrow$		$K_1 \neq K_2$	$CL_1 = CL_2$	$K_1 \neq K_2 = K_3$	$CL_1 = CL_2 = CL_3$

Table 1