

## Utilização da ultrafiltração em fluxo tangencial na determinação das constantes de troca entre substâncias húmicas e íons Cu(II)

Luciane Pimenta Cruz Romão<sup>1</sup>

Julio Cesar Rocha<sup>2</sup>

### R E S U M O

Um procedimento de ultrafiltração com fluxo tangencial e membrana polietersulfônica de porosidade 1 kDa foi utilizado para determinar constantes de troca entre metais originalmente complexados por substâncias húmicas e íons cobre(II) adicionados. Resultados de experimentos de troca entre íons Cu(II) adicionados e espécies metálicas (Ni, Al e Fe) originalmente complexadas por substâncias húmicas, permitiram estabelecer a seguinte ordem decrescente de estabilidade relativa do complexo SH-metal: Fe < Al < Ni. A caracterização das substâncias húmicas foi feita pelas razões molares C/N e H/C, as quais indicaram maior humificação e aromaticidade da matéria orgânica presente nas amostras aquáticas que nas amostras de solo, e pela espectroscopia na região do infravermelho, a qual apresentou espectros com bandas largas, comuns nos espectros de substâncias húmicas, atribuídas às superposições de absorções individuais e similaridades entre os grupos funcionais presentes nas estruturas das substâncias húmicas aquáticas e de solos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ultrafiltração em Fluxo Tangencial, Constantes de Troca, Cobre

## 1. INTRODUÇÃO

Substâncias húmicas (SH) são os principais constituintes da matéria orgânica natural (MON) globalmente distribuídos em ambientes terrestres e aquáticos. Estima-se que cerca de 50% do carbono orgânico dissolvido (COD) em águas superficiais e oceânicas consistem de matéria orgânica refratária do tipo SH [1,2].

A interação com espécies metálicas no ambiente é uma importante propriedade das SH, a qual poderá resultar em reações de complexação e/ou redução. As reações de complexação de metais são mais conhecidas por influenciar na biodisponibilidade dessas espécies. Atuando como tampões metálicos em ambientes aquáticos, as SH têm a propriedade de reduzir a toxicidade de alguns metais (ex.  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ ) para organismos aquáticos, incluindo peixes [3,4,5].

A formação de complexos organometálicos em solos pode influenciar nos ciclos biogeoquímicos. As SH podem aumentar a disponibilidade de fosfatos minerais insolúveis através da complexação de Fe e Al em solos ácidos e Ca em solos calcários [6].

Diferentemente dos complexantes ou ligantes simples ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , aminoácidos), as substâncias húmicas contém vários sítios complexantes por molécula, resultando alta estabilidade termodinâmica dos complexos formados, alterando sobremaneira a forma química (especiação) do metal em solução [7]. A capacidade de formar complexos com metais é devida principalmente, do alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio, os quais incluem carboxílicos, fenólicos, enólicos e alcoólicos.

Diversas técnicas têm sido utilizadas no estudo de complexação de metais por MON, dentre as quais se pode citar a voltametria [8,9,10]; potenciometria [11,12,13]; ultrafiltração [14,15] e cromatografia [16]. Todas essas técnicas possuem vantagens e limitações [17,18,19,20].

A escolha de um método para especiação química influencia os resultados encontrados, pois os vá-

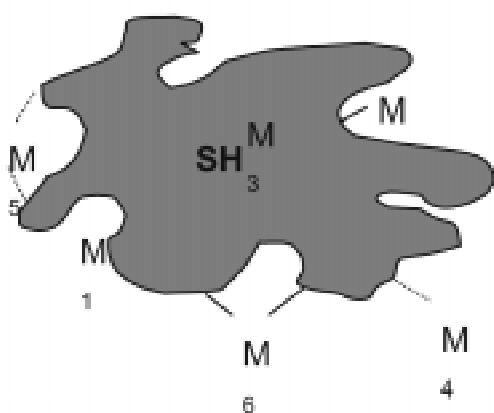
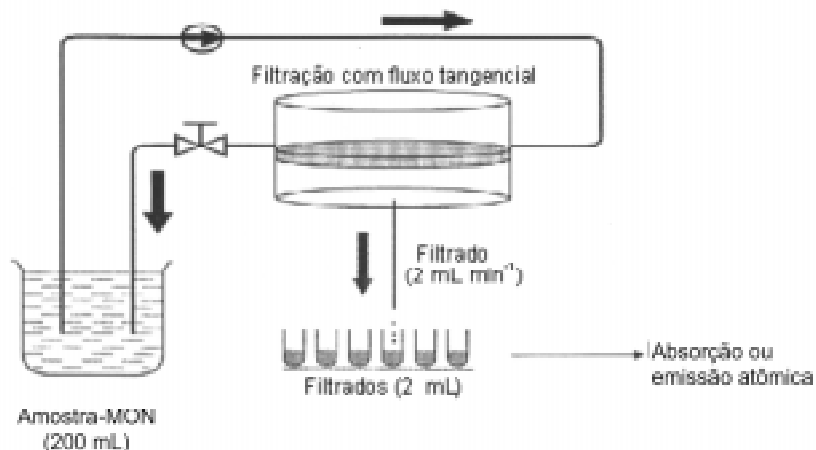
rios métodos medem aspectos diferentes do sistema e operam sob condições diferentes.

