

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESPECIAÇÃO DE METAIS E SUA INTERAÇÃO COM A
MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA EM UM
RESERVATÓRIO ARTIFICIAL**

Alessandra Emanuele Tonietto*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Teresa Lombardi
Coorientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

* bolsista CAPES

São Carlos – SP
2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

T665em

Tonietto, Alessandra Emanuele.

Especiação de metais e sua interação com a matéria orgânica dissolvida em um reservatório artificial / Alessandra Emanuele Tonietto. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
111 f.

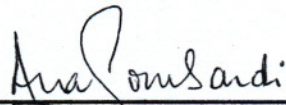
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Química analítica. 2. Especiação química. 3. Metais. 4. Matéria orgânica dissolvida. 5. Águas naturais. 6. Microalgas. I. Título.

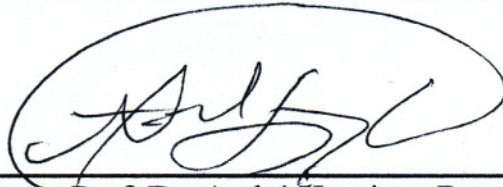
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

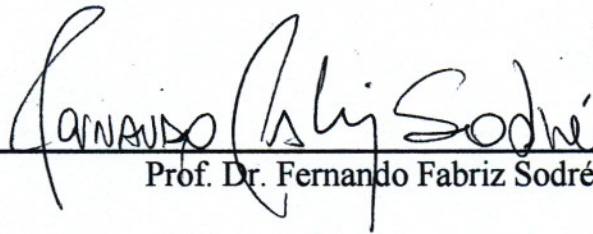
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata Alessandra Emanuele Tonietto, realizada em 28 de maio de 2010:



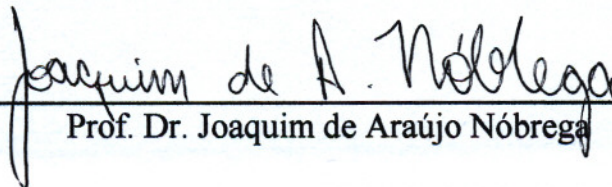
Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi



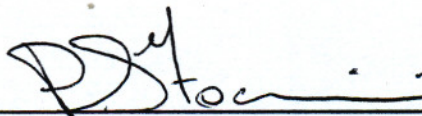
Prof. Dr. André Henrique Rosa



Prof. Dr. Fernando Fabriz Sodré



Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega



Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini

AGRADECIMENTOS

À amiga e orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Teresa Lombardi, agradeço pela oportunidade de cursar o doutorado nesta instituição como sua orientada e por seus ensinamentos ao longo desses anos. Obrigada pela orientação, amizade, apoio e paciência;

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira (DB – UFSCar) pela atenção, sugestões, discussões e apoio experimental;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho (DQ – UFSCar) pela atenção, orientação no início do doutorado, coorientação e por disponibilizar o polarógrafo junto ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (DQ – UFSCar);

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega (DQ – UFSCar) pela atenção e oportunidade de utilizar o ICP-MS;

Aos membros da banca examinadora de qualificação, Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pelo aceite do convite de participação, correção do projeto, sugestões e críticas para o aprimoramento do trabalho;

Aos membros da banca examinadora do seminário geral, Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho e Prof^a. Dr^a. Regina Vincenzi Oliveira (DQ – UFSCar), pelas sugestões e críticas;

Aos membros da banca examinadora de defesa, Prof. Dr. André Henrique Rosa (GEA – UNESP), Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré (IQ – UnB), Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini (DQ – UFSCar), pelo aceite do convite de participação e contribuições para finalização desta tese;

À Prof^a. Dr^a. Ivani Aparecida Carlos (DQ – UFSCar) pelas avaliações dos relatórios anuais;

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pela contribuição para minha formação profissional;

Aos amigos e colegas do laboratório de Ficologia, Cilene Mori, Fabrício Meccheri, Guilherme de Moraes, Helena Vieira, Inessa Bagatini, Ingritt Moreira, Letícia Tessarolli, Maria José Oliveira, Patrícia Nogueira, Rodrigo Pepino, Thais Bittar e Vanessa Colombo, pelo convívio, produtivas discussões e agradável ambiente de trabalho;

À Inessa Lacativa Bagatini, especialmente, pela amizade;

Ao técnico do laboratório de Ficologia, Luiz Sartori, pela amizade, atenção e apoio na parte biológica do trabalho;

Aos técnicos de campo, Luis Joaquim e Airton Soares, pela ajuda imprescindível nas coletas de água no Reservatório de Barra Bonita (SP);

Ao Prof. Dr. Christopher C. Parrish (Newfoundland University, Canadá) pelas determinações dos aminoácidos e lipídios nos excretados da cianobactéria;

Ao Rodrigo Choueri e Paloma Gusso pela amizade e ajuda nas análises estatísticas;

À Catarinie Diniz e Silmara Bianchi pelas análises no ICP-MS;

Ao Faustino Levorato Filho (AES-Tietê) pelos dados de pluviosidade de Barra Bonita;

Ao Gustavo Luís Tonietto Reis pela produção dos mapas;

A família Lombardi de Oliveira, Ana Teresa, César, Natália e Daniel pela amizade e acolhimento;

A todos os amigos do Departamento de Química da UFSCar;

Às secretárias do PPGQ UFSCar, Ariane Gonzalez, Cristina Motta e Luciani Juarez, pela atenção e colaboração;

Ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade;

À CAPES pela bolsa de estudo;

A todos os meus amigos, especialmente à Matilte Halma;

Aos meus familiares pelo apoio inestimável;

Acima de tudo à minha mãe, Léa Paloschi, pela dedicação, apoio e incentivo.

Muito obrigada!

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BHPCJ	Bacia hidrográfica Piracicaba/Capivari/Jundiaí
BHTS	Bacia hidrográfica Tietê/Sorocaba
<i>C. raciborskii</i>	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
CC	Capacidade de complexação
CdL	Cádmio complexado
Cdlábil	Cádmio lábil
CdT	Cádmio total
CdTD	Cádmio total dissolvido
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CG-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização em chama (do inglês <i>gas chromatography-flame ionization detector</i>)
CI	Carbono inorgânico
C _L	Concentração de ligantes disponíveis
COD	Carbono orgânico dissolvido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CT	Carbono total
CuL	Cobre complexado
Culábil	Cobre lábil
CuP	Cobre associado ao material particulado
CuT	Cobre total
CuTD	Cobre total dissolvido
Da	Daltons
DDC	Dietilditiocarbamato (do inglês <i>diethyldithiocarbamate</i>)
DET	Técnica difusiva de equilíbrio em filme fino (do inglês <i>diffusive equilibration in thin film</i>)
DGT	Gradiente difusivo em filmes finos (do inglês <i>diffusive gradient in thin films</i>)
DMT	Técnica de membrana Donnan (do inglês <i>Donnan membrane technique</i>)

DPASV	Voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial (do inglês <i>differential pulse anodic stripping voltammetry</i>)
DPCSV	Voltametria de redissolução catódica de pulso diferencial (do inglês <i>differential pulse cathodic stripping voltammetry</i>)
E (V)	Potencial (volts)
E_{dep}	Potencial de deposição
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (do inglês <i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i>)
E_f	Potencial final
E_i	Potencial inicial
EN	Etilenodiamina (do inglês <i>ethylenediamine</i>)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês <i>flame atomic absorption spectrometry</i>)
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
GIME	Microeletrodo integrado a gel (do inglês <i>gel integrated microelectrode</i>)
HMDE	Eletrodo de gota pendente de mercúrio (do inglês <i>hanging mercury drop electrode</i>)
I	Força iônica
I (nA)	Corrente (nano ampére)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ISE	Eletrodo íon-seletivo (do inglês <i>ion selective electrode</i>)
K'	Constante de estabilidade condicional
K'_{ML}	Constante de estabilidade condicional do complexo metal-ligante (M: Cu, Zn, Cd ou Pb)
L	Ligantes
LD	Limite de detecção
M	Metal
M^{2+}	Metal livre

ML	Metal complexado (complexo metal-ligante)
MIábil	Metal lábil
MO	Matéria orgânica
MOD	Matéria orgânica dissolvida
MON	Matéria orgânica natural
MP	Metal associado ao material particulado
MT	Metal total
MTD	Metal total dissolvido
OD	Oxigênio dissolvido
PbL	Chumbo complexado
Pblábil	Chumbo lábil
PbP	Chumbo associado ao material particulado
PbT	Chumbo total
PbTD	Chumbo total dissolvido
PC(s)	Componente(s) principal(is)
PCA	Análise de componentes principais (do inglês <i>principal component analysis</i>)
RMSP	Região metropolitana de São Paulo
rpm	Rotações por minuto
s	Coeficiente angular (do inglês <i>slope</i>)
SH	Substâncias húmicas
SHA	Substâncias húmicas aquáticas
SST	Sólidos suspensos totais
T _{água}	Temperatura da água
T _{ambiente}	Temperatura ambiente
t _{dep}	Tempo de deposição
t _{equilíbrio}	Tempo de equilíbrio
TLC-FID	Cromatografia de camada delgada acoplada a um detector de ionização em chama (do inglês <i>thin layer chromatography-flame ionization detector</i>)
UGRHI	Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos
UHE - Barra Bonita	Usina Hidrelétrica de Barra Bonita
ZnL	Zinco complexado
Znlábil	Zinco lábil

ZnP	Zinco associado ao material particulado
ZnT	Zinco total
ZnTD	Zinco total dissolvido
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 Parâmetros utilizados para a titulação da capacidade de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo.	22
TABELA 3.2 Parâmetros utilizados para a titulação de competição entre os metais cobre e zinco.	24
TABELA 4.1 Capacidade de complexação de cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita durante o período amostral. Concentração média \pm desvio padrão, n = 3. NC = não calculado.	40
TABELA 4.2 Concentração de cobre lábil, complexado e capacidade de complexação (C_L e $\log K'_{ML}$) do cobre na água do Reservatório de Barra Bonita, antes e após adição de zinco (n = 3; média \pm desvio padrão).	63
TABELA 4.3 Concentração de zinco lábil, complexado e capacidade de complexação (C_L e $\log K'_{ML}$) do zinco na água do Reservatório de Barra Bonita, antes e após adição de cobre (n = 3; média \pm desvio padrão).	63
TABELA 8.1 Composição do meio de cultura ASM-1.	75
TABELA 9.1 Proporção dos elementos C, H, N e S. Média \pm desvio padrão (n = 3). (– não detectado).	80
TABELA 9.2 Aminoácidos livres presentes nas diferentes frações dos excretados da cianobactéria <i>C. raciborskii</i> . (– não detectado).	82
TABELA 9.3 Classes lipídicas quantificadas nas diferentes frações dos excretados da cianobactéria <i>C. raciborskii</i> . (– não detectado).	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Esquema representativo das reações de metais com diferentes constituintes no ambiente aquático. Adaptado a partir de BUFFLE, 1988.	7
FIGURA 3.1 Localização geográfica do Reservatório de Barra Bonita (SP) ilustrando os pontos de coleta.	17
FIGURA 3.2 Fluxograma do procedimento analítico adotado para a análise de especiação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita.	20
FIGURA 3.3 Curvas analíticas para determinação de carbono total (CT) e carbono inorgânico (CI).	27
FIGURA 4.1 Valores de OD, temperatura da água, COD e condutividade determinados nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita, agrupados por período amostral. As linhas horizontais das caixas representam 25, 50 e 75% dos valores; barras de erros indicam 5 e 95%; (X) expressas 1 e 99%; (—) correspondem aos valores máximos e mínimos e (□) representa a média aritmética.	31
FIGURA 4.2 Variação de sólidos suspensos totais em função da concentração de clorofila-a considerando todos os pontos amostrais.	33
FIGURA 4.3 Fotografias de florações algais obtidas em julho de 2008 nas águas do Reservatório de Barra Bonita, localizadas próximo ao ponto 2 (A) e próximo ao ponto 3 (B).	34
FIGURA 4.4 Valores de SST nas águas do Reservatório de Barra Bonita entre julho de 2007 e janeiro de 2009 e dados de precipitação mensal acumulada (barras) entre abril de 2007 e janeiro de 2009.	34
FIGURA 4.5 Voltamogramas obtidos durante a determinação simultânea de cobre, zinco, cádmio e chumbo em uma amostra de água natural por DPASV. Força iônica: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $E_{\text{dep}} = -1,2 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), $t_{\text{dep}} 300 \text{ s}$, amplitude do pulso 50 mV e velocidade de varredura 8 mV/s.	36
FIGURA 4.6 Concentração total (cinza escuro) e total dissolvida (cinza claro) (nmol L^{-1}) de cobre (A), zinco (B), chumbo (C) e cádmio (D) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita.	37
FIGURA 4.7 Voltamogramas referentes às titulações de (A) cobre, (B) zinco, (C) chumbo, (D) cádmio e determinação das capacidades de complexação para (E)	

cobre, (F) zinco, (G) chumbo, (H) cádmio, das amostras de água do Reservatório de Barra Bonita.....	39
FIGURA 4.8 Concentração relativa dos metais cobre (A), zinco (B) e chumbo (C) nas frações particulada (MP), complexada dissolvida (ML) e lábil para amostras coletadas no Reservatório de Barra Bonita durante o período amostral. (●) Ponto 1; (■) Ponto 2; (▲) Ponto 3; símbolos cheios: coletas de agosto e julho; símbolos vazios: coletas de novembro e janeiro.....	43
FIGURA 4.9 Concentrações de cobre (○), zinco (□) e chumbo (△) complexados (símbolos cheios) e lábeis (símbolos vazios) em função das suas respectivas concentrações na fração dissolvida.	46
FIGURA 4.10 Variação da concentração de metal livre em função da concentração de metal lábil durante o período de amostragem. (●) cobre, (■) zinco e (▲) chumbo.	48
FIGURA 4.11 Espécies de cobre (A), zinco (B), chumbo (C) e cádmio (D) para a modelagem da fração dissolvida na água do Reservatório de Barra Bonita.....	50
FIGURA 4.12 Espectros de emissão de fluorescência molecular obtidos para amostras do ponto 1 (A), ponto 2 (B) e ponto 3 (C).	52
FIGURA 4.13 Espectros de fluorescência de excitação sincronizada obtidos para amostras do ponto 1 (A), ponto 2 (B) e ponto 3 (C).	53
FIGURA 4.14 Gráficos de (A) variáveis (<i>loadings</i>) e (B) casos (<i>scores</i>), para as duas componentes principais das amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (Factor 1 = PC1; Factor 2 = PC2). Gráfico (A): números representam as variáveis descritas no APÊNDICE 2. Gráfico (B): símbolos que representam os pontos: ponto 1 (P1), ponto 2 (P2), ponto 3 (P3); símbolos que representam as coletas: agosto 2007 (C1), novembro 2007 (C2), julho 2008 (C3) e janeiro 2009 (C4).....	57
FIGURA 4.15 Voltamogramas obtidos nas titulações de cobre (●) e zinco (■) na amostra de água do Reservatório de Barra Bonita. (A) Adição de Zn e titulação com Cu; (B) Adição de Cu e titulação com Zn.	62
FIGURA 8.1 Culturas tipo “batch” de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (A) 3º dia de cultura (B) 37º dia de cultura.	75
FIGURA 8.2 Curva de crescimento de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> . Concentrações de (×) COD (○) Cl e (◇) clorofila-a em função dos dias de cultura.	76

FIGURA 8.3 Fluxograma do procedimento adotado para filtração das culturas de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> em diferentes massas moleculares.	77
FIGURA 9.1 Concentração total de carboidratos (cinza escuro), proteínas (cinza médio) e lipídios (cinza claro) presentes nas diferentes frações moleculares dos excretados da cianobactéria <i>C. raciborskii</i>	80
FIGURA 9.2 Espectros de fluorescência nos modos (A) emissão e (B) excitação sincronizada obtidos para as diferentes frações dos excretados de <i>C. raciborskii</i>	83
FIGURA 9.3 Capacidade de complexação, C_L (A) e $\log K'_{ML}$ (B) dos excretados da cianobactéria: fração > 30 kDa (cinza escuro); fração entre 30 kDa - 10 kDa (cinza médio); fração entre 10 kDa - 3 kDa (cinza claro) frente aos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo.....	85
FIGURA 9.4 Capacidade de complexação dos excretados nas frações >30 kDa (cinza escuro), 30-10 kDa (cinza médio) e 10-3 kDa (cinza claro). (A) C_L e (B) $\log K'_{CuL}$ para cobre antes e após adição de zinco; (C) C_L e (D) $\log K'_{ZnL}$ para zinco antes e após adição de cobre; (E) C_L e (F) $\log K'_{CdL}$ para cádmio antes e após adição de chumbo; (G) C_L e (H) $\log K'_{PbL}$ para chumbo antes e após adição de cádmio.....	90

RESUMO

ESPECIAÇÃO DE METAIS E SUA INTERAÇÃO COM A MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA EM UM RESERVATÓRIO ARTIFICIAL

A degradação ambiental de ecossistemas aquáticos estimula estudos sobre interações envolvendo matéria orgânica dissolvida, metais traço e a biota aquática. O objetivo central desta pesquisa foi avaliar a especiação dos metais cádmio, chumbo, cobre e zinco na água de um reservatório sujeito a atividades antrópicas. Para tanto, escolheu-se o reservatório artificial de Barra Bonita (SP), um ecossistema eutrófico e contaminado por resíduos urbanos, industriais e agrícolas. Foram realizadas coletas de água em três pontos ao longo do reservatório considerando a sazonalidade (inverno seco e verão chuvoso) durante 24 meses. As amostras foram avaliadas quanto às espécies totais, dissolvidas, lábil e livre dos metais e quanto aos parâmetros de complexação (C_L e $\log K'_{ML}$) com ligantes presentes na água, competição entre cobre e zinco por ligantes, caracterização fluorimétrica e parâmetros físico-químicos. Esses resultados revelaram um grau elevado de deterioração do reservatório independente da localização amostral e a ordem das concentrações total e dissolvida dos metais foi $Zn > Cu > Pb > Cd$. Em geral, maior porcentagem dos metais cobre e zinco permaneceu complexado à fração dissolvida e chumbo associado ao material particulado. O uso do MineqL+ mostrou que Zn^{2+} e Cd^{2+} dominaram a forma lábil, enquanto cobre e chumbo permaneceram associados a carbonatos. O aumento da concentração de metal total dissolvido evidenciou um aumento de cobre e zinco complexados, $Zn_{lábil}$ e $Pb_{lábil}$. Através da análise de componentes principais identificaram-se influências sazonais das fontes de aporte de metais para o reservatório. Análise de competição entre os metais por ligantes indicou que o cobre, previamente adicionado, afetou a especiação do zinco. No entanto, a prévia adição de zinco indicou que houve complexação dos ligantes antes disponíveis ao cobre, mas não foram observadas diferenças na especiação do cobre. Devido à alta incidência de florescimentos de cianobactérias no reservatório, *Cylindrospermopsis raciborskii* foi isolada daquele ambiente e mantida no laboratório para obtenção e estudo de seu excretado. Esse foi fracionado em diferentes massas moleculares (>30 kDa; 30-10 kDa; 10-3 kDa) e posteriormente analisadas a capacidade de complexação (CC) com os quatro metais, composição elementar (C, H, N e S) e bioquímica, caracterização fluorimétrica e competição entre os metais

cobre e zinco, e cádmio e chumbo pelos ligantes. A caracterização dos excretados mostrou que na fração >30 kDa e 30-10 kDa prevaleceram altas concentrações de carboidratos em relação a proteínas e lipídios, entretanto na fração 10-3 kDa a composição bioquímica foi similar. Análise fluorimétrica identificou picos característicos de materiais proteináceos e material fitoplanctônico (2 – 5 anéis aromáticos). A interpretação dos resultados de C_L e $\log K'_{ML}$ para as diferentes frações moleculares dos excretados, indicou ampla diversidade na composição química dos ligantes que complexaram variadas concentrações de metais com diferentes afinidades. A partir da titulação de competição nos excretados conclui-se que apenas na fração >30 kDa, tanto o cobre quanto o zinco previamente adicionados, são complexados por ligantes antes disponíveis ao zinco e ao cobre, respectivamente. Na fração 30-10 kDa, o chumbo, previamente adicionado, é complexado por ligantes antes disponíveis ao cádmio, e em todas as frações não foi detectada CC para chumbo quando cádmio foi previamente adicionado.