A ultrafiltração (UF) é um dos métodos citados na literatura para extrair e concentrar substâncias húmicas aquáticas [21]. Este procedimento também tem sido empregado para fracionar a matéria orgânica em diferentes tamanhos moleculares. Os solutos dissolvidos são separados por membranas de acordo com o tamanho molecular [22,23,24,25]. É um procedimento barato, versátil, não destrutivo e sem adição de reagentes, minimizando a possibilidade de alterações na amostra original [26].

Burba et al. (2001) [27], desenvolveram um procedimento de ultrafiltração em fluxo tangencial e simples estágio (UF-FT) capaz de discriminar a concentração do metal livre (Figura 1). O sistema UF-FT comparado com o UF convencional apresenta vantagens como trabalhar com sistemas abertos, redução de efeitos da polarização e/ou entupimento das membranas; menor volume do filtrado diminuindo o tempo de filtração e minimizando deslocamentos no equilíbrio da solução, além da maior rapidez na filtração (cerca de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ ).

Esse procedimento de ultrafiltração em fluxo tangencial é capaz de fornecer informações termodinâmicas ou cinéticas, as quais caracterizam as espécies metálicas ligadas à matéria orgânica pela utilização de reações de troca de ligante e/ou de metal, de acordo com o esquema da Figura 2.

Os coeficientes de retenção  $R_x$  ( $X = M, L$  ou  $ML$ ) são parâmetros importantes na utilização da ultrafiltração para determinar a capacidade de complexação e constantes de estabilidade condicional de íons metálicos por ligantes naturais. A retenção do ligante e complexo pela membrana deve ser completa ( $R_L = 1$  e  $R_{ML} = 1$ ), enquanto o íon metálico deverá passar através da membrana ( $R_M = 0$ ). Assim, a concentração do metal livre será igual a  $[M]$  determinada no filtrado e  $[ML]$  será obtida pela diferença entre a  $[M]_{\text{total}}$  e  $[M]$  [18,28].



Entretanto, a retenção de 100% de L e ML dificilmente é obtida, provavelmente devido à dimensão dos poros da membrana e do tamanho molecular da matéria orgânica. Pois, o tamanho varia com a configuração e carga, os quais por sua vez dependem do pH, força iônica e outras condições da solução [28].

Da mesma forma, tem-se encontrado valores de  $R_M$  maiores que zero. Contudo, os valores de  $R_M > 0$  podem ser devidos a formação de hidroxicomplexos de metais, seguida do processo de adsorção dessas espécies na membrana. Entretanto, na presença de ligantes orgânicos espera-se competição entre as re-

ações de complexação e o decréscimo da importância do processo de adsorção e assim, o decréscimo real dos valores de  $R_M$  [18].

A principal vantagem da ultrafiltração é não possuir limitação nem quanto à natureza do íon metálico, nem do ligante [15]. Além disso, os limites de detecção para os metais são limitados às sensibilidades das técnicas empregadas na determinação dos mesmos (ex. espectrometria atômica) [29].

O objetivo desse trabalho foi caracterizar substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solo

de diferentes regiões brasileiras por composição elementar e espectroscopia na região do infravermelho além de utilizar o procedimento da Ultrafiltração em Fluxo Tangencial para determinar constantes de troca entre metais originalmente complexados por substâncias húmicas e íons cobre(II) adicionados.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Amostragem

As amostras de água foram coletadas no Rio Itapanhaú, município de Bertioga (IR-XAD 8), pertencente ao Parque Estadual da Serra do Mar (SP) e Rio Negro-AM (RN-XAD 8). As amostras foram acidificadas a pH 2,0 com solução de HCl concentrado para posterior procedimento de extração com resina XAD 8.

As amostras de solo foram coletadas da Bacia do Médio Rio Negro (AM). Foram utilizadas duas amostras de solo, divididas em solo não alagável de Carvoeiro 1(RNS-1) e solo não alagável de Araçá 1(RNS-2).

### 2.2 Extração e purificação de Substâncias Húmicas Aquáticas (SHA) e Substâncias Húmicas de Solo (SHS)

As SHA e SHS foram extraídas das amostras naturais, coletadas em diferentes regiões Brasileiras, de acordo com o procedimento recomendado pela International Humic Substances Society [2,30]. A purificação das SHA e SHS foi feita utilizando tubos de diálise e a secagem efetuada por liofilização utilizando um Savant modelo E-C.

### 2.3 Determinação das constantes de troca entre íons Cu(II) e Ni, Al e Fe complexados às substâncias húmicas

Para o estudo de complexação entre o íon Cu(II) e matéria orgânica aquática, utilizou-se o procedi-

mento analítico proposto por BURBA et al. (2001) [27] ilustrado na Figura 1. Este procedimento baseia-se na utilização de um sistema de ultrafiltração tangencial (SARTORIUS Ultrasart X) equipado com membrana de polietersulfônica de 1 kDa (Gelman Pall-Filtron OMEGA), a qual impede a passagem das SH e dos complexos SH-M com tamanho molecular maior que 1 kDa. Logo, os íons metálicos livres não complexados às SH ou trocados por elas passam pela membrana [27].

As titulações foram feitas em volume de 200 mL de solução de SH 100 mg L<sup>-1</sup> ou de água natural, ajustou-se o pH em 5,0 com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e força iônica em 0,1 mol L<sup>-1</sup> com NaNO<sub>3</sub>. Utilizou-se o sistema de ultrafiltração tangencial equipado com membrana de 1 kDa acima descrito.

Antes da adição da solução de cobre, deixou-se o sistema bombeando por cerca de cinco minutos para condicionamento da membrana. A seguir, filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), a qual é correspondente ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução de cobre. Essa alíquota contém uma pequena quantidade de cobre e dos metais níquel, alumínio e ferro, originalmente presentes na matéria orgânica, correspondente à fração livre (não complexada a MOA) mais aquela fração ligada a MON, com tamanho molecular menor que 1 kDa. Volumes de 100 µL a 5,0 mL de solução padrão de Cu(II) 9,45 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> foram adicionados à solução até concentração em Cu(II) de 4,47 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. Depois de alcançado cada equilíbrio, em 10 min, e com agitação permanente, alíquotas (cerca de 2 mL) das frações da solução foram coletadas contendo íons cobre isolados pelo procedimento de filtração mais os metais níquel, alumínio e ferro, correspondentes as frações dos metais não complexadas e trocadas pelos íons Cu(II). Os filtrados foram acidificados com solução diluída de HNO<sub>3</sub> e em seguida os metais determinados por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite GFAAS [31].

## 2.4 Determinação dos metais

Cobre, alumínio, ferro e níquel foram determinados utilizando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizando soluções padrão mistas Titrisol-MERCK de acordo com as recomendações do fabricante.

## 2.5 Determinação da composição elementar

A composição elementar das amostras de SHA e SHS foi determinada em relação ao conteúdo de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio em analisador elementar CHNSO-CE Instruments, PERKIN ELMER, modelo EA 1110.

## 2.6 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos de pastilhas preparadas da mistura de brometo de potássio seco a 120°C com amostras de substâncias húmicas liofilizadas. As pastilhas foram obtidas submetendo-se essa mistura à pressão de 10t cm<sup>-2</sup> em pastilhador de 14 mm de diâmetro. As medidas foram feitas utilizando-se espectrômetro NICOLET, modelo Impact 400 (região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Composição elementar

As razões atômicas H/C e C/N geralmente têm sido utilizadas para estimativa do grau de aromaticidade e de humificação de substâncias húmicas, respectivamente [3]. A Tabela 1 lista os resultados da composição elementar e razões molares H/C e C/N para SH extraídas de amostras de água e de solos de diferentes regiões. Quanto menor a razão H/C, maior a aromaticidade e quanto maior a razão C/N, maior o estado de humificação do material. Existem similaridades entre os valores das razões H/C das diferentes amostras de SHA e SHS, os quais estão próximos

aos valores disponíveis na literatura indicando elevada aromaticidade [6]. Dentre todas as amostras, devida à menor razão molar H/C, RN-XAD 8 pode ser caracterizada como mais aromática. A amostra IR-XAD 8 apresentou elevada razão molar C/N indicando ser a amostra mais humificada.