ABSTRACT

METAL SPECIATION AND INTERACTIONS WITH DISSOLVED ORGANIC MATERIALS IN A ARTIFICIAL RESERVOIR

Environmental degradation of aquatic ecosystems stimulates investigations about the interactions between dissolved organic matter, trace metals and the biota. This study aimed to investigate the speciation of cadmium, copper, lead and zinc in a reservoir subjected to antropic activities. To develop this study, we have chosen Barra Bonita Reservoir (SP), an eutrophic and contaminated ecosystem that receives urban, industrial and agricultural effluents. Water samples were obtained in three locations within the reservoir considering local seasonality (dry winter and rainy summer) during 24 months. The samples were analysed for total, total dissolved, labile and ionic concentrations of the metals, as well as complexation parameters (C_L e $\log K'_{ML}$) and competition between copper and zinc for the ligands, fluorimetric characterization, and physico-chemical parameters of the water. The results showed a high degree of deterioration of the ecosystem. Independent of sampling location, the concentration order for the metals was $Zn > Cu > Pb > Cd$ (total and total dissolved). In general copper and zinc remained as complexes in the dissolved fraction, while lead was mostly associated with particulate materials. MineqL+ calculations showed that Zn^{2+} and Cd^{2+} dominated the labile form, whereas copper and lead remained associated with carbonates. The increased concentration of total dissolved metal showed an increase of copper and zinc complexes, and labile form of zinc and lead. Through principal component analysis (PCA), seasonal influences related to the main sources of metals supply into the reservoir were identified. Metal competition analysis showed that previously added copper affected zinc speciation. However, prior addition of zinc indicated that this metal was complexed by the ligands that were previously available to copper. Nevertheless, no differences were observed in copper speciation. Because the resevoir is subject to intense and frequent cyanobacteria blooms, *Cylindrospermopsis raciborskii* was isolated from that environment and cultured in the laboratory to obtain its excreted materials. This excreted material was then separated into three molecular weight fractions (> 30 kDa; 30-10 kDa; 10-3 kDa) that were analyzed for complexation capacity (C_L e $\log K'_{ML}$) with cadmium, copper, lead and zinc, elemental (C, H, N and S) and biochemical composition, fluorescence characteristics and competition for ligands between copper and zinc, and cadmium

and lead. The results showed that the fraction >30 kDa and 30-10 kDa had high carbohydrates contents, but low proteins and lipids, whereas for the 10-3 kDa fraction no variation on the biochemical composition was obtained. Fluorescence analysis showed peaks that define proteinaceous materials with 2 – 5 aromatic rings usually assigned to be of phytoplankton origin. The C_L and $\log K'_{ML}$ for the different molecular weight fractions indicated a broad chemical diversity of the ligands that had different affinities for the metals. Metal competition titrations on the excreted material showed that it was only for the >30 kDa fraction that either previously added copper or zinc were complexed by ligands previously available to zinc and copper, respectively. In the 30-10 kDa fraction previously added lead, was complexed by ligands that were available to cadmium. In all fractions no lead complexation capacity was detected when cadmium had been previously added.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: ESPECIAÇÃO DOS METAIS COBRE, ZINCO, CÁDMIO E CHUMBO NAS ÁGUAS DO RESERVATÓRIO DE BARRA BONITA (SP)

APRESENTAÇÃO	1
1 INTRODUÇÃO.....	4
1.1 Importância dos metais traço cobre, zinco, cádmio e chumbo	5
1.2 Especiação de metais nos ambientes aquáticos	6
1.3 Técnicas analíticas empregadas no estudo da especiação de metais	10
2 OBJETIVOS.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Local de estudo	16
3.2 Técnicas limpas.....	18
3.2.1 <i>Coleta e manipulação das amostras</i>	19
3.3 Especiação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo	20
3.3.1 <i>Determinação da capacidade de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita</i>	21
3.4 Titulação de competição entre os metais cobre e zinco nas águas do Reservatório de Barra Bonita.....	24
3.5 Espectroscopia de fluorescência	25
3.6 Parâmetros físico-químicos e nutrientes.....	25
3.7 Análises estatísticas	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Caracterização físico-química da água do Reservatório de Barra Bonita	30
4.2 Especiação de metais nas águas do Reservatório de Barra Bonita	35
4.3 Caracterização da matéria orgânica dissolvida natural empregando fluorescência.....	51
4.4 Análise de componentes principais (PCA).....	55
4.5 Competição entre os metais cobre e zinco por ligantes nas águas do Reservatório de Barra Bonita.....	62
5 CONCLUSÕES.....	66

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO E CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO DOS EXCRETADOS DE *Cylindrospermopsis raciborskii* FRENTE AOS METAIS Cu, Zn, Cd e Pb

6	INTRODUÇÃO.....	69
6.1	Importância das microalgas e cianobactérias na química de metais traço em ambientes aquáticos.....	70
7	OBJETIVOS.....	73
8	MATERIAL E MÉTODOS	74
8.1	Culturas de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> e obtenção dos excretados	74
8.2	Proporção dos elementos C, H, N e S.....	77
8.3	Composição bioquímica: carboidratos, proteínas e lipídios.....	78
8.4	Espectroscopia de fluorescência	78
8.5	Carbono total: carbono orgânico e inorgânico	78
8.6	Determinação da capacidade de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nos excretados de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	78
8.7	Titulação de competição entre os metais cobre e zinco, e cádmio e chumbo nos excretados das cianobactérias.....	79
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
9.1	Caracterização e capacidade de complexação dos excretados de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> frente aos metais Cu, Zn, Cd e Pb, considerando diferentes frações moleculares	80
9.2	Competição entre os metais cobre e zinco, e cádmio e chumbo nos excretados de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	89
10	CONCLUSÕES.....	94
11	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE.....	109

APRESENTAÇÃO

Esta pesquisa fundamenta-se na química analítica através da análise de traços, e unindo-se aos fatores do ambiente, incorpora atributos da química ambiental. Apresenta ainda uma vertente multidisciplinar ao considerar a biota planctônica fotossintetizante como agente efetivo e atuante na especiação dos metais em ambientes aquáticos.

Atualmente a contaminação de ecossistemas aquáticos localizados em áreas urbanas é ampla e apresenta múltiplas faces, incluindo fontes pontuais e difusas, industriais e agrícolas, na maioria das vezes de caráter crônico. É comum a introdução de compostos orgânicos sintéticos, aromáticos ou não, além de compostos inorgânicos, como os metais-traço. A contaminação advinda de águas residuárias, tais como efluentes de esgotos domésticos, que introduzem nutrientes e grande variedade de compostos orgânicos em diferentes estágios de degradação, constitui-se também em fonte de contaminação significativa para os ambientes aquáticos. Esse tipo de contaminação favorece florescimentos do fitoplâncton, principalmente microalgas e cianobactérias que, por sua vez, contribuem com o acúmulo de materiais orgânicos dissolvidos, nesse caso, recém produzidos. A grande maioria dos estudos de especiação de metais considera, principalmente, ambientes com caráter oligo- ou mesotrófico e com uma variedade única de contaminação, por exemplo, efluente doméstico ou industrial. Esta pesquisa se distingue por ter a especiação de metais traço como seu eixo central, mas considerando um ambiente sujeito ao efeito de grande variedade de contaminantes, oriundos de esgoto doméstico e descartes industriais e agrícolas, já que os afluentes do ambiente escolhido (Reservatório de Barra Bonita, SP) passam, principalmente, pelo município de São Paulo (Brasil), recebendo alta carga poluidora.

Compreender a dinâmica dos metais traço cádmio, chumbo, cobre e zinco, importantes contaminantes de origem industrial, em um ambiente com fontes de poluição tão diversas e ainda recebendo da biota planctônica fotossintetizante quantidade significativa de materiais orgânicos recentes, consiste em um desafio que requer perícia e, principalmente, habilidade de interpretação dos resultados.

Os ambientes aquáticos contaminados e eutróficos são normalmente caracterizados por ampla diversidade de materiais orgânicos como substâncias húmicas mais refratárias e materiais recém produzidos pelo fitoplâncton, de caráter mais lábil. Por ser pouco conhecido o papel desse material orgânico recente para o

ambiente, tanto em relação à labilidade microbiológica, quanto em relação ao seu efeito sobre a especiação dos metais e labilidade dos complexos formados, a extrapolação dos resultados de laboratório torna-se desafiadora. Procurando compreender como a matéria orgânica dissolvida (MOD) excretada pelo fitoplâncton contribui para a especiação dos metais, essa interação foi analisada em laboratório, assim como a composição bioquímica desses compostos. Os resultados são discutidos à luz das interações dos materiais orgânicos dissolvidos (húmicos e recentes) com os metais estudados.

Assim, para o desenvolvimento desta pesquisa, delineou-se um objetivo central, o de analisar a especiação dos metais traço cádmio, chumbo, cobre e zinco considerando a relação desses elementos com a MOD do reservatório e também com os excretados produzidos por uma cianobactéria comumente presente nos múltiplos florescimentos anuais que ocorrem no ambiente estudado. Para melhor organização, esta tese foi dividida em dois capítulos:

Capítulo 1: Especiação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita (SP).

Capítulo 2: Caracterização e capacidade de complexação dos excretados de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente aos metais Cu, Zn, Cd e Pb.

CAPÍTULO 1:

ESPECIAÇÃO DOS METAIS COBRE, ZINCO, CÁDMIO E CHUMBO NAS ÁGUAS DO RESERVATÓRIO DE BARRA BONITA (SP)

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional aliado ao acelerado processo de urbanização e industrialização, bem como de atividades agrícolas, aumentam os riscos de contaminação dos ambientes aquáticos (LIU et al., 2009), que vêm sofrendo um contínuo processo de degradação ambiental. Essa degradação altera a qualidade da água que, conseqüentemente, pode modificar a estrutura das comunidades aquáticas, assim como contribuir para o aumento da concentração de íons metálicos ao corpo hídrico (MILESI et al., 2008). A toxicidade de espécies metálicas dissolvidas para organismos aquáticos é relacionada à capacidade dessa espécie em atravessar membranas biológicas e interagir com sítios celulares importantes (FLORENCE, 1982; TEMPLETON et al., 2000).

Fontes naturais de metais em corpos aquáticos incluem o desgaste de rochas e solos através de intemperismo, assim como a ação direta dos corpos aquáticos sobre os solos e rochas (SCHEFFER, 2006). Fontes pontuais de contaminação por metais traço são intensas em regiões industrializadas e urbanizadas, além da contribuição difusa em áreas agrícolas (MILESI et al., 2008). As origens principais dos contaminantes ambientais são fertilizantes, pesticidas, emissões veiculares e resíduos orgânicos e inorgânicos (KAPLAN et al., 1988; MILESI et al., 2008). Esses contaminantes são transportados de um lugar para outro por via aérea ou através de precipitações úmidas (BAIRD, 2002; TOWN e FILELLA, 2002).

A água é um recurso vital indispensável à sociedade e ao ambiente, por isso sua qualidade, que pode ser representada por características intrínsecas de natureza física, química e biológica, assume grande importância na atualidade (ROSINI et al., 2006).

Dada à importância dos ambientes aquáticos, esforços têm sido feitos para a regulamentação e limitação da degradação desses ecossistemas. Muitas legislações reguladoras de concentrações de metais em descartes urbanos são baseadas no uso da concentração total. No entanto, muitos pesquisadores condenam esta abordagem. Florence (1982) defende que o uso da concentração total de metais não fornece informações sobre sua biodisponibilidade ou sua interação com sedimento e material particulado, e uma vez presente no ambiente, seu potencial tóxico é controlado por sua forma físico-química. Buffle e Tercier-Waeber (2005) completam afirmando que ao determinar apenas a concentração total não são obtidas informações sobre o impacto ecotoxicológico e o destino dos metais traço para a

biota aquática. Nos Estados Unidos, os padrões de qualidade da água são baseados na concentração solúvel do metal e não na sua concentração total (ALLEN e HANSEN, 1996; U.S.EPA, 1996). No Brasil, o CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, órgão oficial responsável pelo estabelecimento das normas e padrões relativos ao controle de qualidade ambiental, estabeleceu a concentração solúvel dos metais cobre e ferro na coluna d'água como base para o padrão de qualidade da água, embora para outros metais (e.g., cádmio, chumbo, zinco e arsênio), os padrões de qualidade ainda são fundamentados na concentração total (CONAMA, 2005). Ainda assim, as resoluções estabelecidas pelo CONAMA são instrumentos normativos importantes para a gestão ambiental em busca do desenvolvimento sustentável (ROSINI et al., 2006).

1.1 Importância dos metais traço cobre, zinco, cádmio e chumbo

Em adição aos nutrientes majoritários, certos elementos traço são usados como micronutrientes pela biota, influenciando a produtividade e composição de espécies em ambientes aquáticos. Para as microalgas e cianobactérias, íons metálicos essenciais como o cobre, zinco, ferro e manganês são requeridos para o perfeito funcionamento de diversos processos metabólicos, que são cuidadosamente regulados pela célula. Outros elementos, tais como o chumbo, mercúrio e arsênio, não têm função biológica conhecida e atuam como agentes tóxicos (KNAUER et al., 1997, 1998). Para os elementos traço há uma limitada faixa de concentração entre níveis essenciais e tóxicos (FLORENCE, 1982) e muitos desses efeitos dependem da forma em que os elementos estão presentes (TEMPLETON et al., 2000; WORMS et al., 2006). Portanto, os elementos traço apresentam potencial risco ambiental, quer em razão do seu uso intenso, toxicidade e/ou distribuição (BAIRD, 2002; FLORENCE, 1982; TOWN e FILELLA, 2002).

A escolha dos metais para realização deste trabalho foi criteriosa. Cobre e zinco são micronutrientes essenciais para organismos aquáticos, porém em concentrações pouco acima das usualmente encontradas, por exemplo, 10^{-8} mol L⁻¹ (SANTOS et al., 2008), são tóxicos (MEYLAN et al., 2003; TEMPLETON et al., 2000). Segundo Lorenzo et al. (2007), cobre é considerado um dos metais mais tóxicos para organismos aquáticos, especialmente para o fitoplâncton. Cádmio e chumbo podem inibir o crescimento ou provocar a morte dos organismos (BUFFLE e TERCIER-WAEBER, 2005; FLORENCE, 1982). Além disso, de acordo com

Santana-Casiano et al. (1995), o chumbo é conhecido por substituir nutrientes metálicos nos sítios de coordenação de moléculas biológicas, alterando o funcionamento metabólico natural.

1.2 Especiação de metais nos ambientes aquáticos

Existe uma grande variedade de espécies químicas de metais traço em águas naturais, das quais nem todas são igualmente tóxicas ou biodisponíveis (TEMPLETON et al., 2000; WARREN e HAAK 2001). As associações de metais são dinâmicas e reversíveis, refletidas pelas mudanças nas condições físico-químicas do ambiente (WARREN e HAAK 2001). Diversos autores destacam a importância de estudos de especiação de metais. Em águas naturais As (III) e As (V) são tóxicos e as formas metiladas, monometilarsenato e dimetilarsenato, são cerca de 100 vezes menos tóxicas que as formas inorgânicas (DE CARVALHO et al., 2004). Cromo (III) é um elemento traço essencial envolvido com o metabolismo da glicose, lipídios e proteínas, enquanto Cr (VI) é tóxico para os sistemas biológicos (KOTAS e STASICKA, 2000).

Estudos com o fitoplâncton são particularmente importantes, pois a relação entre esses organismos e os metais é direta, ou seja, ocorre através da parede celular. Além disso, o fitoplâncton constitui a base de cadeias alimentares, suportando toda a teia trófica nos ambientes aquáticos. Lombardi et al. (2007) observaram que a toxicidade do cobre para algas está fortemente relacionada com a concentração de íons livre. Meylan et al. (2004) avaliaram a bioacumulação de cobre e zinco por algas em resposta a diferentes concentrações desses elementos e concluíram que a bioacumulação de zinco variou em função da concentração do metal livre, enquanto a bioacumulação do cobre foi controlada tanto por complexos fracos, incluindo complexos inorgânicos, como também por íons livre.

A análise de especiação consiste na identificação e determinação de diferentes formas e espécies em que o elemento está presente na água. A especiação pode ser classificada em física e química. A especiação física distingue o metal entre a fração dissolvida e particulada, enquanto a especiação química avalia a distribuição do metal entre as formas complexada ou não-complexada e entre diferentes estados de oxidação (TWISS et al., 2000). Dessa forma, a especiação dos elementos relaciona-se diretamente com o transporte,

biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua toxicidade (BATLEY et al., 2004; TEMPLETON et al., 2000; TWISS et al., 2001).

Uma característica importante da contaminação por metais nos ecossistemas aquáticos é que esses elementos não são biodegradáveis e, portanto, acumulam-se no ambiente (FLORENCE, 1982). Geralmente os metais atingem o ecossistema aquático através de uma contaminação crônica e uma vez presente, o potencial tóxico é controlado por sua especiação (FLORENCE, 1982), cujos efeitos na biota são sentidos ao longo do tempo (TOWN e FILELLA, 2002).

A distribuição de metais na coluna d'água é influenciada por diversos fenômenos físico-químicos tais como complexação por ligantes orgânicos e inorgânicos, dessorção, precipitação, redissolução, adsorção por oxi-hidróxidos metálicos e argilominerais, além das reações de troca que ocorrem na interface água-sedimento (SCHEFFER et al., 2007). Microrganismos aquáticos, principalmente as algas, controlam a concentração de diversos elementos traço para alguns corpos aquáticos e têm importante papel no carreamento do metal traço da superfície para o sedimento (KNAUER, 1996). A FIGURA 1.1 representa, de maneira resumida, as reações de metais com os diferentes constituintes presentes no ambiente aquático.