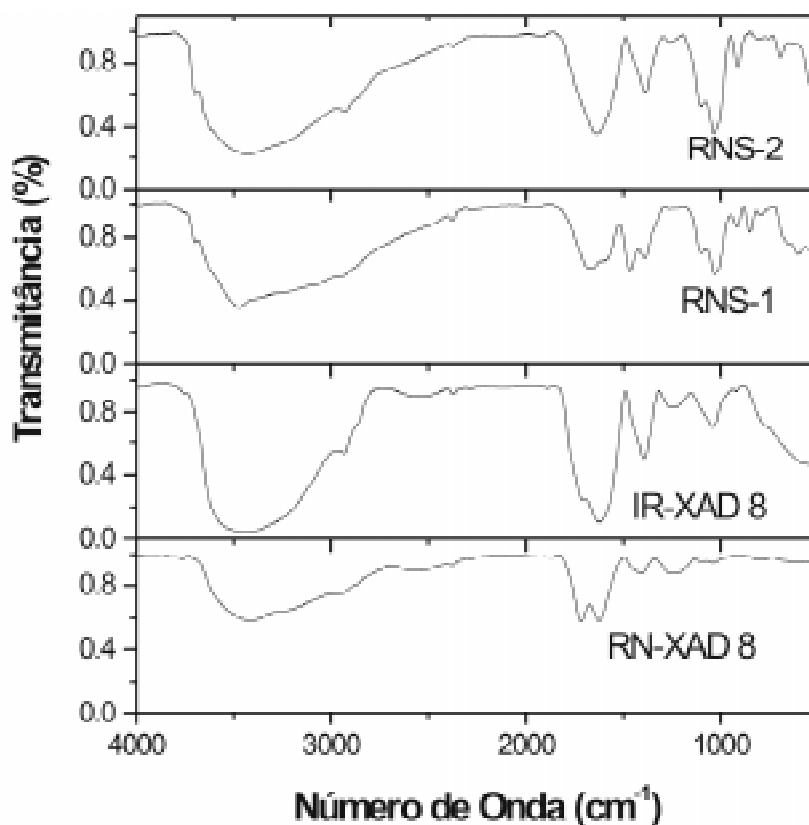
Tabela 1 – Composição elementar (%), razões molares H/C e C/N de substâncias húmicas extraídas de amostras de águas (SHA) e de solos (SHS) coletadas em diferentes regiões brasileiras

Amostras	C	H	O	N	H/C	C/N
IR-XAD 8	37,0	4,3	41,0	1,2	1,4	35,4
RN-XAD 8	46,9	4,3	41,1	3,0	1,1	18,4
RNS-1	20,5	3,0	38,4	1,4	1,8	16,8
RNS-2	23,5	3,3	31,9	2,3	1,7	12,0

As demais amostras apresentaram comportamento semelhante quanto ao grau de humificação e, quanto às amostras de solo, RNS-1 e RNS-2, não foram caracterizadas diferenças entre os valores de razão C/N.

## 3.2 Infravermelho

A Figura 3 mostra os espectros na região do infravermelho para as substâncias húmicas aquáticas e de solo. Os espectros apresentam bandas largas, comuns nos espectros de substâncias húmicas, atribuídas à extensiva superposição de absorções individuais [32]. As bandas largas de absorção na região de 3400 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas ao estiramento OH de fenóis e/ou ácidos carboxílicos e /ou estiramento NH de aminas. Bandas na região de 2900 cm<sup>-1</sup> indicam a presença de estiramento CH de grupos alifáticos. As bandas nas regiões de 1630 e 1720 cm<sup>-1</sup> são devidas a vibrações de carbonilas de grupos carboxilatos e/ou cetonas. Picos em torno de 1385 cm<sup>-1</sup> e bandas na região de 1035-1100 cm<sup>-1</sup> estão associados a deformações do grupo carboxilato e estiramento CO de álcoois, respectivamente [33].



### 3.3 Determinação dos coeficientes de retenção da membrana de 1 kDa

Nos estudos de complexação de metal pela matéria orgânica utilizando o procedimento de Ultrafiltração tangencial (UF) é preciso que a retenção do ligante e do complexo pela membrana seja máxima ( $R_L = 1$ ) e a retenção do íon metálico, o qual passa pela membrana seja mínima ( $R_M = 0$ ).