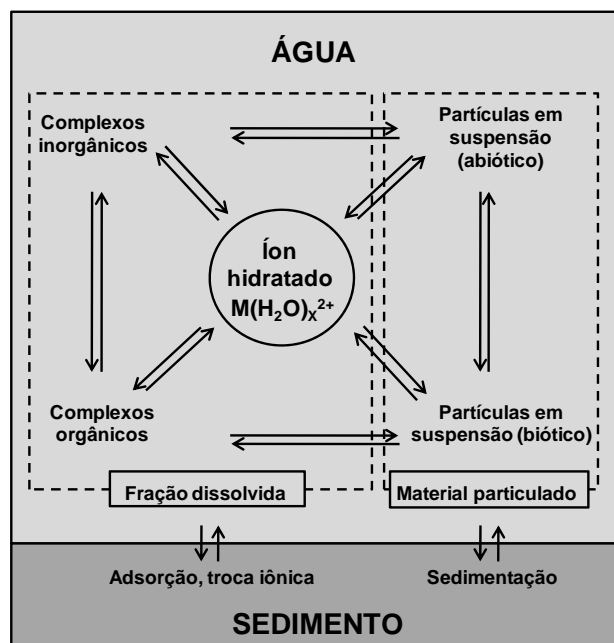


FIGURA 1.1 Esquema representativo das reações de metais com diferentes constituintes no ambiente aquático. Adaptado a partir de BUFFLE, 1988.

Em ambientes aquáticos os metais podem ser complexados por diversas espécies químicas como ânions inorgânicos (HCO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , HS^- , Cl^- , OH^-),

ligantes orgânicos (aminoácidos, carboidratos, ácidos húmicos e fúlvicos) e partículas (óxidos de Fe e Mn, material biológico) (ALLEN e HANSEN, 1996; TWISS et al., 2000, 2001). A separação das frações dissolvida e particulada é operacional e dependente das condições de fracionamento e/ou filtração. O termo material particulado refere-se aos materiais agregados maiores do que o diâmetro do poro usado no processo de fracionamento, incluindo componentes bióticos e abióticos (FLORENCE, 1982; PERDUE e RITCHIE, 2003; TEMPLETON et al., 2000). Na maioria dos sistemas, o material particulado em suspensão caracteriza-se pela grande diversidade de composição e representa algumas combinações de materiais inorgânicos como argila, oxi-hidróxidos metálicos e matéria orgânica (MO), incluindo organismos vivos e detritos, além de partículas inorgânicas recobertas pela MO (SIGG, 1998; STUMM e MORGAN, 1996). Segundo Florence (1982), “filtrável” é o termo apropriado para a fração dissolvida, uma vez que coloides também são contabilizados. A fração lábil, presente na fase dissolvida, corresponde à soma de íons metálicos hidratados, associados a complexos fracos e adsorvidos fracamente nas partículas coloidais (LENOBLE et al., 2008). A concentração do metal livre (íon hidratado) é regulada pela concentração de ligantes em solução e pela complexação dos ligantes inorgânicos e orgânicos nas partículas superficiais (KNAUER, 1996).

A biodisponibilidade e a toxicidade de íons metálicos para organismos aquáticos relacionam-se com a concentração de íons hidratados livre e complexos fracos presentes na fração dissolvida (LOMBARDI et al., 2007). Entretanto, a especiação dos elementos em solução é predominantemente controlada pelas interações com sítios de coordenação ativos da matéria orgânica dissolvida (MOD). Na maioria dos casos, interações de metais com a MOD, complexos fortes e espécies associadas ao material particulado em suspensão são de baixa ou nenhuma toxicidade (ALLEN e HANSEN, 1996; LOUIS et al., 2008). Além disso, variações sazonais na produção primária, concentração, pH e variações nas condições físico-químicas influenciam a ligação dos elementos traço com o material particulado e ligantes na fração dissolvida, afetando diretamente sua biodisponibilidade e toxicidade (GUNDERSEN e STEINNES, 2003; TEMPLETON et al., 2000). De acordo com Allen e Hansen (1996) e Florence (1986) estudos de toxicidade de metais para organismos aquáticos mostram que além do metal livre (Cu^{2+}), cobre presente na forma de CuOH^+ e CuCl_2 são formas tóxicas. Lalah e Wandiga (2007) e Xue e Sigg (1998) estudaram a complexação de cobre e cádmio

pela MOD em ambientes aquáticos e, segundo os autores, o estudo da especiação foi imprescindível para avaliar a toxicidade dos metais para o ecossistema. Kozelka et al. (1997) avaliaram a especiação do chumbo e concluíram que 98% do metal estava associado ao material particulado e apenas 2% estava complexado por ligantes orgânicos, o que resultou na redução da concentração de Pb^{2+} (10^{-12} mol L⁻¹).

Nos ambientes aquáticos observa-se uma capacidade de tamponamento da concentração de metais, reduzindo (ou alterando) seus efeitos tóxicos. Isso ocorre devido à presença de ligantes naturais, que complexam os metais com diferentes labilidades relativas (ROCHA e ROSA, 2003). Devido à natureza hidrofílica e elevada massa molecular da MOD natural, seus complexos metálicos tornam-se menos biodisponíveis e, conseqüentemente, menos tóxicos. Isso ocorre porque encontram dificuldades de penetração através das membranas celulares do fitoplâncton, primeiro nível trófico de cadeias alimentares aquáticas (LORENZO et al., 2007).

Nos ambientes aquáticos, a MO está presente como moléculas dissolvidas, coloides e partículas (PERDUE e RITCHIE, 2003). Assim como a fração dissolvida dos metais, a MOD natural também é operacionalmente definida, e de acordo com a maioria dos trabalhos da literatura, é considerada como a fração da MO que atravessa uma membrana de 0,45 ou 0,22 μ m de diâmetro de poro. A MOD é resultante de uma mistura complexa de compostos orgânicos, cada qual com uma composição elementar, massa molecular e propriedades físico-químicas distintas, que dependem da idade e origem do material constituinte (LENOBLE et al., 2008; PERDUE e RITCHIE, 2003). Cerca de 20% da MOD consiste de compostos orgânicos com estruturas químicas definidas, tais como carboidratos, aminoácidos e hidrocarbonetos (ROSA et al., 2007). Os 80% restantes correspondem à MO detrítica, pertencentes a um grupo de estrutura química indefinida (ROSA et al., 2007), com tempo de residência mais longo no ambiente e relativamente resistente à degradação, podendo ser referida como matéria orgânica quasi-refratária (BUFFLE, 1988). Os principais constituintes dessa MOD e globalmente distribuídos nos ambientes aquáticos e terrestres são definidos operacionalmente como substâncias húmicas (SH).

As substâncias húmicas são formadas por processos físico-químicos e microbiológicos, incluindo a decomposição de resíduos de plantas e animais, sendo

constituídas por uma grande variedade de estruturas alifáticas e aromáticas (ROCHA e ROSA 2003; ROSA et al., 2007). O alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio na forma de carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas conferem às SH um papel importante na reatividade e transporte de espécies orgânicas e inorgânicas. A alta capacidade complexante das substâncias húmicas aquáticas (SHA) pode alterar a biodisponibilidade e os efeitos tóxicos de metais nos ecossistemas aquáticos. Os complexos formados entre SHA e espécies metálicas possuem diferentes estabilidades, as quais são dependentes do pH, número de átomos envolvidos na ligação com o metal, a natureza e a concentração do íon metálico, força iônica, características e concentração da SHA e tempo de complexação (ARAÚJO et al., 2002; BUFFLE, 1988; ROSA et al., 2007).

Em águas naturais, à capacidade dos ligantes antrópicos e naturais em complexar metais e alterar seus efeitos tóxicos, atribuí-se o termo capacidade de complexação da água (CC) (FLORENCE, 1986). A CC é, portanto, um importante parâmetro de qualidade da água. Conceitualmente é definida como a concentração do íon metálico, que pode ser adicionado a um corpo aquático sem que a espécie iônica seja predominante (FLORENCE, 1986) ou, segundo Neubecker e Allen (1983) como a concentração total de ligantes disponíveis para complexação.

Tem sido demonstrado que os complexos metálicos formados entre a MOD e os íons metálicos ocorrem na razão 1:1 (LORENZO et al., 2007; XUE e SIGG, 1998; XUE et al., 1995) e 2:1 (ACHERBERG et al., 1997). No entanto, qual é de fato a quantidade de sítios disponíveis para os metais e suas respectivas forças de associação com a MOD, é ainda incerto na literatura. A partir de titulações da amostra de água, os parâmetros de complexação, isto é, a concentração de ligantes disponíveis (C_L) e a constante de estabilidade condicional do complexo metal-ligante (K'_{ML}), podem ser obtidos. Para tanto, modelos envolvendo linearização e relações de balanço de massas são usados (RUZIC, 1982).

1.3 Técnicas analíticas empregadas no estudo da especiação de metais

Estudos de especiação de metais traço requerem o uso de técnicas analíticas capazes de detectar baixas concentrações dos elementos, uma vez que naturalmente estão presentes em concentrações diminutas, e estas ainda serão fracionadas durante o estudo. Para o sucesso da análise química, a escolha de uma técnica analítica para determinação de metais traço requer um claro entendimento

sobre as capacidades e as limitações das diferentes opções disponíveis (VANDERCASTEELE e BLOCK, 1993). É imprescindível que a amostragem, transporte, armazenamento e preparo da amostra sejam cautelosos e considerados como a primeira etapa da análise química, no sentido da preservação e cuidados com contaminação. Em análise de traços, a contaminação pode assumir uma grande proporção da concentração total dos metais presentes na amostra. A escolha do método de preparo da amostra e do equipamento a ser utilizado para quantificação final dependerá de uma série de fatores, tais como: disponibilidade, adaptabilidade, tempo de análise, custos envolvidos, seletividade ou especificidade, faixa linear, repetibilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e quantificação, dentre outros (SKOOG et al., 2002).

Diversos métodos são disponíveis para estudos de especiação de metais, dentre eles, cita-se os métodos eletroquímicos (redissolução anódica, catódica e potenciometria), além de determinações analíticas após procedimentos de separação baseados em troca iônica, competição por ligantes, extração líquida, diálise, ultrafiltração, dentre outros (OMANOVIC et al., 1996).

Técnicas eletroanalíticas são extensivamente usadas em estudos de águas naturais (WANG e CHAKRABARTI, 2008), pois são consideradas técnicas simples e de baixo custo. A titulação potenciométrica, que mede a concentração do íon hidratado livre em solução, espécie relevante nos estudos de toxicidade (PICKERING, 2002) também é uma técnica usada com frequência em estudos de especiação de metais (LOMBARDI et al., 2007; RODGHER et al., 2008; XUE e SIGG, 1999). Diversos tipos de eletrodos seletivos (ISE) são comercializados para detecção de íons específicos como, por exemplo, aos cátions H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} ou ânions F^- , Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- e CN^- (PICKERING, 2002). O limite de detecção para a maioria dos eletrodos varia de 10^{-2} a 10^{-7} mol L^{-1} (BATLEY et al., 2004). No entanto, princípios dinâmicos tais como o emprego de tampões metálicos têm sido aplicados e contribuem para a obtenção de melhores limites de detecção chegando a 10^{-13} mol L^{-1} para eletrodos de cobre (AVDEEF et al., 1983) e cádmio (BAKKER e PRETSCH, 2005).

A voltametria compreende um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais a informação sobre o analito é obtida através de medidas de corrente em função do potencial aplicado e em condições que estimulam a polarização de um eletrodo indicador ou de trabalho (SKOOG et al., 2002). A polarografia, um tipo particular de

voltametria, é caracterizada pela utilização de um eletrodo de trabalho que tem a forma de um eletrodo gotejante de mercúrio (SKOOG et al., 2002). Dentre as técnicas voltamétricas empregadas para a determinação da especiação de metais em águas naturais, as principais são a voltametria de redissolução anódica (DPASV) e a voltametria de redissolução catódica (DPCSV), ambas de pulso diferencial, que exibem seletividade para espécies lábeis. Muitas são as vantagens dessa técnica, dentre as quais pode-se citar a grande variedade de elementos passíveis de determinação (mais de 30) e a inserção de uma etapa de pré-concentração quando o analito estiver presente em concentrações próximas de 10^{-9} – 10^{-12} mol L⁻¹ (PICKERING, 2002). A DPASV, usada na análise de especiação deste trabalho, alcança limites de detecção compatíveis com a concentração de metais normalmente encontrada nos ecossistemas aquáticos, ou seja, concentrações totais inferiores a 10^{-7} – 10^{-8} mol L⁻¹ (SKOOG et al., 2002), chegando até 10^{-11} mol L⁻¹ (BUFFLE e TERCIER-WAEBER, 2005; FLORENCE, 1982).

A principal vantagem da voltametria em relação às outras técnicas é a possibilidade de análise da amostra com pouca ou nenhuma etapa de extração e/ou separação (FLORENCE, 1982). Tais etapas aumentam os riscos de contaminação e de alteração das espécies químicas presentes, além daquelas já introduzidas através do processo amostral. Consequentemente, desvios na concentração dos elementos e, portanto, erros na exatidão da determinação da concentração dos metais são gerados. Essa técnica é capaz de fornecer dados quantitativos com os limites de detecção necessários e elevada sensibilidade analítica (BRULAND et al., 2000; FLORENCE, 1986), além de apresentar boa correlação com a disponibilidade biológica da espécie metálica (SIGG et al., 2006; XUE e SIGG, 1998). Além da concentração total e total dissolvida, a DPASV é uma técnica capaz de reconhecer o metal complexado pela medida direta da fração lábil (TONIETTO, 2006; TONIETTO e GRASSI, submetido).

Para determinar a concentração de metais através da técnica de gradiente difusivo em filmes finos (DGT), as espécies metálicas presentes em águas naturais sofrem difusão através de um gel (DAVISON e ZHANG, 1994). A técnica difusiva de equilíbrio em filme fino (DET) e a técnica de membrana Donnan (DMT) são baseadas na difusão do metal através de uma membrana. A técnica de microeletrodo integrado a gel (GIME) é caracterizada pelo tempo de acúmulo do

metal em um eletrodo, ou pelo tempo de acúmulo do metal em uma resina após processo de difusão em gel (DGT) (VAN LEEUWEN et al., 2005).

Técnicas espectroanalíticas, como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) e a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), possuem baixo limite de detecção e são amplamente utilizadas para análise de metais traço em águas (PESAVENTO et al., 2009). A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a GFAAS são técnicas monoelementares e de fácil operação. Estas técnicas caracterizam-se pelo mesmo tipo de instrumentação, diferindo no tipo de atomizador, sendo uma chama para FAAS e um tubo de grafite pirolítico para GFAAS. Na FAAS dois fatores afetam negativamente a sensibilidade da técnica, grande parte da amostra introduzida é perdida devido ao ineficiente processo de nebulização e o tempo médio de residência dos átomos gasosos na região de observação é baixo, por isso é uma técnica ideal para a determinação de concentrações da ordem de 10^{-6} – 10^{-7} mol L⁻¹. No entanto, a GFAAS apresenta limites de detecção da ordem de 10^{-9} – 10^{-10} mol L⁻¹. A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e a ICP-MS são técnicas multielementares, sendo a primeira capaz de determinar mais de 70 elementos e a segunda, no modo qualitativo de análise, capaz de estimar praticamente toda a tabela periódica. A ICP OES pode ser empregada com configuração radial ou axial, e dependendo do arranjo instrumental, assim como a ICP-MS, pode chegar a limites de detecção na ordem de 10^{-9} – 10^{-10} mol L⁻¹, porém determinações nas faixas de 10^{-6} – 10^{-7} mol L⁻¹ são mais frequentes (ROSINI et al., 2006).

Nos estudos de especiação é comum o emprego de várias técnicas, cada qual para a determinação de espécies distintas do metal de interesse. Wang e Chakrabarti (2008) realizaram análise da especiação de cobre em águas naturais utilizando DPASV aliada à técnica de troca por ligante de competição (CLE-DPASV) e ICP-MS para determinar a concentração total. Meylan et al. (2003, 2004) determinaram as concentrações de cobre e zinco em águas naturais sendo que a fração dissolvida foi determinada por ICP-MS, enquanto a fração lábil de zinco através da troca com EDTA por DPASV e o cobre lábil através da troca com catecol por DPCSV. Twiss e Moffett (2002) utilizaram o DGT para avaliar a concentração de cobre em locais com diferentes graus de poluição. Fontenele et al. (2009) investigaram a determinação de cobre, cádmio e chumbo nas águas de chuva da

cidade de São Paulo utilizando a DPASV e obtiveram limites de detecção de $7,8 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (Cu), $1,9 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (Pb) e $8,9 \cdot 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$ (Cd).

Com base nos aspectos apresentados, nota-se que as diversas técnicas apresentam peculiaridades distintas, o que pode resultar em interpretações distintas. Apesar disso, tem-se demonstrado que a toxicidade dos metais é reduzida em função da formação de precipitados e complexos com ligantes orgânicos naturais. Assim, as informações geradas neste trabalho representam uma importante contribuição para pesquisas relacionadas ao ambiente e para a gestão de ecossistemas aquáticos, evidenciando como a especiação química de metais pode ser utilizada no estabelecimento e aprimoramento dos padrões de qualidade desses ambientes.

2 OBJETIVOS

Esta parte do estudo teve como objetivo principal avaliar a especiação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita (SP), assim como avaliar a interação desses quatro metais com a MOD. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- i. Verificar o efeito da sazonalidade (inverno seco e verão chuvoso) na especiação e capacidade de complexação (CC) dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo;
- ii. Caracterizar o corpo aquático estudado, através de coletas sazonais, abrangendo parâmetros físico-químicos que avaliam a qualidade da água e são relevantes à especiação dos metais;
- iii. Caracterizar a MOD através de fluorescência de emissão e de excitação sincronizada;
- iv. Avaliar a competição entre os metais cobre e zinco por ligantes nas amostras de água do reservatório.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O local de estudo e amostragem foi o Reservatório de Barra Bonita (FIGURA 3.1), que está localizado na Bacia do Médio Tietê, na região central do Estado de São Paulo (PANHOTA et al., 2007), entre os municípios de Igarçu e Barra Bonita (22°29' a 22°44'S e 48°10' a 48°34'O), a uma altitude de 430 m (DELLAMANO-OLIVEIRA et al., 2007). A barragem foi construída em 1963, e faz parte do complexo de seis barragens do rio Tietê. O reservatório é formado a partir do represamento dos rios Tietê e Piracicaba e recebe cerca de 114 tributários. Este reservatório tem capacidade para armazenar $3,16 \times 10^9$ m³ de água, em 324,84 km² de área inundada, num comprimento de 480m e perímetro de 525 km. Apresenta profundidade média de 10,2 m e máxima de 25 m (DELLAMANO-OLIVEIRA et al., 2007; MATSUMURA-TUNDISI e TUNDISI, 2005), sendo considerado um dos mais profundos do Estado de São Paulo (CALIJURI e DOS SANTOS, 1996).

Construído inicialmente para a produção de energia elétrica, atualmente é utilizado também para transporte fluvial (Hidrovia Tietê-Paraná), irrigação, turismo, lazer, pesca, abastecimento urbano e suporte ao desenvolvimento industrial da região (PRADO e NOVO, 2007; TUNDISI et al., 2008).