O coeficiente de retenção ( $R$ ) das espécies pode ser calculado utilizando a equação

$$R_x = \frac{[X]^s - [X]^f}{[X]^s}$$

onde  $X = M, L, ML$  e os sobrescritos  $s$  e  $f$  referem-se as concentrações de  $X$  na solução e nos filtrados, respectivamente [28].

Os testes para determinação da capacidade de retenção do ligante foram feitos traçando curvas analíticas com amostras de SHA e SHS e lendo as absorvâncias nos filtrados e nas soluções originais por espectrofotometria de absorção molecular em 254 nm. Os valores de retenção do ligante pela membrana, das amostras analisadas a pH 5,0, foram superiores a 0,98.

Os testes para determinação da capacidade de retenção de cobre foram feitos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite fazendo adições de concentração conhecida do metal em solução, nas mesmas condições experimentais, porém sem substâncias húmicas ("solução branco"). Em seguida, foi determinada a concentração de cobre na "solução branco" e no filtrado. O coeficiente médio de retenção de cobre na membrana em pH 5,0, foi menor que 0,012.

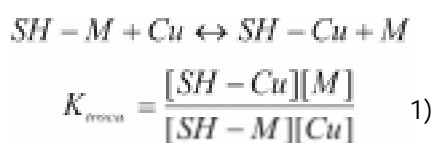
Van Den Bergh et al., (2001) [29] determinaram os coeficientes de retenção em membranas de 1 kDa para íons metálicos, em pH 4,0-4,8, menores que 0,02 e maiores que 0,95 para retenção das substâncias húmicas. Esses resultados corroboram com os deste trabalho, os quais mostram a eficiência do procedimento de ultrafiltração na diferenciação do metal complexado pela matéria orgânica (retido na membrana) do metal isolado no filtrado.

### 3.4 Determinação das constantes de troca por ultrafiltração tangencial

Nos ambientes naturais várias espécies metálicas estão presentes como formas livres ou complexadas por ligantes orgânicos ou inorgânicos. Logo, durante o processo de complexação, há uma natural competição entre essas espécies pelos sítios ligantes disponíveis. Um melhor entendimento dos fatores, os quais influam no destino, transporte e acúmulo de espécies metálicas, é importante na avaliação do comportamento de metais em sistemas aquáticos.

Utilizando-se o sistema de ultrafiltração tangencial equipado com membrana de 1 kDa (Figura 1) e aplicando um modelo de cálculo, é possível estimar as constantes termodinâmicas de troca entre espécies metálicas complexadas às SH [27,31]. Esse modelo foi empregado no tratamento dos dados para determinação de constantes de troca entre íons Cu(II) adicionados e espécies metálicas originalmente complexadas por substâncias húmicas.

Considerando que no estado de equilíbrio a lei de ação das massas é obedecida, de acordo com a equação 1, é possível estimar os valores das constantes de troca entre as espécies metálicas Ni, Al e Fe por íons Cu(II).



As concentrações  $[M]$  e  $[Cu]$  são determinadas nas alíquotas dos filtrados (cerca de 2 mL).  $[SH - M]$ . A concentração de metal total,  $[M]_{total}$ , é a concentração de metal originalmente complexado pelas SH determinada na solução original;  $[SH - Cu] = [Cu]_{total} - [Cu]$  e  $[Cu]_{total}$  é o somatório das concentrações de íons Cu(II) adicionados em cada intervalo de tempo.

A partir dos dados das Figuras 4 e 5 foram calculados os valores das constantes de troca listados na Tabela 2, os quais caracterizam a troca dos metais Al, Fe e Ni complexados pelas SH e íons Cu(II).

De acordo com a equação 1, o valor da constante de troca é inversamente proporcional à estabilidade do complexo SH - M (M = Al, Fe, Ni). Ou seja, altos valores de constante de troca indicam menor estabilidade do complexo SH - M, enquanto baixos valores indicam maior estabilidade.

As constantes de troca entre íons Cu(II) e o Fe foram menores que 1 nas amostras RNS-1 e RNS-2, indicando maior estabilidade desses complexos SH-Fe que os complexos SH-Cu. Para alumínio e níquel as constantes de troca foram superiores a 1 em todas as amostras, indicando menor estabilidade dos complexos SH-Al e SH-Ni que os complexos SH-Cu. No caso do níquel ainda, as constantes de troca foram bem superiores às constantes dos íons Al e Fe, indicando serem os complexos SH-Ni os de menor estabilidade, ou seja, o níquel nas amostras é mais facilmente trocado por íons Cu(II) do que alumínio e ferro.

Os resultados das constantes de troca dos complexos, apresentados na Tabela 3, permitem estabelecer a seguinte ordem de  $K_{troca}$  para os metais:  $Fe < Al < Ni$ . Estes resultados são corroborados por Burba et al. (2001) [27], quando da caracterização "on site" de águas naturais por reações de troca com íons Cu(II) e também por Mandal et al. (1999) [34], quando da utilização da resina de troca Chelex-100 no estudo de competição de cobre e de cobalto com íons níquel originalmente complexados por ligantes orgânicos, os quais caracterizaram maior afinidade dos sítios pelos íons cobre adicionados.

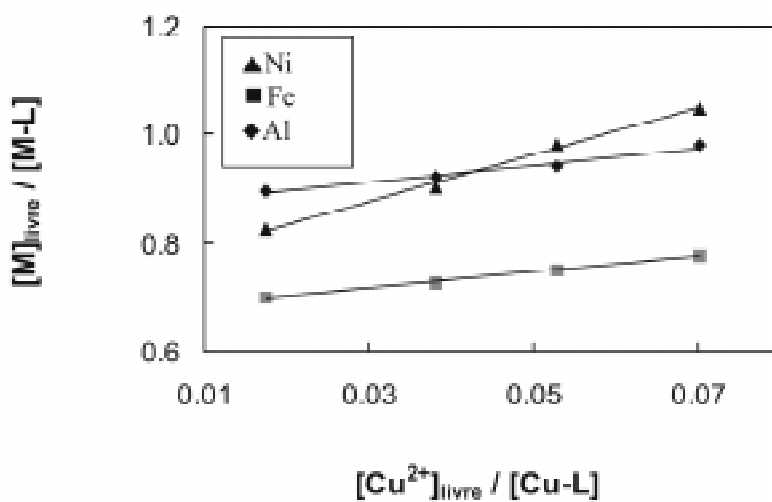
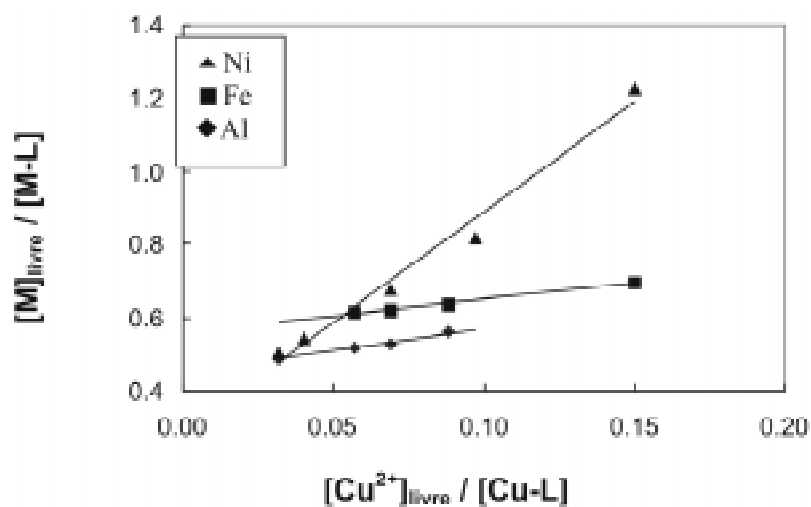


Tabela 2- Constantes de troca entre íons Cu(II) e espécies metálicas (Ni, Al, e Fe) em substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solos coletadas em diferentes regiões brasileiras

Amostras	$K_{troca}$	Alumínio		Ferro		Níquel	
		$[M]^a$ (mmol L <sup>-1</sup> )	$K_{troca}$	$[M]^a$ (mmol L <sup>-1</sup> )	$K_{troca}$	$[M]$ (mmol L <sup>-1</sup> )	
IR-XAD 8	1,27	$1,19 \times 10^{-1}$	1,54	$4,73 \times 10^{-1}$	— <sup>b</sup>	$5,96 \times 10^{-5}$	
RN-XAD 8	1,60	$1,29 \times 10^{-1}$	1,45	$8,71 \times 10^{-2}$	4,33	$7,87 \times 10^{-5}$	
RNS-1	1,00	$1,84 \times 10^{-1}$	0,70	1,38	— <sup>b</sup>	$8,14 \times 10^{-5}$	
RNS-2	1,24	$1,45 \times 10^{-1}$	0,87	2,51	6,04	$6,80 \times 10^{-5}$	