A bacia hidrográfica de contribuição para o Reservatório de Barra Bonita é constituída por parte das bacias hidrográficas Piracicaba/Capivari/Jundiá (BHPCJ) e Tietê/Sorocaba (BHTS), trata-se de uma das regiões mais populosas e desenvolvidas do interior do Estado de São Paulo, concentrando cerca de 16% de sua população. Os problemas referentes à qualidade da água advindos do uso e cobertura da terra são bastante representativos da realidade de toda a extensão da BHPCJ e BHTS (PRADO e NOVO, 2007).

Este reservatório está situado geograficamente numa área de transição entre climas tropicais e subtropicais, com estações chuvosas de outubro a fevereiro (primavera/verão) e estações secas de março a setembro (outono/inverno) (PANHOTA et al., 2007; TUNDISI et al., 2008). Durante o verão (estação chuvosa) o fluxo de água é de aproximadamente 1500 m³ s⁻¹ e no inverno (estação seca) é de 200 m³ s⁻¹ (MATSUMURA-TUNDISI e TUNDISI, 2005). A direção dos ventos coincide com o eixo longitudinal do reservatório, predominando os ventos leste e sudeste de acordo com dados fornecidos pela AES Tietê - UHE Barra Bonita

(VIEIRA et al., 2008). O tempo médio de retenção do reservatório é dado principalmente pelo fluxo de água, sendo no inverno de 90 - 150 dias e no verão de 30 - 75 dias (DELLAMANO-OLIVEIRA et al., 2008; TUNDISI et al., 2008).

As rochas predominantes nessa região são basálticas (CALIJURI et al., 2002; FIORIO e DEMATTÊ, 2009) e a drenagem de Barra Bonita é predominantemente constituída por latossolo roxo (CALIJURI et al., 2002). A vegetação nessa região é constituída por monocultura de cana-de-açúcar (CALIJURI et al., 2002; PRADO et al., 2007). A FIGURA 3.1 mostra a localização geográfica do local de estudo, onde foram realizadas as amostragens.

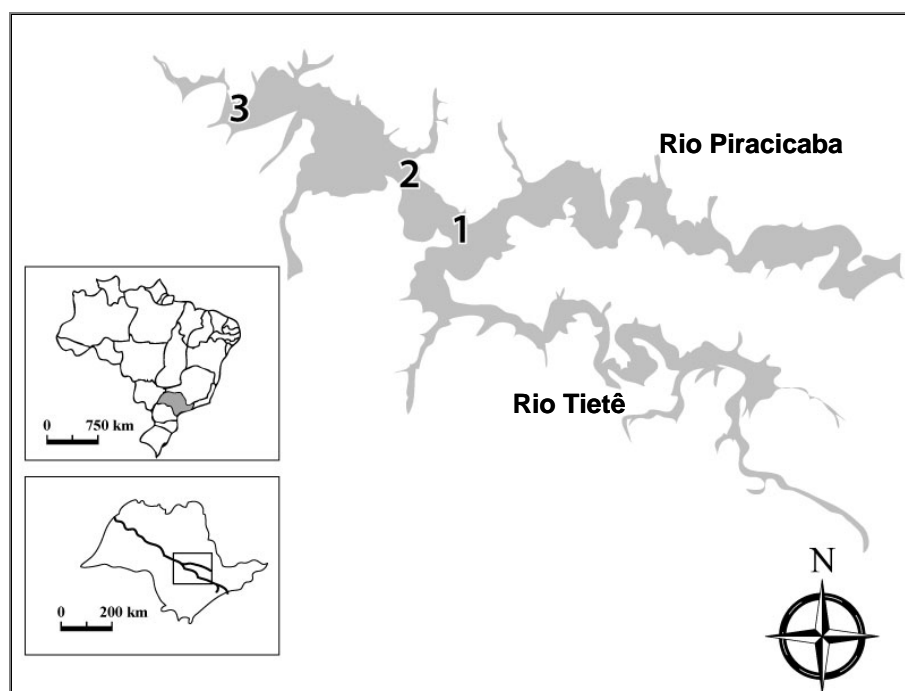


FIGURA 3.1 Localização geográfica do Reservatório de Barra Bonita (SP) ilustrando os pontos de coleta.

Coletaram-se amostras de água superficial nos três pontos ao longo do reservatório (FIGURA 3.1), nos meses de agosto de 2007, novembro de 2007, julho de 2008 e janeiro de 2009. Como mostra a FIGURA 3.1, o ponto 1 ($22^{\circ}37.167'S$ e $48^{\circ}20.326'O$) localiza-se na junção dos rios Tietê e Piracicaba, sendo portanto o ponto amostral de maior influência quanto à contribuição antrópica dos afluentes. O ponto 2 ($22^{\circ}35.442'S$ e $48^{\circ}22.469'O$) está localizado próximo ao centro do reservatório, onde provavelmente já se completa a mistura das águas dos principais afluentes. O ponto 3 ($22^{\circ}32.857'S$ e $48^{\circ}29.124'O$) situa-se no final do reservatório, a cerca de 3 km da barragem, área de menor agitação no reservatório.

Localizado a 300 km da cidade de São Paulo, o Reservatório de Barra Bonita está inserido na região mais populosa e industrializada da América Latina (FONTENELE et al., 2009) e recebe altas cargas de descartes industriais, domésticos e efluentes agrícolas (SOTERO-SANTOS et al., 2006). É considerado um ecossistema polimítico, eutrófico (CETESB, 2007, 2008), onde as altas concentrações de nutrientes contribuem para o desenvolvimento de constantes florações do fitoplâncton (DELLAMANO-OLIVEIRA et al., 2007; VIEIRA et al., 2008), que estão associadas a ocorrência de toxicidade nas águas do reservatório (CETESB, 2008).

3.2 Técnicas limpas

Devido às baixas concentrações dos metais traço encontrados em ambientes aquáticos naturais, procedimentos foram adotados para evitar contaminações originadas durante as etapas de coleta, preservação e análise. Desta forma foram empregados procedimentos fundamentados no uso de técnicas limpas (BENOIT et al., 1997; CAMPOS et al., 2002) em todas as etapas envolvidas na realização deste trabalho.

Em todo o manuseio dos materiais, reagentes e amostras foram utilizadas luvas cirúrgicas descartáveis (sem talco) e bandejas plásticas, previamente lavadas, evitando-se o contato direto de qualquer material com a bancada.

Todo material empregado na coleta, preservação e análise, foi lavado com água corrente e detergente comercial incolor, com o objetivo de remover resíduos orgânicos. Em seguida, foram enxaguados e deixados em banho de detergente comercial 5% (V/V) durante uma semana. Após este período, os materiais foram retirados do banho de detergente e enxaguados três vezes com água de torneira e três vezes com água destilada. Em seguida, foram imersos em banho de HNO_3 0,1 mol L^{-1} (J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, México) por, no mínimo, uma semana. Finalmente, os materiais foram retirados do banho de ácido e enxaguados três vezes com água destilada e deionizada (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA). Tanto o banho de detergente quanto o de ácido foram preparados em recipientes plásticos com tampa. Todos os materiais foram inteiramente imersos nos banhos, pois a limpeza externa do material é tão importante quanto à interna. Os frascos de coleta foram preenchidos completamente com solução HNO_3 0,1 mol L^{-1} ,

preparada em água destilada e deionizada (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA), e armazenados em sacos plásticos duplos (U.S.EPA, 1996).

3.2.1 Coleta e manipulação das amostras

Todas as amostras de água do reservatório foram coletadas com o auxílio de um balde de polietileno previamente ambientado com a própria água a ser coletada. As amostras foram cuidadosamente transferidas para frascos de polietileno previamente ambientados (U.S.EPA, 1996). Em cada ponto de coleta foram utilizados frascos com capacidade para armazenar 5 L de amostra. Os frascos contendo as amostras de água foram duplamente ensacados e armazenados em caixa de isopor preenchida com gelo. As amostras foram mantidas resfriadas durante todo o trabalho de campo para evitar a dessorção de metais do material particulado para a solução (CAMPOS et al., 2002) e também para minimizar a atividade biológica. Durante todo o período de amostragem foram utilizadas luvas cirúrgicas descartáveis sem talco.

As análises tiveram início aproximadamente 2 horas após a coleta, tempo necessário para se chegar ao laboratório na UFSCar. No laboratório, as amostras foram imediatamente filtradas a vácuo em sistema fechado previamente lavado e autoclavado. Para restringir qualquer contaminação por microrganismos e/ou material particulado esta etapa foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal (VLFS-12, VECO).

A filtração foi conduzida em membranas de acetato de celulose com 0,22 μm de porosidade (Sartorius Stedim Biotech, Germany) para separar a fração dissolvida da particulada. As membranas foram imersas em HNO_3 1 mol L^{-1} e em seguida lavadas com água destilada e deionizada (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA) como descrito por Rodgher et al. (2008). Alíquotas reservadas para a determinação das concentrações total e total dissolvida dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo na amostra *in natura* e filtrada, respectivamente, foram imediatamente acidificadas com HNO_3 ultra-puro (TraceSelect, Fluka Biochemika) até $\text{pH} = 2$. No entanto, alíquotas da amostra filtrada em membrana de 0,22 μm de poro foram mantidas em pH natural para determinação da concentração lábil. Em seguida, todas as amostras foram preservadas em refrigerador (4 °C) no escuro, até a realização das análises (CAMPOS et al., 2002). Os reagentes utilizados neste

trabalho eram ultra-puro, e no preparo de todas as soluções foi utilizada água destilada e deionizada (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA).

3.3 Especificação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo

A análise de especificação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo foi realizada utilizando a voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (DPASV). A análise de especificação consistiu na determinação das concentrações total, total dissolvida e lábil. O procedimento experimental adotado para a especificação dos quatro metais encontra-se esquematizado na FIGURA 3.2.

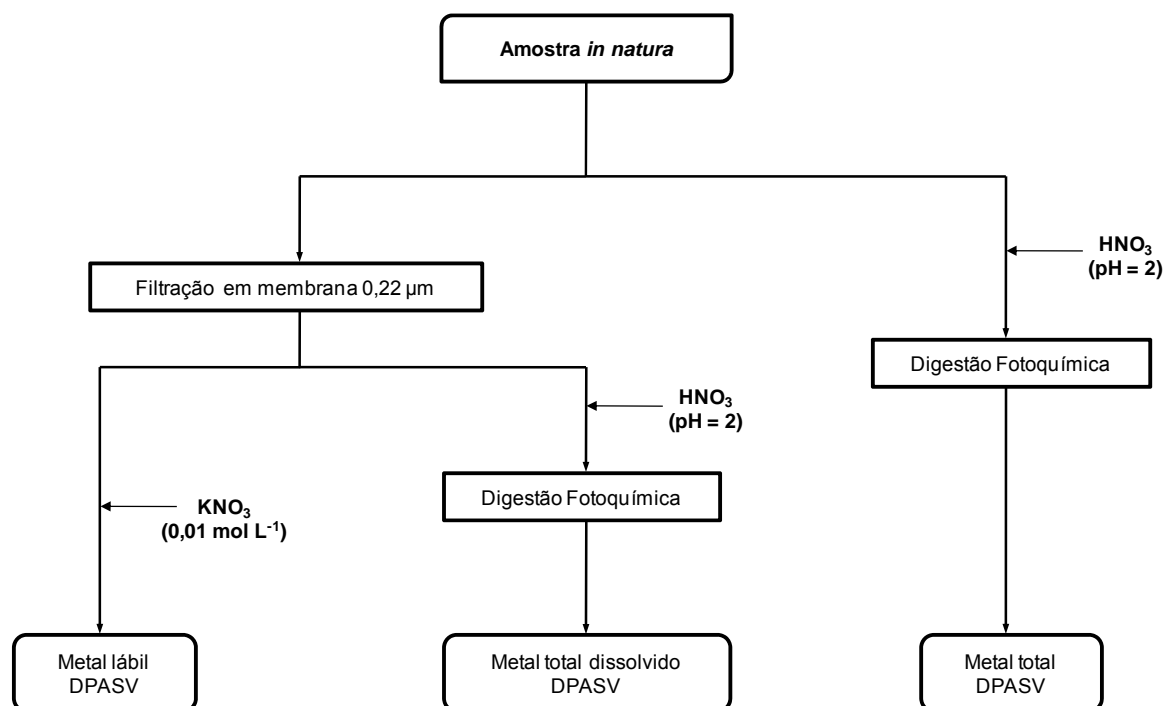


FIGURA 3.2 Fluxograma do procedimento analítico adotado para a análise de especificação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita.

Para a determinação das concentrações total e total dissolvida dos metais, alíquotas previamente acidificadas das amostras *in natura* e filtrada, respectivamente, foram digeridas utilizando o procedimento descrito por Sodré et al. (2004).

O procedimento de digestão baseia-se na ação da radiação ultravioleta gerada em um reator (UV LAB EL 10, UMEX, Dresden, Germany) ativado por micro-ondas. Uma alíquota de 12 mL da amostra filtrada e acidificada foi transferida para o reator, sendo em seguida adicionados 20 µL de H₂O₂ 30% (grau analítico, Merck) e inserido em forno micro-ondas (Electrolux ME21S). Durante a digestão foram empregados três ciclos de dois minutos de irradiação, utilizando-se a potência

máxima nominal do forno micro-ondas, de cerca de 900 W. Para a alíquota da amostra total foi realizado o mesmo procedimento descrito para fração dissolvida. Porém, era realizada uma nova adição de 20 μL de H_2O_2 30% (grau analítico, Merck) após os três primeiros ciclos de digestão. Em seguida eram realizados mais três ciclos de digestão, de dois minutos cada. Um béquer contendo aproximadamente 1 L de água foi colocado no forno juntamente com o reator para dispersar o calor gerado e evitar perdas por ebulição da amostra. Entre cada ciclo de irradiação a água contida no béquer era substituída e o reator permanecia em banho de gelo por aproximadamente 20 minutos (SODRÉ et al., 2004).

Após digestão, a determinação das concentrações total e total dissolvida dos quatro metais foi efetuada pelo método de adição de padrão, e a fração lábil através de titulação, empregando um potenciostato (EG&G Instruments, Princeton Applied Research, Model 394) acoplado a um sistema de eletrodos (EG&G PARC, Model 303A, SMDE) utilizando o modo gota pendente de mercúrio. Este eletrodo foi utilizado com tamanho médio de gota e no modo HMDE (*hanging mercury drop electrode*). O potencial foi medido entre o eletrodo de trabalho de mercúrio e um eletrodo de referência Ag/AgCl, tendo como auxiliar um eletrodo de platina.

3.3.1 Determinação da capacidade de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita

As concentrações lábeis dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo foram determinadas, separadamente para cada metal, por meio de titulações de amostras filtradas em membrana de 0,22 μm de poro (Sartorius Stedim Biotech, Germany), em pH natural, empregando-se DPASV.

Para a titulação, utilizou-se 10 mL da amostra de água filtrada, onde foi inicialmente adicionado 0,01 mol L^{-1} de KNO_3 (Merck) como eletrólito de suporte e para ajuste da força iônica. Os parâmetros utilizados no polarógrafo para a titulação da capacidade de complexação dos metais estão descritos na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 Parâmetros utilizados para a titulação da capacidade de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo.

Parâmetros	Cobre	Zinco	Chumbo	Cádmio
E_{dep} (V)	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2
E_i (V)	-0,6	-1,2	-0,8	-1,0
E_f (V)	0,15	-0,6	0,0	-0,4
t_{dep} (minutos)	10	10	10	10
$t_{equilíbrio}$ (minutos)	20	20	20	20
Purga entre as adições (minutos)	2	2	2	2
Força iônica (I) (mol L ⁻¹)	0,01	0,01	0,01	0,01
Amplitude do pulso (mV)	50	50	50	50
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	8	8	8	8

As titulações foram realizadas utilizando padrões comerciais de cobre, zinco, cádmio e chumbo contendo 7,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 7,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 4,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente e as adições variavam de 2 μL até 200 μL , dependendo do metal. Após a adição de padrão na amostra, esta permanecia em equilíbrio durante 20 minutos (CAPODAGLIO et al., 2002 *apud* MYLON et al., 2003) para que se completasse a complexação dos ligantes disponíveis ao metal. As soluções padrão de Cu(II), Zn(II), Cd(II) e Pb(II) foram preparadas a partir da diluição da solução padrão de 1000 mg L⁻¹ (Titrisol, Merck, Darmstadt, Germany).

As características de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo, *e.g.*, metais complexados ([ML]) aos ligantes disponíveis e a concentração desses metais na forma lábil ([Mlábil]) foram determinadas por DPASV. A partir destes valores, a constante de estabilidade condicional (K'_{ML}) e a concentração de ligantes disponíveis (C_L) foram calculadas através da aplicação do Método de Linearização de Ruzic (MYLON et al., 2003; RUZIC, 1982) como mostrado na Equação 3.1.

$$\frac{[Mlábil]}{[ML]} = \frac{1}{K'_{ML} C_L} + \frac{1}{C_L} \cdot [Mlábil] \quad (3.1)$$

Na Equação 3.1 as concentrações lábeis são determinadas obtendo-se os dados de intensidade de corrente e da concentração total do metal na amostra (metal total dissolvido somado ao metal total adicionado), através da construção de um gráfico com valores de corrente de pico vs. concentração total do metal, para

cada ponto da titulação. A partir da porção linear obtida neste gráfico é então gerada a equação da reta, cujo coeficiente angular será usado para o cálculo da concentração do metal lábil (Mlábil) para cada ponto da curva de titulação. O cálculo desta concentração se dá através da divisão da corrente (I) correspondente para cada ponto pelo coeficiente angular (s), como mostrado na Equação 3.2.

$$[\text{Mlábil}] = \frac{I}{s} \quad (3.2)$$

A concentração do metal complexado ([ML]), pela matéria orgânica dissolvida, é obtida pela diferença entre as concentrações do metal total dissolvido e do metal lábil, como mostra a Equação 3.3.

$$[\text{ML}] = \text{MTD} - [\text{Mlábil}] \quad (3.3)$$

Após a obtenção dos valores destas concentrações, um novo gráfico é construído, com base na seguinte expressão:

$$[\text{Mlábil}]/[\text{ML}] \text{ vs. } [\text{Mlábil}] \quad (3.4)$$

A partir dos coeficientes angular e linear da equação da reta obtidos através da Equação 3.1, determinam-se os valores de C_L e K'_{ML} , onde o coeficiente angular equivale a $1/C_L$ e o coeficiente linear a $1/K'_{ML} \times C_L$.

A obtenção destes parâmetros permitiu o cálculo da concentração do íon metálico livre $[M^{2+}(H_2O)_n]$ para cada um dos metais, utilizando o programa de equilíbrio químico MineqL+ (versão 4.61 Environmental Research Software, Hallowell, ME, USA). Para tanto, foram utilizados os parâmetros de complexação, $\log K'_{ML}$ e C_L , dos metais com ligantes da água do reservatório, obtidos neste trabalho. Este modelo proporciona um equilíbrio termodinâmico do sistema, onde são considerados o pH, força iônica, a distribuição de espécies químicas dissolvidas, dentre outras. Os componentes selecionados a partir da base de dados do programa interagem um com o outro, fornecendo as constantes termodinâmicas para definir as reações em qualquer ambiente aquático (SCHECHER e MCAVOY, 1992). O equilíbrio químico serve de base para diversas aplicações, tais como o controle dos mecanismos que dominam o comportamento de espécies em águas superficiais, o controle do pH, alcalinidade ou efeitos tóxicos de metais dissolvidos em ambientes aquáticos.