#### 4. CONCLUSÕES

A caracterização feita pelas razões molares C/N e H/C indicaram maior humificação e aromaticidade da matéria orgânica presente nas amostras aquáticas que nas amostras de solo. Os espectros de infravermelho apresentaram bandas largas, comuns nos espectros de substâncias húmicas, atribuídas às superposições de absorções individuais e similaridades entre os grupos funcionais presentes nas estruturas das substâncias húmicas aquáticas e de solos.

O procedimento de ultrafiltração com fluxo tangencial utilizando membrana polietersulfônica com porosidade 1 kDa proposto neste trabalho é eficaz na diferenciação do metal retido pela matéria orgânica

do metal isolado no filtrado, pelo alto coeficiente de retenção do ligante ( $R = 0,98$ ) e baixo valor do coeficiente de retenção do metal ( $R = 0,02$ ).

Resultados de experimentos de troca entre íons Cu(II) adicionados e espécies metálicas (Ni, Al e Fe) originalmente complexadas por substâncias húmicas, permitiram estabelecer a seguinte ordem decrescente de estabilidade relativa do complexo SH-metal:  $Fe < Al < Ni$

#### AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a CAPES, FAPESP, CNPq e FUNDUNESP pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BURBA, P.; ROCHA, J. C.; KLOCKOW, D. Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances investigations by means of ion exchange-based flow procedure. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 349, p. 800-807, 1994.
- [2] ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; FURLAN, M. An alternative methodology for the extraction of humic substances from organic soils. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, p. 51-56, 1998.
- [3] FRIMMEL, F. H. Complexation of paramagnetic metal ions by aquatic fulvic acids. In: BROEKAERT, J. A. C.; GÜCKER, S.; ADAMS, F. (Ed.). *Metal speciation in the environment*. Berlin: Springer, 1990. p. 57-69.
- [4] EINAX, J.; KUNZE, C. Complexation capacity of aquatic systems in dependence on different ligands and heavy metals- electroanalytical investigations and statistical evaluation. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 354, p. 895-899, 1996.
- [5] ZHANG, Y. J.; BRYAN, N. D.; LIVENS, F. R.; JONES, M. N. Complexing of metal ions by humic substances. In: GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A. (Ed.). *Humic and fulvic: isolation, structure and environmental role*. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 194-206.
- [6] STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition and reaction*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- [7] NEUBECKER, T. A.; ALLEN, H. E. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. *Water Res.*, v. 17, p. 1-14, 1983.
- [8] PARDO, R.; BARRADO, E.; VEJA, M.; DEBAN, L.; TASCÓN, M. L. Voltammetric complexation capacity of waters of the Pisuerga river. *Water Res.*, v. 28, n. 10, p. 2139-2146, 1990.
- [9] NURNBERG, H. W. Voltammetric trace analysis in ecological chemistry of toxic metals. *Pure and Appl. Chem.*, v. 54, n. 4, p. 853-878, 1982.
- [10] FLORENCE, T. M. Electrochemical approaches to trace element speciation in waters: a review. *Analyst*, v. 111, p. 489-504, 1986.
- [11] BUFFLE, J.; GRETER, F. L.; HAERDI, W. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, v. 49, n. 2, p. 216-221, 1977.
- [12] ABATE, G.; MASINI, J. C. Utilização de eletrodos potenciométricos de amálgama em estudos de complexação de substâncias húmicas. *Quím. Nova*, v. 22, n. 5, p. 661-665, 1999.
- [13] TOWN, R. M.; POWELL, H. K. J. Ion-selective electrode potentiometric studies on the complexation of copper(II) by soil-derived humic and fulvic acids. *Anal. Chim. Acta*, v. 279, p. 221-233, 1993.
- [14] MATHUTHU, A. S.; EPHRAIM, J. H. Calcium binding by fulvic acids studies by an ion selective electrode and an ultrafiltration method. *Talanta*, v. 40, n. 4, p. 521-526, 1993.
- [15] BUFFLE, J.; STAUB, C. Measurement of complexation properties of metal ions in natural conditions by ultrafiltration: measurements of equilibrium constants for complexation of zinc by synthetic and natural ligands. *Anal. Chem.*, v. 56, p. 2837-2842, p. 1984.
- [16] BUFFLE, J. *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*. New York: Ellis Horwood, 1990. 692 p.
- [17] BUFFLE, J.; DELADOEY, P.; GRETER, F. L.; HAERDI, W. Study of the complex formation of

copper(II) by humic and fulvic substances. *Anal. Chim. Acta*, v.116, p. 255-274, 1980.