3.4 Titulação de competição entre os metais cobre e zinco nas águas do Reservatório de Barra Bonita

Para a realização da titulação de competição entre os metais cobre e zinco por ligantes já complexados a um desses metais nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita, foi necessário inicialmente conhecer os valores da concentração de ligantes disponíveis (C_L) para cada um dos metais. O procedimento para obter as características de complexação dos metais está descrito na seção 3.3.1. Com base nos valores de C_L foram determinadas as concentrações dos metais para adição nas amostras antes da realização da titulação de competição. Para avaliar se o zinco era capaz de deslocar o cobre previamente complexado pelos ligantes, quantidade conhecida do padrão de cobre foi adicionada à 10 mL da amostra filtrada em membrana de 0,22 μm de poro (Sartorius Stedim Biotech, Germany), em pH natural (MYLON et al., 2003). Seguindo-se o procedimento descrito em XUE et al. (1995), essa amostra permaneceu em equilíbrio por cerca de 15 horas e em seguida foi titulada com zinco, contendo 0,01 mol L⁻¹ de KNO₃ (Merck) como eletrólito de suporte. De maneira similar, para avaliar se o cobre seria capaz de deslocar o zinco previamente complexado pelos ligantes, zinco foi adicionado a uma nova amostra e esta foi titulada com cobre. Durante as titulações com cobre e zinco, foram monitoradas as correntes do zinco e cobre, respectivamente. Os parâmetros utilizados no polarógrafo para a titulação de competição entre Cu/Zn e entre Zn/Cu estão descritos na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 Parâmetros utilizados para a titulação de competição entre os metais cobre e zinco.

Parâmetros	Cu/Zn
E_{dep} (V)	-1,2
E_i (V)	-1,2
E_f (V)	0,15
t_{dep} (minutos)	10
$t_{\text{equilíbrio}}$ (minutos)	20
Purga entre as adições (minutos)	2
Força iônica (I) (mol L ⁻¹)	0,01
Amplitude do pulso (mV)	50
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	8

Os cálculos para obtenção dos valores de capacidade de complexação do metal titulante foram feitos como descrito na seção 3.3.1.

3.5 Espectroscopia de fluorescência

As amostras coletadas no Reservatório de Barra Bonita foram filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,22 μm de porosidade (Sartorius Stedim Biotech, Germany) e submetidas à caracterização da matéria orgânica dissolvida através das leituras da intensidade de fluorescência de emissão e sincronizada empregando-se um espectrofluorímetro (FP 6500 Jasco, Tokyo, Japão). Para todas as análises, o monocromador de excitação foi ajustado em 5 nm de amplitude de banda, enquanto o de emissão em 10 nm. A velocidade de varredura foi ajustada para 200 nm minuto^{-1} e a resolução espectral foi de 0,1 nm (LOMBARDI e JARDIM, 1999). As amostras foram analisadas em uma cela de quartzo multifacetada (Hellma) com 4,0 mL de capacidade e dotada de uma tampa de teflon. Espectros nas mesmas condições, porém realizados com água destilada e deionizada (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA) foram subtraídos das amostras com a finalidade de eliminação do pico Raman da água. Foram obtidos espectros de emissão de fluorescência na faixa entre 370 – 600 nm, sendo que o comprimento de onda de excitação foi fixado em 350 nm. Espectros de fluorescência sincronizada foram obtidos através da varredura simultânea de 300 a 600 nm, utilizando um intervalo de 18 nm entre os comprimentos de onda de excitação e emissão. Nesse espectro, o pico Raman da água destilada e deionizada encontra-se fora da amplitude de varredura (LOMBARDI e WANGERSKY, 1995). No entanto, as mesmas condições foram aplicadas ao branco que foi subtraído da amostra.

3.6 Parâmetros físico-químicos e nutrientes

As amostras de água do Reservatório de Barra Bonita foram caracterizadas com relação a alguns parâmetros físico-químicos e nutrientes.

Os parâmetros pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade, temperatura da água (T_{água}) e ambiente (T_{ambiente}), foram medidos *in situ* utilizando uma mini sonda portátil (YSI modelo 556 MPS). A transparência da água foi medida com disco de Secchi. O pH foi determinado *in situ* e também em alíquotas das amostras *in natura* no laboratório, logo após a coleta. Antes das medidas o sistema de eletrodos foi calibrado com tampões pH 7,00 e 4,00.

A determinação do teor de cloretos foi realizada através do método direto de precipitação de Möhr (Argentimetria). Neste método, a amostra filtrada e não acidificada é titulada com AgNO_3 . O volume e a concentração do titulante gasto é utilizado para determinar o valor de cloreto em mg L^{-1} (APHA, 1992).

A alcalinidade total foi determinada nas amostras *in natura* através da titulação potenciométrica, utilizando HCl como titulante. A análise tem início com a amostra em seu pH natural e termina quando este atinge exatamente 4,5. O volume de titulante gasto é utilizado para definir os valores de alcalinidade em termos de $\text{mg CaCO}_3 \text{L}^{-1}$ (APHA, 1992).

Para determinar a concentração de sólidos suspensos totais (SST), inicialmente membranas de fibra de vidro (GFC Boeco Germany 1,2 μm) foram lavadas com água destilada e deionizada (Barnstead International, Dubuque, Iowa, USA) e secas em estufa a 105 °C durante 1 hora. Decorrido esse tempo, foram transferidas para um dessecador onde permaneceram durante 1 hora. Após esse período, as membranas foram pesadas em balança analítica (Sartorius, Analytic AC 210 S, New York, EUA) e alíquotas de volumes conhecidos da amostra *in natura* foram filtradas e levadas a estufa a 105 °C durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram novamente transferidas para o dessecador até peso constante (1 hora). A concentração de sólidos suspensos totais foi calculada como mostra a Equação 3.5 a seguir (APHA, 1995).

$$\text{SST} = \frac{mf - mi}{V} \quad (3.5)$$

Onde:

SST = mg L^{-1} ;

mf = massa final da membrana de fibra de vidro (g);

mi = massa inicial da membrana de fibra de vidro (g);

V = volume de amostra filtrada (L).

As concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) nas amostras de água filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,22 μm de porosidade (Sartorius Stedim Biotech, Germany) foram quantificadas pela diferença entre a concentração de carbono total (CT) e inorgânico (CI) ($\text{TOC} - V_{\text{CPH}}$ Shimadzu, Japão). A curva de calibração para CI foi feita utilizando-se bicarbonato de sódio (Nacalai Tesque, Kyoto, Japão) e carbonato de sódio anidro (Nacalai Tesque, Kyoto, Japão).

Para CT foi utilizado como padrão biftalato de potássio (Nacalai Tesque, Kyoto, Japão). As curvas analíticas feitas para essas análises são mostradas na FIGURA 3.3.

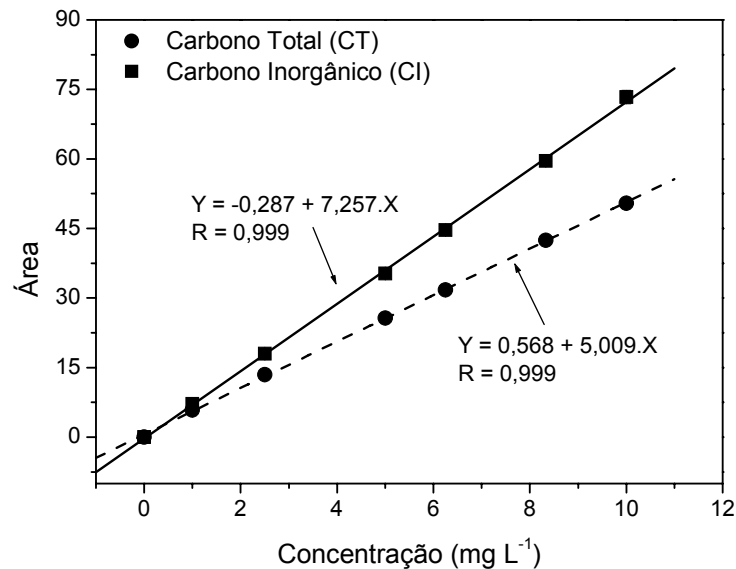


FIGURA 3.3 Curvas analíticas para determinação de carbono total (CT) e carbono inorgânico (CI).

A concentração de nitrato foi determinada a partir da redução do nitrato a nitrito por cádmio amalgamado e então complexado por sulfanilamida e bicloridrato-N-(1naftil)-etilenodiamina, formando um composto nitrogenado altamente colorido que absorve em 543 nm (MACKERETH et al., 1978).

Para a determinação da concentração de clorofila-a, volumes conhecidos das amostras *in natura* foram filtrados a vácuo, utilizando membrana de fibra de vidro (GFC Boeco Germany 1,2 µm) em sistema de filtração apropriado (Nalgene). A membrana contendo a biomassa fitoplanctônica foi colocada em um tubo de centrífuga com tampa e com capacidade para 13 mL. Adicionava-se 10 mL de acetona 90% (V/V) ao tubo de centrífuga contendo a membrana e agitava-se vigorosamente. Após agitação, o tubo de centrífuga era colocado imediatamente no refrigerador, na ausência de luz, para a completa extração dos pigmentos. As amostras permaneciam sob refrigeração, a 4 °C, por aproximadamente 20 horas (HOLM-HANSEN e RIEMANN, 1978; PARSONS et al., 1984). Os tubos eram então submetidos à centrifugação (3000 rpm) por aproximadamente 15 minutos. Após esta etapa, uma alíquota do sobrenadante era retirada e submetida à análise por espectroscopia de absorção molecular na região do visível. Durante esta etapa eram registrados os espectros da amostra e do controle, com ênfase para os sinais obtidos nos comprimentos de onda 630, 645, 663 e 750 nm. Em seguida, a

concentração de clorofila-a era determinada de acordo com a seguinte equação (3.6) (HOLM-HANSEN e RIEMANN, 1978; PARSONS et al., 1984):

$$\text{Clorofila-a} = \frac{(11,64 \times A_{663} - 2,16 A_{645} + 0,10 A_{630}) \times v}{V \times l} \quad (3.6)$$

Onde:

Clorofila-a = $\mu\text{g L}^{-1}$;

v = volume de acetona usado na extração (mL);

V = volume de amostra filtrada (L);

l = caminho óptico (1 cm);

A_{663} = absorbância em 663 nm;

A_{645} = absorbância em 645 nm;

A_{630} = absorbância em 630 nm após correção para turbidez e controle da membrana, em todos os casos.

3.7 Análises estatísticas

Foram realizados teste t, análises de regressão múltipla, análises de variância (ANOVA) (nível de significância de $P < 0,05$) e análises de componentes principais (PCA) (Programa Statistica8). Essas análises foram realizadas para elucidar a influência que a sazonalidade e o aporte de contaminantes exercem nas variáveis físicas, químicas e biológicas da água e dessas, quais influenciam a especiação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita.

A PCA pode resumir em poucas e importantes dimensões a maior parte da variabilidade de uma matriz de dados de um grande número de variáveis (YABE e DE OLIVEIRA, 1998) sem, entretanto, comprometer ou alterar informações importantes. Essa análise fundamenta-se na decomposição de uma matriz de dados a partir de correlações sobre as variáveis originais. Baseado nessas correlações, uma matriz de semelhanças é formada e desta se estabelece um conjunto de eixos perpendiculares entre si, chamados componentes. Em seguida são calculados os autovetores, ou seja, a projeção de cada variável em cada eixo, o que permite ordená-las em ordem crescente para cada eixo. Quanto mais próximo de 1,0 o valor do autovetor, mais correlacionado está a variável em relação ao eixo e valores negativos significam que as variáveis estão negativamente correlacionadas ao eixo. Para este estudo foram interpretadas as variáveis que apresentaram resultados

iguais ou superiores a 0,45, que representa uma boa associação entre uma variável e um fator (eixo). Cada eixo explica uma porcentagem das variâncias e ao final relacionam-se os eixos que explicam a maior parte das variâncias. Desta forma a PCA produz como resultado uma nova matriz, de tamanho reduzido, e um gráfico mostrando as relações entre variáveis e amostras, facilitando a análise dos dados (GUSSO, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as duas estações do ano marcadas através de seca (inverno) e chuvas (verão), aliadas à significativa contribuição alóctone de contaminantes oriundos dos Rios Tietê e Piracicaba, os resultados que são apresentados nesta parte do estudo buscam avaliar qual a influência da sazonalidade e do aporte dos resíduos industriais, urbanos e agrícolas na especiação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo, e também a caracterização físico-química das águas do reservatório. Para avaliar o destino e os efeitos ecotoxicológicos de metais em águas naturais, é essencial realizar a análise de especiação, que consiste em avaliar a distribuição do metal entre várias formas ou espécies (TEMPLETON et al., 2000). Além da especiação, estudar a capacidade de complexação (C_L e $\log K'_{ML}$) é importante pois determina a capacidade do corpo aquático em reduzir a disponibilidade do metal considerado tóxico para a biota aquática (FLORENCE, 1982), seja através da concentração de ligantes disponíveis para complexar metal, ou pelo $\log K'_{ML}$ que representa a força da ligação metal-ligante. A capacidade de complexação (CC) é um aspecto quantitativo da interação metal – ambiente, enquanto que a constante de estabilidade condicional (K'_{ML}) refere-se ao aspecto qualitativo (força de associação) dessa interação.

4.1 Caracterização físico-química da água do Reservatório de Barra Bonita

Os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos da água são mostrados no APÊNDICE 1. Tais parâmetros associam-se à qualidade da água, e influenciam a especiação dos metais (OCHIENG et al., 2008; WILDE et al., 2006).

Como mostrado no APÊNDICE 1, os valores de pH foram estatisticamente similares entre as coletas (teste t, $P = 0,1288$) e entre os pontos (ANOVA, $P = 0,1947$), situando-se na faixa de 7,25 a 8,18. Os valores de pH ligeiramente acima do pH neutro podem estar relacionados à alcalinidade. Neste estudo, o fluxo de alcalinidade variou entre 41,2 e 115,8 mg L⁻¹ e de acordo com Abril e Frankignoulle (2001), Tchobanoglous e Burton (1991) e Verbanck et al. (1994) rochas calcárias, decomposição de material orgânico sob condições anaeróbias e atividades antrópicas, tal como o descarte de águas residuárias, contribuem para o aumento de alcalinidade em corpos aquáticos. Além disso, a presença de quantidades elevadas de cloretos em águas naturais, como as quantificadas no reservatório (22,7 a 58,2

mg L⁻¹) pode indicar o aporte de esgotos. Neste estudo, as concentrações de cloreto estão de acordo com aquelas encontradas em ambientes com elevada contribuição antrópica (PETTINE et al., 1996; SCHEFFER, 2006). Considerando que o Reservatório de Barra Bonita localiza-se em uma região onde a geologia predominante é caracterizada por rochas sedimentares e basálticas (CALIJURI e DOS SANTOS, 2001; DA SILVA et al., 2002) e não por rochas calcárias, os valores elevados de cloreto e alcalinidade total podem ser oriundos do descarte de efluentes domésticos e industriais, além de fertilizantes agrícolas carregados através dos rios Tietê e Piracicaba, dentre outros tributários (CETESB, 2007, 2008; MATSUMURA-TUNDISI e TUNDISI, 2005; TUNDISI et al., 2008).

As análises estatísticas confirmaram que as concentrações de OD, COD e condutividade têm comportamento sazonal independente da localização dos pontos amostrados. A FIGURA 4.1 mostra esses valores e temperatura da água em função da sazonalidade. Os resultados são mostrados em gráficos do tipo *box-whiskers*, onde os pontos foram agrupados conforme a data de amostragem (agosto 2007 e julho 2008, menor pluviosidade; novembro 2007 e janeiro de 2009, maior pluviosidade). A determinação de oxigênio dissolvido em corpos aquáticos é uma análise importante na determinação de índices de qualidade de águas, tendo em vista que este parâmetro está diretamente relacionado à manutenção da biota aquática (STUMM e MORGAN, 1996).

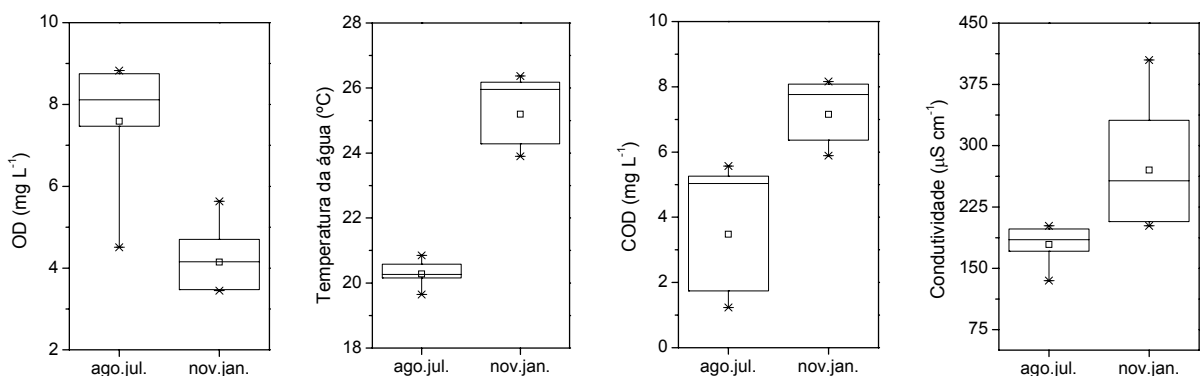


FIGURA 4.1 Valores de OD, temperatura da água, COD e condutividade determinados nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita, agrupados por período amostral. As linhas horizontais das caixas representam 25, 50 e 75% dos valores; barras de erros indicam 5 e 95%; (X) expressas 1 e 99%; (—) correspondem aos valores máximos e mínimos e (□) representa a média aritmética.

Como mostrado na FIGURA 4.1, a temperatura influenciou inversamente as concentrações de OD na água. As coletas realizadas em novembro e janeiro apresentaram, em média, temperaturas 20% mais elevadas (teste t, $P < 0,0001$) do que as de agosto e julho. Nesse mesmo período a concentração de OD diminuiu, em

média, 46% (teste t, $P = 0,0009$). É conhecido que a solubilidade do O_2 na água depende, principalmente, da temperatura e pressão. A temperatura é inversamente proporcional à solubilidade de gases dissolvidos, sendo que aumentos de temperatura da água e diminuição da pressão resultam na redução de OD (BAIRD, 2002; ESTEVES, 1998). Deve-se considerar ainda um maior consumo de oxigênio devido o aumento de atividades biológicas nos meses de verão em relação aos meses de inverno. Segundo Baird (2002) e Esteves (1998) a uma pressão de 760 mmHg e a 0 °C, solubilizam-se 14,6 mg $O_2 L^{-1}$, enquanto que nas mesmas condições a 30 °C, frequentemente observado em lagos tropicais, solubilizam-se apenas 7,6 mg L^{-1} . De fato, as amostras coletadas em novembro e janeiro apresentaram concentrações de OD abaixo do valor mínimo estabelecido pela resolução CONAMA 357/2005 para ambientes classe 2 (5 mg L^{-1}). A escassez de oxigênio pode favorecer a proliferação de microrganismos anaeróbios e o desenvolvimento de ambientes anóxicos (TCHOBANOGLIOUS e BURTON, 1991).

A concentração de substâncias iônicas dissolvidas no meio aquático, expressa como condutividade, varia entre 300 e 2000 $\mu S cm^{-1}$ (25 °C). Valores elevados decorrem de lançamento de despejos industriais, mineração e esgotos domésticos (SCHEFFER, 2006). Diferenças significativas na condutividade e que se relacionaram com a sazonalidade (teste t, $P = 0,0251$) são mostradas na FIGURA 4.1. Nas coletas de agosto e julho os valores variaram entre 135 e 202 $\mu S cm^{-1}$, nas coletas de novembro e janeiro os valores foram mais elevados, variando entre 202 e 405 $\mu S cm^{-1}$.

Carbono orgânico total (COT) e dissolvido (COD) são produzidos através da mobilização da matéria orgânica natural e antropogênica, derivadas da contribuição alóctone (matéria orgânica oriunda do solo), autóctone (inter-relações entre a produção primária – fotossíntese – metabolismo de organismos) ou ainda, antropogênica (efluentes e descartes industriais) (BAKER et al., 2008). No Reservatório de Barra Bonita, o COD tem origem alóctone e autóctone, sendo que o COD alóctone pode ser de natureza antrópica ou natural. O COD alóctone atinge o reservatório através do escoamento do entorno, predominantemente agrícola, enquanto o COD antrópico é oriundo da contribuição dos seus principais afluentes. Como o reservatório é considerado eutrófico, o COD autóctone é significativo e oriundo principalmente da elevada produtividade primária presente nesse ambiente. Maiores concentrações de COD foram obtidas nas amostras coletadas em novembro

e janeiro (teste t, $P = 0,0023$) (FIGURA 4.1), meses de maior pluviosidade. Esses resultados concordam com os de Meylan et al. (2003), que descrevem aumento de COD durante eventos de chuvas, influenciados por fatores antrópicos.

Neste estudo observou-se uma relação diretamente proporcional entre os valores de sólidos suspensos totais e clorofila-a (FIGURA 4.2), sugerindo que o material sólido presente no reservatório apresenta contribuição biológica significativa.

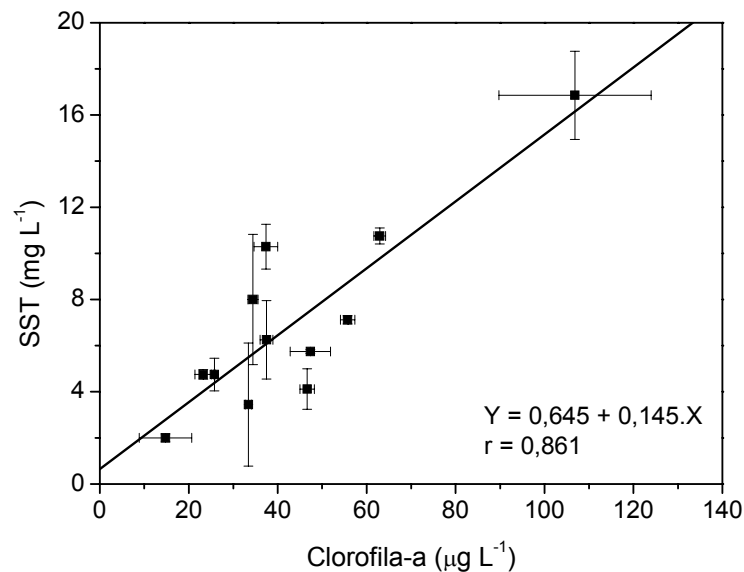


FIGURA 4.2 Variação de sólidos suspensos totais em função da concentração de clorofila-a considerando todos os pontos amostrais.

Ressalta-se ainda que exceto em algumas amostras (ponto 3), a concentração de clorofila-a esteve acima do máximo permitido pela resolução CONAMA 357/2005 ($30 \mu\text{g L}^{-1}$), para ambientes classe 2 em todo o período de estudo. Dados similares foram encontrados nas análises bimensais realizadas pela CETESB (2007, 2008). A interpretação desses resultados concorda com outros da literatura que consideram o Reservatório de Barra Bonita como um ambiente eutrofizado, que apresenta elevada produtividade primária, consequência do excesso de nutrientes que favorece o crescimento acelerado de microalgas. Segundo relatório da CETESB (2008), esse processo de eutrofização é causado, principalmente, pela carga poluidora lançada no Alto Tietê, oriunda da região metropolitana de São Paulo (RMSP). As fotografias na FIGURA 4.3, obtidas em julho de 2008, próximas ao ponto 2 (A) e ponto 3 (B), exemplificam as constantes florações algais observadas durante todo o ano ao longo do reservatório.



FIGURA 4.3 Fotografias de florações algais obtidas em julho de 2008 nas águas do Reservatório de Barra Bonita, localizadas próximo ao ponto 2 (A) e próximo ao ponto 3 (B).

Nas coletas realizadas pela CETESB em 2007, as concentrações de nutrientes estiveram mais elevadas no Braço do Rio Tietê (próximo ao ponto 1 neste trabalho), indicando que a contribuição mais expressiva tem origem na RMSP. Além disso, a piora na qualidade das águas do Médio Tietê foi afetada pelas cargas poluidoras oriundas tanto da sua bacia de contribuição, quanto das provenientes da RMSP.

As concentrações de sólidos suspensos totais (SST) nos diferentes pontos de coleta, variaram de 2,00 a 16,8 mg L⁻¹ durante o período de amostragem (FIGURA 4.4).

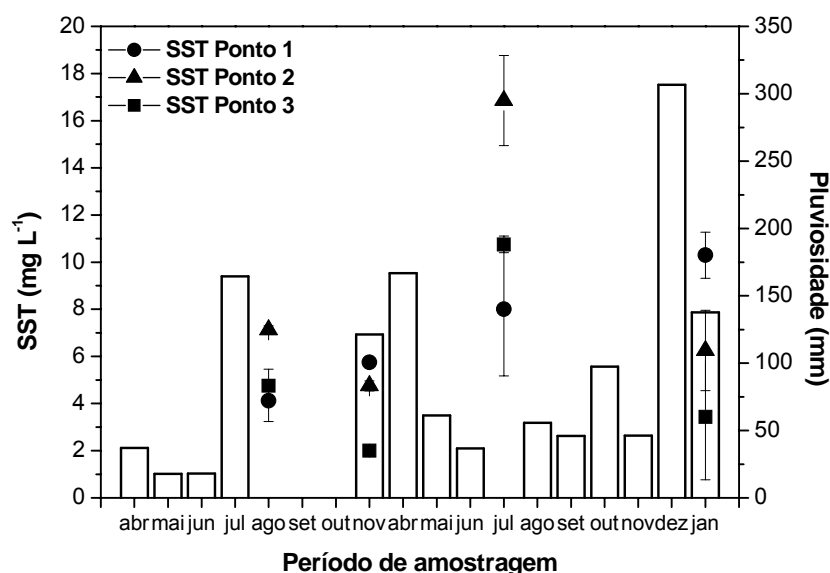


FIGURA 4.4 Valores de SST nas águas do Reservatório de Barra Bonita entre julho de 2007 e janeiro de 2009 e dados de precipitação mensal acumulada (barras) entre abril de 2007 e janeiro de 2009.

Os maiores valores de SST deram-se em períodos de menor precipitação (agosto e julho), uma relação direta entre as concentrações de SST e a precipitação

mensal acumulada (FIGURA 4.4) não foi obtida, exceto no ponto 1. Esse resultado pode estar associado tanto ao florescimento de microalgas observado no período, como também à variação no tempo de retenção da água no reservatório. Controlado pela intensidade e frequência de chuvas, o tempo de retenção médio no inverno foi de 90 - 150 dias e no verão de 30 - 75 dias (DELLAMANO-OLIVEIRA et al., 2008; TUNDISI et al., 2008), justificando assim o aumento da concentração de SST nos períodos de seca (pontos 2 e 3). No ponto 1 foi observado um comportamento já conhecido de ambientes lóticos, ou seja, níveis mais elevados de SST foram obtidos nos meses de maior pluviosidade. Isso indica que o aporte de material sólido neste ponto ocorreu, provavelmente, como consequência do escoamento superficial (SODRÉ et al., 2005), o que é justificado por estar localizado na junção dos rios Tietê e Piracicaba.

4.2 Especificação de metais nas águas do Reservatório de Barra Bonita

A especificação química de metais tem sido extensivamente estudada por titulação direta de amostras de águas naturais com metais traço (RUZIC, 1996). Desta forma, em ambientes aquáticos a especificação possui grande influência na biodisponibilidade e toxicidade dos metais (FLORENCE, 1982; MEYLAN et al., 2004).

A determinação das concentrações total e total dissolvida dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo foi obtida através da adição dos respectivos padrões. Os limites de detecção (LD) para os quatro metais foram calculados utilizando as seguintes equações (4.1 e 4.2) (SKOOG et al., 2002):

$$S_m = \bar{S}_{br} + ks_{br} \quad (4.1)$$

$$LD = \frac{S_m - \bar{S}_{br}}{m} \quad (4.2)$$

Onde:

S_m = sinal analítico mínimo distinguível;

\bar{S}_{br} = sinal médio do branco;

s_{br} = desvio padrão do branco;

$k = 3$ (múltiplo da estimativa do s_{br});

m = coeficiente angular da equação da reta da curva analítica.

Experimentalmente, S_m foi determinado por medidas do controle (branco) repetidas 10 vezes. Os dados resultantes foram tratados estatisticamente para obter \bar{S}_{br} e s_{br} . Recomendado por diversos autores (SKOOG et al., 2002), utilizou-se $k = 3$ como múltiplo da estimativa do s_{br} e a inclinação da reta da curva analítica (m) para obtenção dos valores. Os limites de detecção estimados através das curvas de calibração foram $6,4 \cdot 10^{-10}$ (cobre), $3,3 \cdot 10^{-9}$ (zinco), $5,0 \cdot 10^{-10}$ (chumbo) e $2,5 \cdot 10^{-10}$ mol L⁻¹ (cádmio).

A FIGURA 4.5 mostra um conjunto típico de voltamogramas obtidos na determinação simultânea dos quatro metais em amostras de águas de ambiente natural.

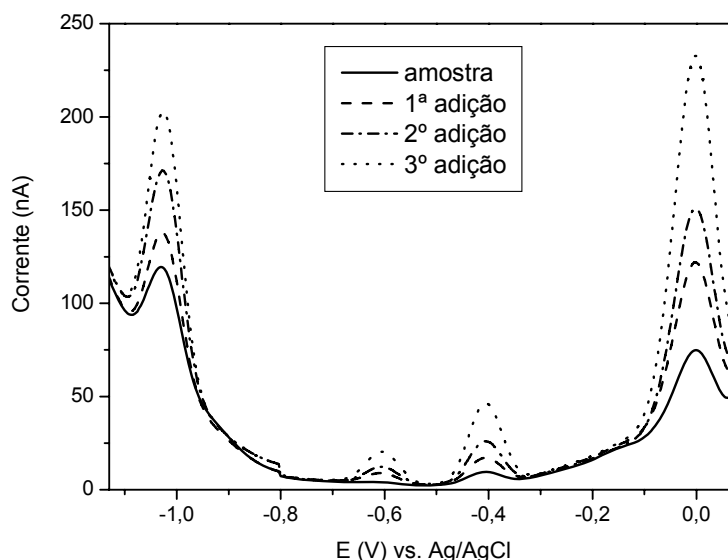


FIGURA 4.5 Voltamogramas obtidos durante a determinação simultânea de cobre, zinco, cádmio e chumbo em uma amostra de água natural por DPASV. Força iônica: $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $E_{dep} = -1,2 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), $t_{dep} 300 \text{ s}$, amplitude do pulso 50 mV e velocidade de varredura 8 mV/s .

Na FIGURA 4.5 são mostrados os quatro picos localizados em $-1,02 \text{ V}$, $-0,6 \text{ V}$, $-0,4 \text{ V}$ e $0,0 \text{ V}$ que referem-se à redissolução do zinco, cádmio, chumbo e cobre, respectivamente. Nota-se que a adição consecutiva dos metais na amostra promove o aumento de intensidade de corrente nos respectivos potenciais, resultando em voltamogramas com alta resolução e sensibilidade suficiente para a determinação de metais em níveis traço.

Devido à complexidade da matriz, que pode provocar mudanças do sinal analítico devido à presença de constituintes na amostra além do analito, o método de adição de padrões foi usado neste estudo.

A FIGURA 4.6 apresenta as concentrações total (T) e total dissolvida (TD) dos metais nos diversos meses amostrados.

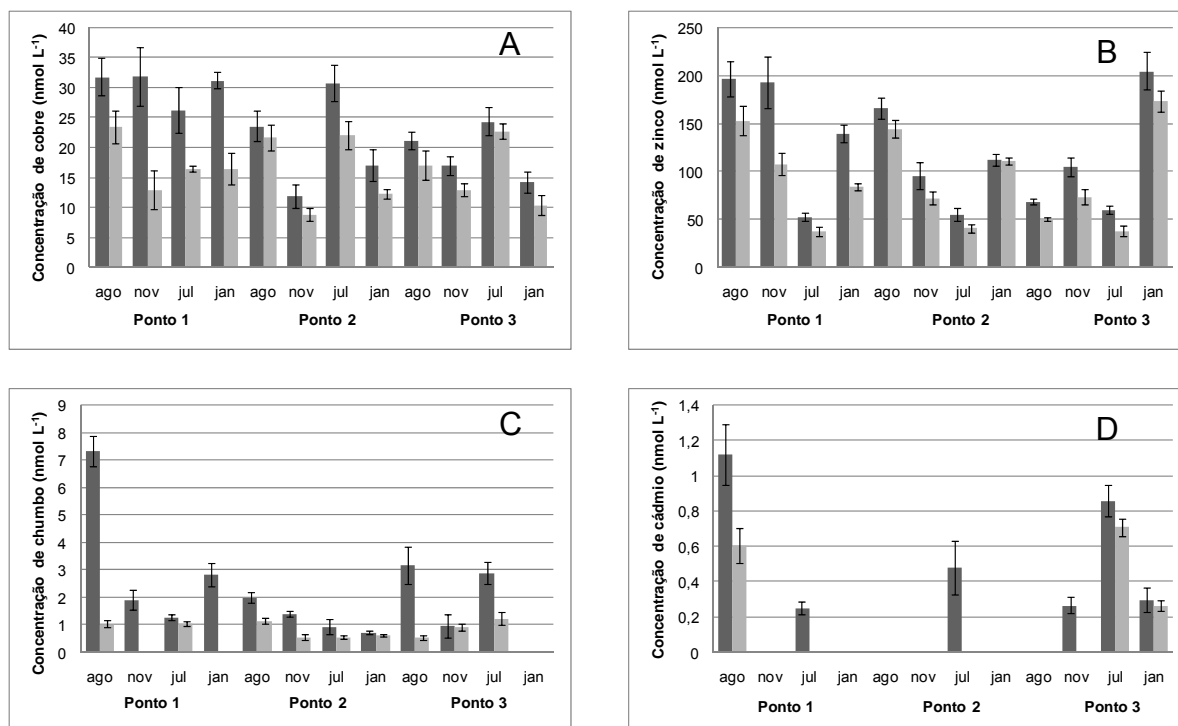


FIGURA 4.6 Concentração total (cinza escuro) e total dissolvida (cinza claro) (nmol L^{-1}) de cobre (A), zinco (B), chumbo (C) e cádmio (D) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita.

Observa-se que as concentrações de zinco e cobre foram maiores do que chumbo e cádmio durante todo o período. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que evidencia uma maior abundância desses elementos em corpos aquáticos sob influência de atividades antrópicas (ALONSO et al., 2004; PETTINE et al., 1996; VELASQUEZ et al., 2002).

Em geral, as concentrações de CuT foram maiores nos pontos 1 e 2 comparadas àquelas no ponto 3 (ANOVA, $P = 0,0416$). Esse comportamento é justificado pela proximidade e elevada contribuição dos rios Tietê e Piracicaba. As demais comparações por ANOVA, separadamente para cada metal, da concentração total e total dissolvida entre os pontos de coleta, resultaram em diferenças não significativas. No entanto, foi detectada diferença significativa quanto à sazonalidade. Para CuTD (teste t, $P = 0,0005$) e PbTD (teste t, $P = 0,0185$) (FIGURAS 4.6A e 4.6C), essas concentrações foram mais altas nas coletas de agosto e julho. Resultado similar foi observado por Fontenele et al. (2009), que mostraram aumento nas concentrações de cobre e chumbo em períodos de menor pluviosidade.

A análise de especiação dos metais em amostras de águas naturais exige a utilização de uma técnica analítica que permita a identificação e a quantificação de espécies lábeis na amostra. Dentre as técnicas descritas na literatura destacam-se

aquelas baseadas na voltametria de redissolução, que podem fornecer dados quantitativos com excelentes limites de detecção, elevada sensibilidade analítica, (BRULAND et al., 2000) e boa correlação com a disponibilidade biológica do metal (XUE e SIGG, 1998). Diversos métodos voltamétricos têm sido usados para análises de especiação de metais, mas em muitos casos, diferentes técnicas voltamétricas são usadas para os diferentes elementos. Tem-se, por exemplo, que a especiação do cobre em águas naturais é frequentemente analisada através da competição de ligantes com determinação por DPCSV, enquanto que para o zinco é normalmente utilizada a DPASV (KNAUER et al., 1998; MEYLAN et al., 2004; MONTICELLI et al., 2007; SIGG et al., 2006; VELASQUEZ et al., 2002; XUE et al., 1995). Ruzic (1982) propôs um método para a interpretação direta da titulação de águas naturais com metais, como descrito na seção 3.3.1. A partir do modelo proposto por Ruzic e implantações para cobre e zinco, descrito por Tonietto e Grassi (submetido), foram realizadas as titulações para obtenção dos valores de metal lábil, metal complexado, C_L e $\log K'_{ML}$ para as amostras de água do Reservatório de Barra Bonita. As FIGURAS 4.7A, 4.7B, 4.7C e 4.7D mostram os gráficos obtidos para as titulações de amostras de água com cobre, zinco, chumbo e cádmio, respectivamente.

Os resultados da capacidade de complexação dos metais são apresentados na TABELA 4.1.