[18] NIFANT'EVA, T. I.; SHKINEV, V. M.; SPIVAKOV, B. Y.; BURBA, P. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part 2. Evaluation of conditional stability constants by using ultrafiltration. *Talanta*, v. 48, p.257-267,1999.

[19] TUSCHALL JR., J. R.; BREZONIK, P. L. Application of continuous-flow ultrafiltration and competing ligand/differential spectrophotometry for measurement of heavy metal complexation by dissolved organic matter. *Anal. Chim. Acta*, v. 149, p. 47-58, 1983.

[20] THURMAN, E. M. Organic geochemistry of natural waters. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. 488 p.

[21] AIKEN, G. R. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances. In: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MacCARTHY, P. (Ed.). *Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization*. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 363-385.

[22] BURBA, P.; SHKINEV, V.; SPIVAKOV, B. Y. On-line fractionation and characterization of aquatic humic substances by means of sequential-stage ultrafiltration. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 351, p. 74-82, 1995.

[23] ASTER, B.; BURBA, P.; BROEKAERT, J. A. C. Analytical fractionation of aquatic humic substances and their metal species by means of multistage ultrafiltration. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 354, p. 722-728, 1996.

[24] ROCHA, J. C.; SARGENTINI Jr., E.; TOSCANO, I. A. S.; ROSA, A. H.; BURBA, P. Multi-method study on aquatic humic substances from the "Rio Negro" – Amazonas state/Brazil. Emphasis on molecular-size

classification of their metal contents. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 10, n. 3, p. 169-175, 1999.

[25] ROCHA, J. C.; SARGENTINI Jr., E.; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; BURBA, P. Substâncias húmicas: sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. *Quím. Nova*, v. 23, p. 410-412, 2000.

[26] KILDUFF, J.; WEBER JR., W. J. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes. *Environ. Sci. Technol.*, v. 26, p. 569-577, 1992.

[27] BURBA, P.; VAN Den BERGH, J.; KLOCKOW, D. On-site characterization of humic-rich hydrocolloids and their metal loads by means of mobile size-fractionation and exchange techniques. *Fresenius J. Anal. Chem.*, v. 371, p. 660-669, 2001.

[28] STAUB, C.; BUFFLE, J.; HAERDI, W. Measurement of complexation properties of metal ions in natural conditions by ultrafiltration: influence of various factors on the retention of metals and ligands by neutral and negatively charged membranes. *Anal. Chem.*, v. 56, p. 2843-2849, 1984.

[29] VAN Den BERGH, J.; JAKUBOWSKI, B.; BURBA, P. Investigations on the conditional kinetic and thermodynamic stability of aquatic humic substance-metal complexes by means of EDTA exchange, ultrafiltration and atomic spectrometry. *Talanta*, v. 55, p. 587-593, 2001.

[30] MALCOLM, R. L. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Anal. Chim. Acta*, v. 232, p. 19-30, 1990.

[31] ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; VAN Den BERGH, J.; BURBA, P. Characterization of humic-rich hydrocolloids and their metal species by means of competing ligand and metal exchange-an on site approach. *J. Environ. Monit.*, v. 4, p. 799-802, 2002.

[32] POPPI, N. R.; TALAMONI, J. Estudo dos ácidos húmico e fúlvico, extraídos de solos, por espectroscopia de infravermelho. *Química Nova*, n. 15, v. 4, p. 281-285, 1992.

[33] ARAÚJO, A. B.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; ROMÃO, L. P. C. Distribuição de metais e determinação da constante de troca de frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares.

*Quím. Nova*, v. 25, p. 1103-1107, 2002.

[34] MANDAL, R.; SEKALY, A. I. R.; MURIMBOH, J.; HASSAN, N. M.; CHAKRABARTI, C. L.; BACK, M. H.; GRÉGOIRE, D. C.; SCHROEDER, W. H. Effect of the competition of copper and cobalt on the lability of Ni(II)-organic ligand complexes, Part II: in freshwaters (Rideau River surface waters). *Anal. Chim. Acta*, v. 395, p. 323-334, 1999.