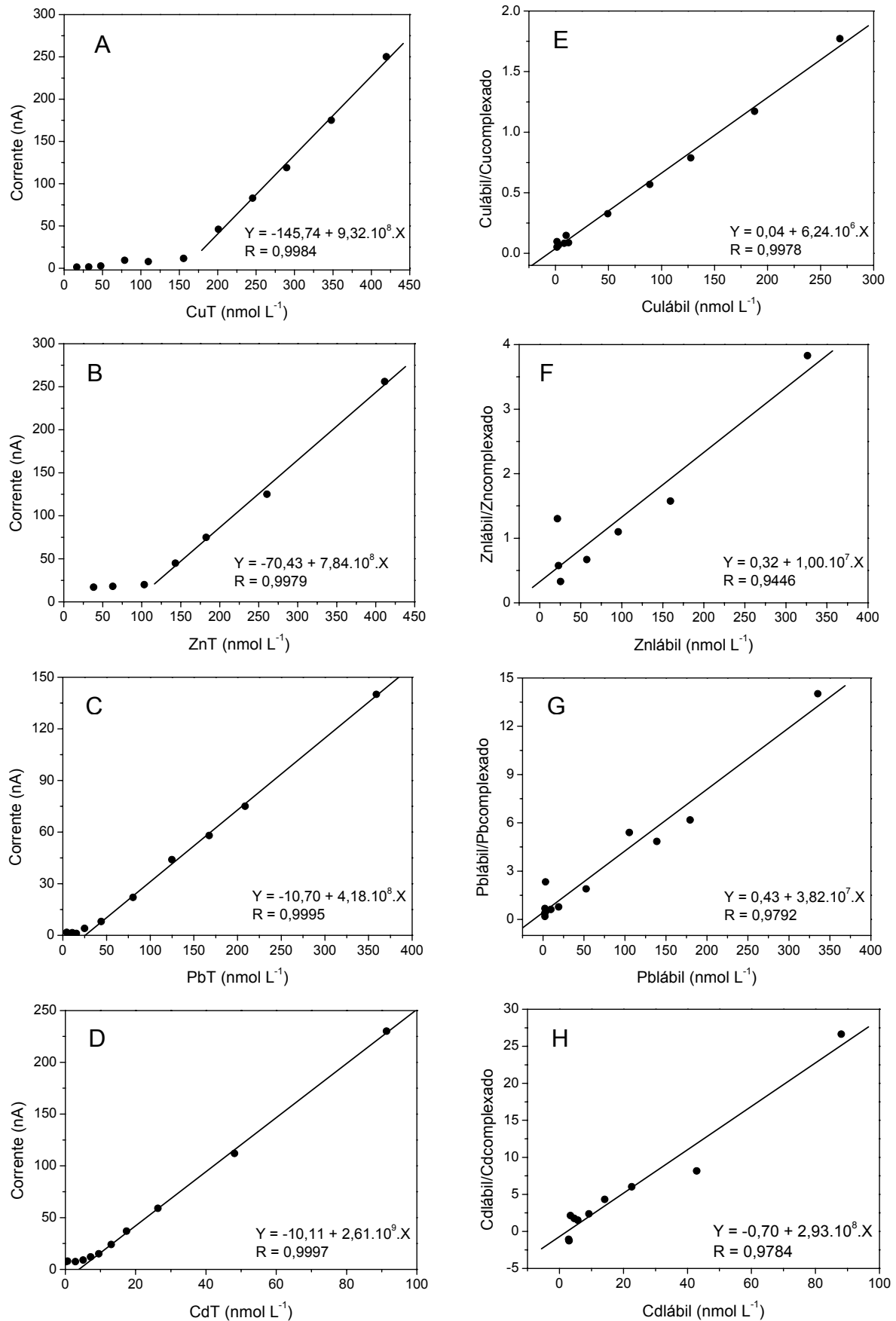


FIGURA 4.7 Voltamogramas referentes às titulações de (A) cobre, (B) zinco, (C) chumbo, (D) cádmio e determinação das capacidades de complexação para (E) cobre, (F) zinco, (G) chumbo, (H) cádmio, das amostras de água do Reservatório de Barra Bonita.

TABELA 4.1 Capacidade de complexação de cobre, zinco, cádmio e chumbo nas águas do Reservatório de Barra Bonita durante o período amostral. Concentração média \pm desvio padrão, $n = 3$. NC = não calculado.

Capacidade de Complexação	agosto 2007			novembro 2007			julho 2008			janeiro 2009		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
$C_L\text{Cu}/\text{COD}$ (10^{-6} mol g^{-1})	218 \pm 21,5	164 \pm 13,7	92,2 \pm 2,78	36,0 \pm 2,09	34,7 \pm 7,22	29,3 \pm 1,04	49,0 \pm 15,9	47,0 \pm 11,6	39,4 \pm 1,37	45,7 \pm 2,05	43,8 \pm 2,63	32,3 \pm 0,98
$\log K'_{\text{CuL}}$	7,87 \pm 0,12	7,38 \pm 0,04	8,19 \pm 0,29	7,65 \pm 0,76	8,75 \pm 0,08	7,94 \pm 0,08	8,04 \pm 0,24	7,98 \pm 0,01	8,10 \pm 0,27	7,53 \pm 0,07	7,49 \pm 0,15	7,45 \pm 0,11
$C_L\text{Zn}/\text{COD}$ (10^{-6} mol g^{-1})	NC	NC	NC	5,72 \pm 0,43	NC	7,63 \pm 0,97	8,22 \pm 1,46	NC	14,6 \pm 8,03	7,76 \pm 0,64	NC	11,5 \pm 0,91
$\log K'_{\text{ZnL}}$	NC	NC	NC	8,16 \pm 0,01	NC	8,98 \pm 0,14	8,22 \pm 0,09	NC	7,67 \pm 0,1	8,03 \pm 0,05	NC	8,51 \pm 0,19
$C_L\text{Pb}/\text{COD}$ (10^{-6} mol g^{-1})	19,4 \pm 2,21	45,3 \pm 2,81	31,3 \pm 1,32	NC	NC	NC	6,77 \pm 3,03	4,83 \pm 2,53	4,64 \pm 0,58	NC	16,7 \pm 1,26	NC
$\log K'_{\text{PbL}}$	8,68 \pm 0,23	6,88 \pm 0,14	6,80 \pm 0,07	NC	NC	NC	6,78 \pm 0,10	7,23 \pm 0,07	8,00 \pm 0,21	NC	7,62 \pm 0,18	NC
$C_L\text{Cd}/\text{COD}$ (10^{-6} mol g^{-1})	6,06 \pm 0,10	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
$\log K'_{\text{CdL}}$	7,78 \pm 0,04	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Não houve diferença significativa para C_L e $\log K'_{ML}$ quer entre pontos, quer em função da sazonalidade. No entanto, foi obtida diferença significativa entre os metais (ANOVA, $P = 0,0294$). Algumas variações pontuais podem ser observadas para C_L por unidade de COD. Os maiores valores foram obtidos para o cobre ($29,3 - 218 \mu\text{mol g}^{-1}$), seguido do chumbo ($4,64 - 45,3 \mu\text{mol g}^{-1}$), zinco ($5,72 - 14,6 \mu\text{mol g}^{-1}$) e cádmio ($6,06 \mu\text{mol g}^{-1}$). A força da ligação metal-ligante, expressa como $\log K'$, apresentou variações análogas entre os metais ($7,38 - 8,75$ Cu; $7,67 - 8,98$ Zn; $6,78 - 8,68$ Pb e $7,78$ Cd).

A interpretação dos resultados das titulações de CC da água mostrou que não havia ligantes disponíveis para zinco (TABELA 4.1) no ponto amostral 2 e em todos os pontos da coleta de agosto. Consequentemente, não foi obtido $\log K'_{ZnL}$. Esse comportamento é decorrente da ocupação previa dos ligantes disponíveis pelo zinco no ambiente natural, uma vez que esse metal esteve presente em altas concentrações e, portanto, não havia ligantes disponíveis para serem titulados. Resultado similar foi obtido para chumbo (novembro e janeiro, pontos 1 e 3). No entanto, neste caso atribui-se a ausência de capacidade de complexação para chumbo à maior afinidade deste metal pelo material particulado (ALONSO et al., 2004; CHAKRABORTY e CHAKRABARTI, 2008; FONTENELE et al., 2009). A dificuldade em avaliar a CC do cádmio é provavelmente decorrente da fraca complexação deste metal a ligantes naturais presentes na água. Resultado similar foi obtido por Mylon et al. (2003), que por não obterem resultados para CC do cádmio em águas naturais, avaliaram tempos de equilíbrio de até 1 hora e não foram observadas diferenças para CC deste metal.

Os valores de C_L indicaram que os ligantes para cobre estavam presentes sempre em excesso às concentrações de CuTD. Estes resultados estão de acordo com os de Achterberg et al. (1997), Apte et al. (2000), Hoffmann et al. (2007) e Xue et al. (1995), que relataram concentrações de ligantes naturais para cobre superiores ao CuTD. A elevada concentração de ligantes disponíveis para cobre nas águas do Reservatório de Barra Bonita relaciona-se com a menor seletividade da MOD frente a esse metal. De fato, diversos estudos comprovam a elevada afinidade entre cobre e MOD natural nos ambientes aquáticos (DONAT et al., 1994), principalmente pela presença de substâncias húmicas na constituição da MOD. No reservatório estudado, a elevada concentração de ligantes para cobre pode também estar relacionada ao florescimento de microalgas, comum durante o ano todo e

suportado pelas altas concentrações de clorofila-a obtidas neste estudo. Sabe-se que tais organismos excretam ligantes que complexam metais (GOUVÊA et al., 2005; SIGEE, 2005).

Segundo Stumm e Morgan (1996) substâncias orgânicas aportam em ambientes aquáticos a partir de inúmeras fontes, o que pode provocar variações quantitativas e qualitativas na MOD dos ambientes receptores. É esperado, portanto, que diferentes tipos de MOD apresentem diferentes concentrações de ligantes capazes de complexar os diferentes metais. Além disso, a existência dos metais naturalmente complexados faz com que sejam contabilizados nestes experimentos somente os ligantes disponíveis.

Os valores obtidos quanto à capacidade de complexação dos metais neste estudo, estão de acordo com outros trabalhos presentes na literatura. Xue e Sigg (1999) estudaram a complexação do cobre e cádmio em lagos europeus. A CC para cobre variou de 130 a 212 nmol L⁻¹ (C_L) e 13,8 a 15,5 (logK'_{CuL}), e para cádmio variou de 1,6 a 6,0 nmol L⁻¹ (C_L) e 8,2 a 10,4 (logK'_{CdL}). Muller et al. (2001) avaliaram a capacidade de complexação de zinco nas águas do mar Negro e observaram que a C_L variou de 8 – 23 nmol L⁻¹ e logK'_{ZnL} 9,4 – 10,2.

Uma avaliação da distribuição dos metais foi realizada empregando-se dados relativos à especiação do cobre, zinco e chumbo, conforme mostra a FIGURA 4.8A, 4.8B e 4.8C, respectivamente. No gráfico ternário, relacionaram-se as porcentagens dos metais associados ao material particulado (MP), complexados na fração dissolvida (ML) e dos metais na fração lábil. A somatória das frações particulada, complexada e lábil é igual à concentração total dos metais nas amostras. Cádmio não foi incluído nesta análise, pois sua concentração foi em geral inferior a 2,5.10⁻¹⁰ mol L⁻¹, das quais apenas duas apresentaram resultados acima do limite de detecção para técnica.

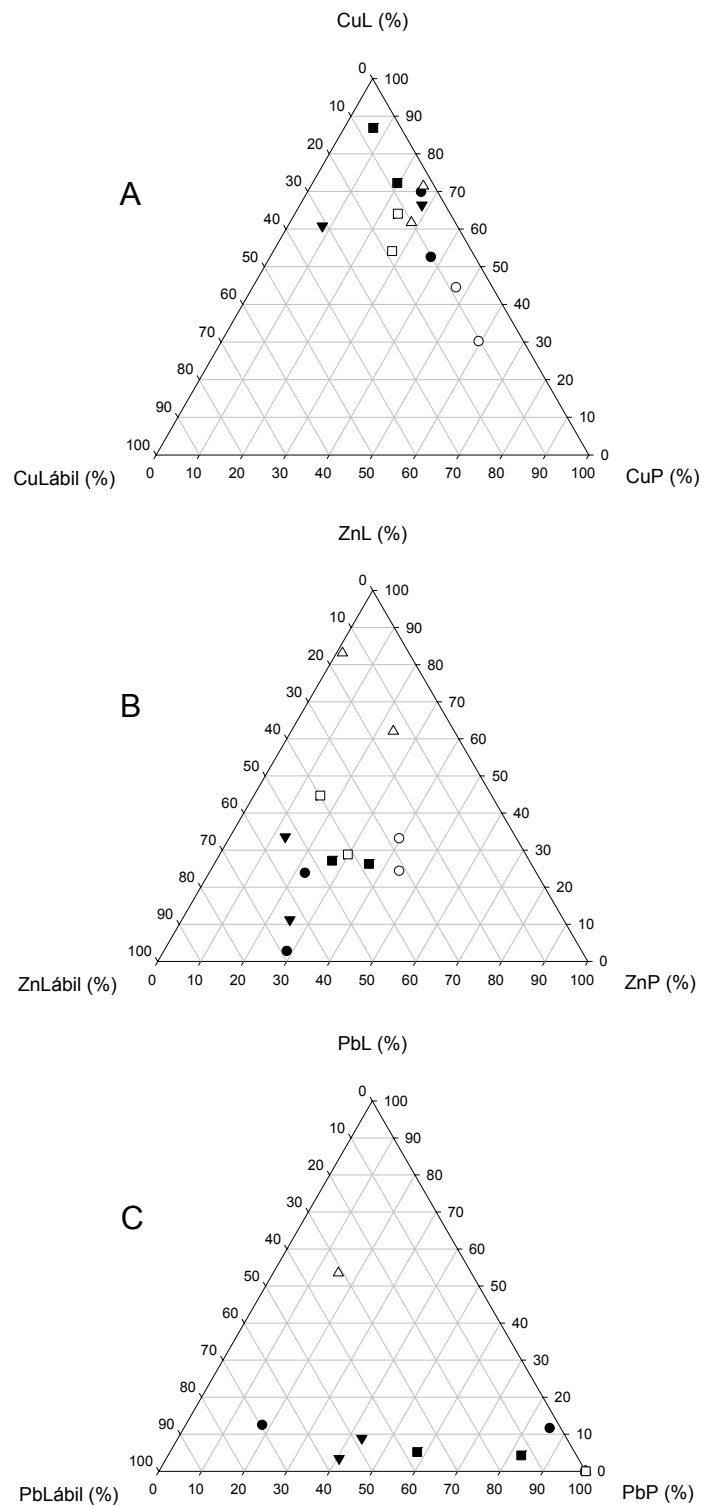


FIGURA 4.8 Concentração relativa dos metais cobre (A), zinco (B) e chumbo (C) nas frações particulada (MP), complexada dissolvida (ML) e lábil para amostras coletadas no Reservatório de Barra Bonita durante o período amostral. (●) Ponto 1; (■) Ponto 2; (▲) Ponto 3; símbolos cheios: coletas de agosto e julho; símbolos vazios: coletas de novembro e janeiro.

De acordo com a FIGURA 4.8, podem ser visualizadas diferenças significativas quanto à especiação dos metais em função da sazonalidade.

As amostras coletadas em agosto e julho apresentaram as maiores concentrações de CuL (FIGURA 4.8A), variando de 50 a 90%, comparado às concentrações obtidas em novembro e janeiro, que variaram de 30 a 70%. Em geral, observam-se também baixas concentrações de CuLábil. Nas coletas de agosto e julho, cerca de 10% do cobre total foi detectado na forma lábil, enquanto as concentrações de CuP variaram de 5 a 40%. Entretanto, nas amostras de novembro e janeiro, os níveis de CuP foram mais altos, variando entre 25 e 60%, e CuLábil entre 5 e 20% da concentração total. A complexação do cobre pelo material particulado tanto nos meses de baixa como nos de alta pluviosidade pode estar relacionada à presença de microalgas, visto que a concentração de clorofila-a foi alta e relacionou-se com SST. Sabe-se que as superfícies celulares de microalgas são capazes de se associar ao cobre, como já reportado na literatura (KNAUER et al., 1997; XUE e SIGG, 1990).

Zinco apresentou comportamento distinto ao obtido para cobre. Como mostrado na FIGURA 4.8B, zinco foi encontrado em sua maioria na forma lábil (40 a 70%) nos meses de agosto e julho, enquanto que em novembro e janeiro a dominância foi para ZnL (25 a 85%). Nos meses de maior pluviosidade (novembro e janeiro), de 15 a 40% do zinco foi detectado na fração lábil e na fração particulada de 2 a 45% (ZnP). Esses altos valores devem-se à concentração de zinco no reservatório aliado às baixas concentrações de ligantes disponíveis, favorecendo assim a predominância do zinco na forma lábil. Já nas coletas de menor pluviosidade, agosto e julho, de 10 a 40% do metal permaneceu associado ao material particulado (ZnP) e de 3 a 35% do zinco complexou-se aos ligantes presentes na fração dissolvida (ZnL).

Chumbo apresentou maior afinidade pelo material particulado (PbP), como pode ser visto na FIGURA 4.8C. Em agosto e julho, chumbo foi detectado também na fração lábil (2-70%) e apenas 2 a 12% do chumbo permaneceu na forma complexada a ligantes dissolvidos (PbL).

Segundo alguns autores (GUNDERSEN e STEINNES, 2003; HAMILTON-TAYLOR et al., 1997; VESELÝ et al., 2001) o pH é um dos fatores mais importantes que controlam a adsorção de metais no material particulado em suspensão, sendo que geralmente o aumento do pH é acompanhado pela diminuição da solubilidade de muitos metais. Segundo Gundersen e Steinnes (2003) a adsorção de metais em diferentes partículas e colóides são dependentes do pH. Hamilton-Taylor et al.

(1997) avaliaram a afinidade dos metais cobre, zinco e chumbo em diferentes pH nas águas do lago Esthwaite (UK). Os autores concluíram que com o aumento de pH, chumbo seguido de cobre e zinco apresentaram as maiores afinidades pelo material particulado em suspensão. Além disso, nos estudos realizados por Avila-Perez et al. (1999), os autores concluíram que a sedimentação contribui para a diminuição da concentração total dos metais na coluna d'água.

A FIGURA 4.9 relaciona as concentrações de cobre (A), zinco (B) e chumbo (C) complexados (ML) e lábeis (Mlábil), com as concentrações totais dos respectivos metais na fração dissolvida (MTD) durante todo o período amostral.

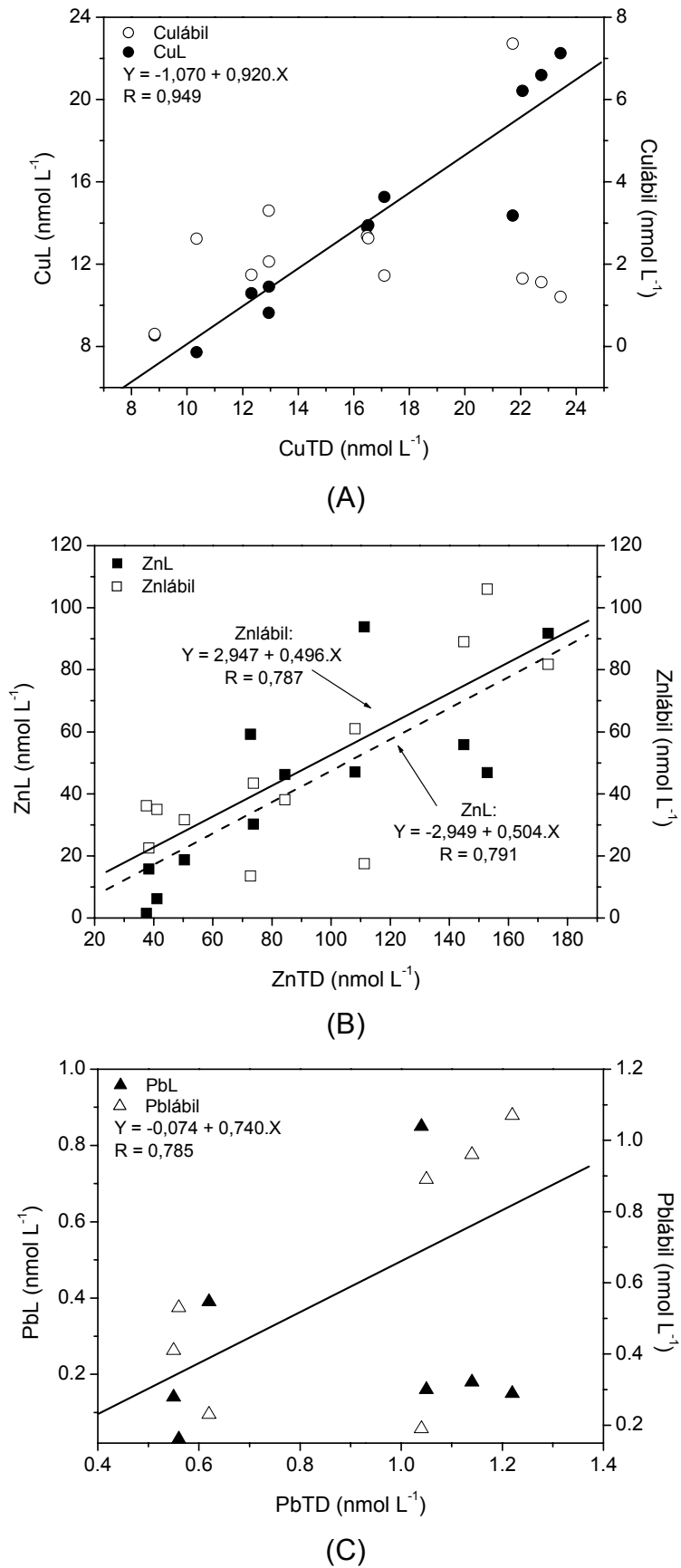


FIGURA 4.9 Concentrações de cobre (○), zinco (□) e chumbo (△) complexados (símbolos cheios) e lábeis (símbolos vazios) em função das suas respectivas concentrações na fração dissolvida.

A FIGURA 4.9 evidencia comportamentos distintos entre os metais à medida que aumenta a concentração na fração dissolvida. Observa-se que à medida que aumenta a concentração de CuTD, há um aumento da concentração de CuL enquanto Culábil mantém-se constante (FIGURA 4.9A). O aumento de ZnTD é evidenciado pelo aumento de ZnL e ZnLábil (FIGURA 4.9B). No entanto, o aumento de PbTD, proporciona aumento na concentração de Pblábil e PbL mantém-se constante (FIGURA 4.9C).

A interpretação destes resultados mostra que os ligantes presentes no reservatório ligam-se preferencialmente aos metais cobre e zinco. Esses ligantes são abundantes para cobre, favorecendo com isso a regulação da concentração de Culábil, ou seja, aquela reconhecidamente biodisponível e potencialmente tóxica. Além disso, o aumento da concentração de ZnLábil em função do ZnTD se deve à baixa concentração de ligantes disponíveis para este metal, 4 vezes menor do que ligantes disponíveis para cobre. Além disso, zinco apresenta, em média, concentração 5,5 vezes maior na fração dissolvida, quando comparado ao cobre, justificando uma maior concentração de zinco na fração lábil em relação ao cobre. Tonietto (2006) estudou a especiação de cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí (PR) e obteve que o aumento da concentração desses metais na fração dissolvida também promoveu um aumento na concentração de metais complexados pelos ligantes. Esse comportamento foi relacionado à resposta da comunidade fitoplanctônica presente no reservatório, capaz de produzir ligantes disponíveis à complexação de ambos os metais.

Quando PbTD é avaliado, observa-se que a afinidade do metal pela fração lábil é maior que sua complexação por ligantes (FIGURA 4.9C). Christensen et al. (1999) avaliaram que 85% a 90% do chumbo presente na fração dissolvida, estava complexado a ligantes na fração lábil.

A determinação da concentração do metal livre (M^{2+}) é um parâmetro importante para o conhecimento da reatividade, biodisponibilidade e efeitos do metal no ambiente aquático (ALLEN e HANSEN, 1996; GUTHRIE et al., 2005). Para sua aplicação foram selecionados os principais componentes do meio, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} , íons majoritários K^+ , NO_3^- , Ca^{2+} , CO_3^{2-} , Cl^- , NO_3^- , e os agentes complexantes – C_L e $\log K'_{ML}$. Para os ligantes considerou-se a razão estequiométrica 1:1 e a carga - 2, os cálculos foram realizados para cada amostra e as concentrações expressas em $mol L^{-1}$. Para a concentração dos metais empregou-se o valor de MTD e os

valores de pH e temperatura inseridos são aqueles obtidos *in situ* para cada amostra. A partir de cálculos utilizando o programa de equilíbrio químico MineqL+ foram obtidas as concentrações dos metais na fração lábil, ou seja, na forma livre e complexados a ligantes inorgânicos. A FIGURA 4.10 relaciona as concentrações de Cu^{2+} (A), Zn^{2+} (B) e Pb^{2+} (C) em função das concentrações na forma lábil dos respectivos metais, durante todo o período amostral.

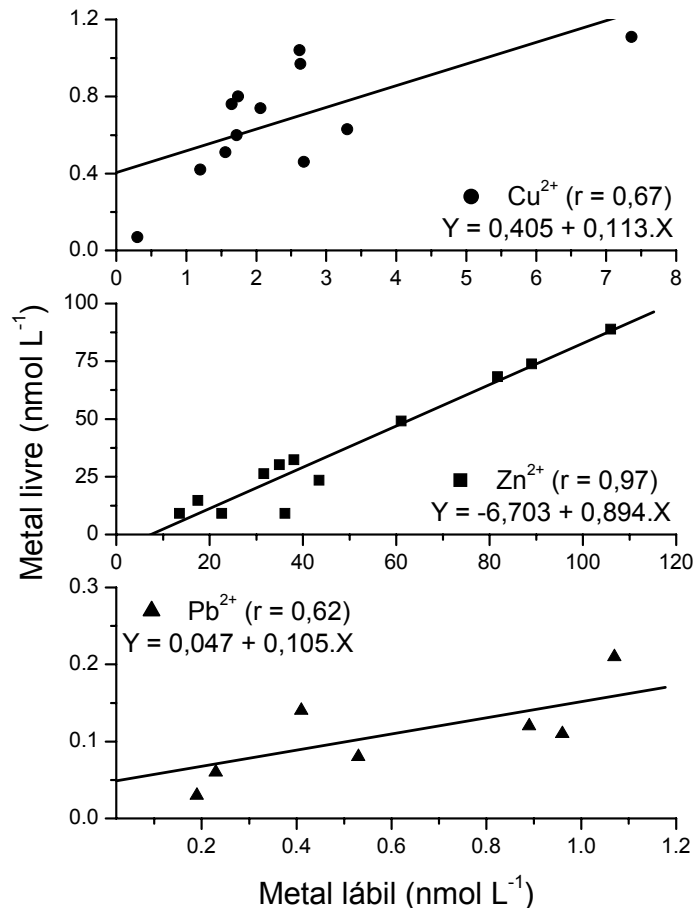


FIGURA 4.10 Variação da concentração de metal livre em função da concentração de metal lábil durante o período de amostragem. (●) cobre, (■) zinco e (▲) chumbo.

Dentre os metais, zinco apresentou maior concentração na forma livre em função do aumento do metal na fração lábil. Em ambientes aquáticos, os componentes químicos dissolvidos em solução têm potencial para formar diversos complexos químicos dissolvidos, sólidos ou espécies adsorvidas. Algumas destas espécies químicas podem ser biologicamente ativas ou até mesmo tóxicas, enquanto outras podem ser inertes. Em geral, isso depende de fatores como a concentração total de cada elemento, do pH, força iônica e temperatura (SCHECHER e MCAVOY, 1992). Estudando especiação de metais em lagos, Cheng et al. (2005) constatou que o aumento da concentração de Zn^{2+} foi diretamente

proporcional ao aumento da concentração do metal na fração dissolvida. Outros trabalhos avaliaram a toxicidade de metais na forma livre frente a diferentes organismos aquáticos e concluíram que a biodisponibilidade é dependente da presença desses íons (BROOKS et al., 2007; KNAUER et al., 1997; LOMBARDI et al., 2007; SIGG et al., 2006).

Considerando a concentração livre de todos os metais, as análises estatísticas (teste t) mostraram que não há variações nas coletas sazonais, sugerindo uma regulação dos metais na forma livre independente da estação seca ou chuvosa. Apenas Zn^{2+} apresentou diferenças significativas entre os três pontos amostrais (ANOVA, $P = 0,0354$).

As espécies dos metais na fração dissolvida obtidas através do programa de equilíbrio químico MineqL+, são mostradas na FIGURA 4.11.

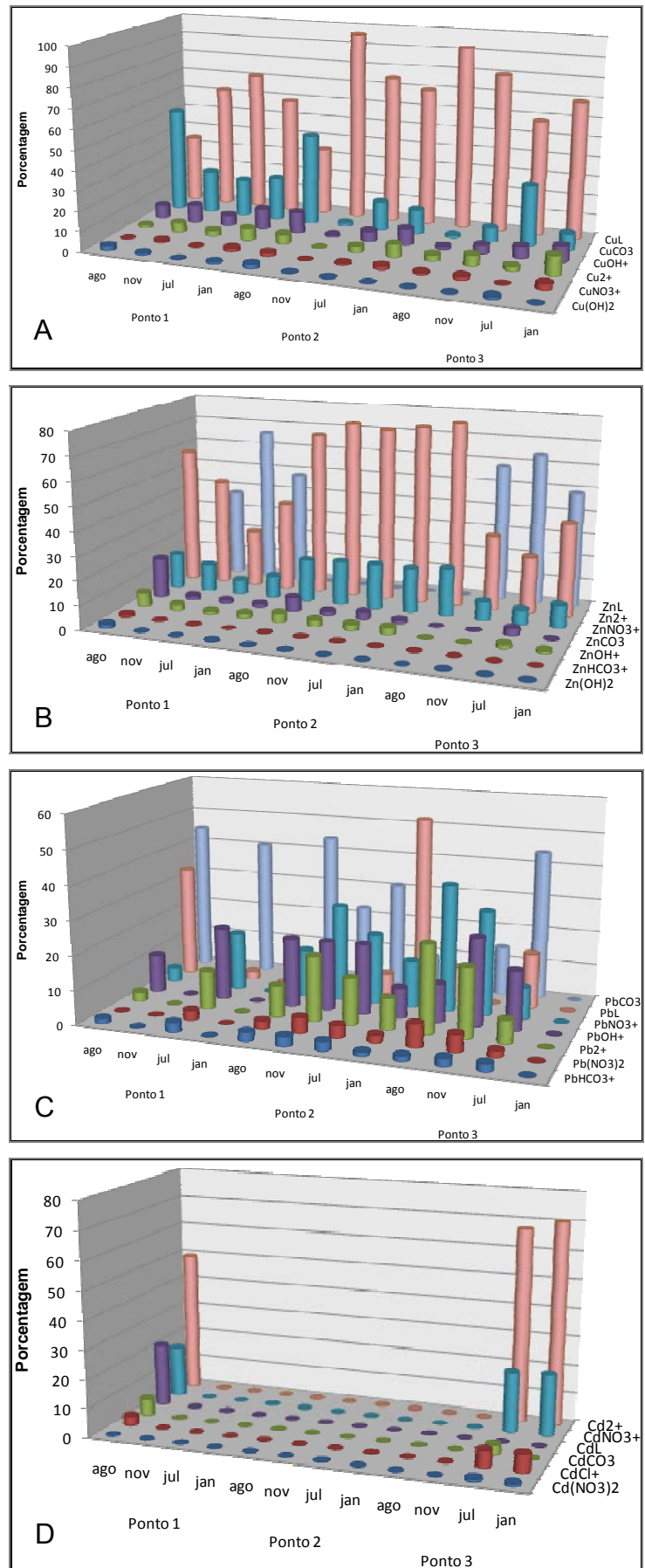


FIGURA 4.11 Espécies de cobre (A), zinco (B), chumbo (C) e cádmio (D) para a modelagem da fração dissolvida na água do Reservatório de Barra Bonita.

Avaliando a FIGURA 4.11A, observa-se que Cu-MOD (CuL) dominou a especiação do cobre (67%). Diversos estudos mostraram que em águas naturais a porcentagem do cobre complexado organicamente é alta (90%) enquanto a quantidade de cobre lábil varia em torno de 10%, sendo a maioria complexado na forma de CO_3^{2-} (APTE et al., 2000; FLORENCE e BATLEY, 1980; FLORENCE, 1982, 1986; KNAUER, 1996). Considerando a fração lábil, o modelo de equilíbrio químico mostrou que do CuTD detectado neste estudo, com o qual o modelo foi abastecido, o cobre seria teoricamente fracionado em Cu^{2+} (5%), CuOH^+ (6%), CuCO_3 (20%). Para o zinco, o estudo teórico mostrou um predomínio da forma livre (52%), entretanto 14% do metal esteve ligado a NO_3^- e 3% e 2% a CO_3^{2-} e OH^- , respectivamente (FIGURA 4.11B). Outros trabalhos utilizando modelos computacionais mostram que as principais espécies de zinco em águas naturais são Zn^{2+} (50%) e ZnCO_3 (38%) (FLORENCE e BATLEY, 1980; FLORENCE, 1986; KNAUER, 1996). Em relação ao chumbo, a porcentagem de Pblábil (69%) em relação ao PbTD indica ter havido complexação de chumbo por compostos lábeis (inorgânicos) (FIGURA 4.11C). Segundo o modelo teórico, chumbo associou-se preferencialmente a CO_3^{2-} (23%), NO_3^- (16%) e OH^- (14%). Utilizando programas de equilíbrio químico, Florence e Batley (1980) e Florence (1986) destacam a presença de chumbo em água doce associado principalmente a PbCO_3 e $\text{Pb}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ (90%). Para cádmio, o estudo teórico foi feito nas amostras onde este metal esteve acima do limite de detecção, e mostrou que, em média, 62% do metal estiveram na forma livre e 20% e 5% complexados a NO_3^- e Cl^- , respectivamente (FIGURA 4.11D). Resultados similares de Cd^{2+} (70%) foram encontrados por Florence (1986) em ambientes lóticos. De acordo com Florence (1986), em águas anóxicas cádmio pode existir na forma de CdHS^+ .

4.3 Caracterização da matéria orgânica dissolvida natural empregando fluorescência

Para avaliar as características das estruturas orgânicas presentes na matéria orgânica dissolvida nas águas do Reservatório de Barra Bonita foram conduzidas análises de fluorescência nos modos de emissão e excitação sincronizada. A FIGURA 4.12 mostra os espectros de emissão de fluorescência nos três pontos de coleta, para o período chuvoso (novembro 2007 e janeiro 2009) e seco (agosto 2007 e julho 2008).

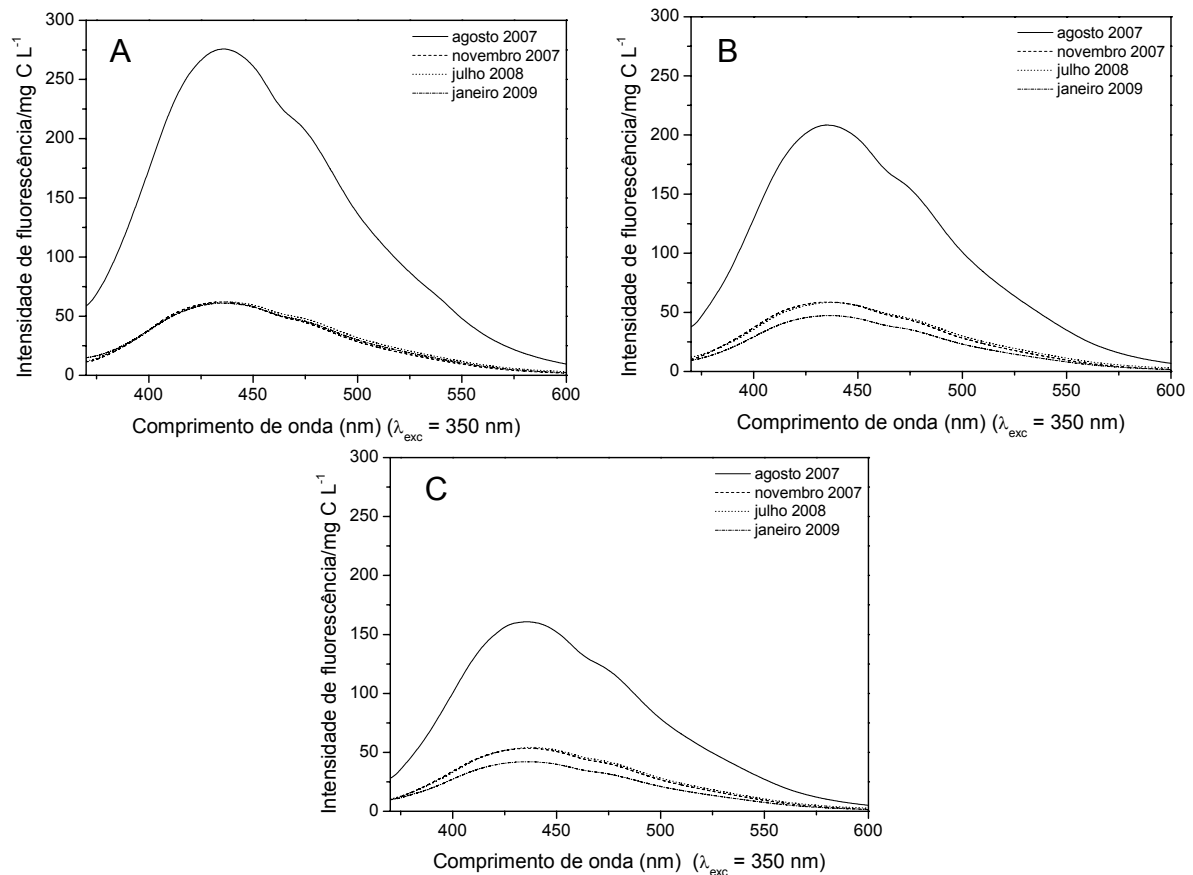


FIGURA 4.12 Espectros de emissão de fluorescência molecular obtidos para amostras do ponto 1 (A), ponto 2 (B) e ponto 3 (C).

A FIGURA 4.12 mostra que sob o aspecto qualitativo, a emissão de fluorescência da MOD é similar (ANOVA, $P = 0,4339$) para todos os pontos amostrados, sendo o máximo de emissão registrado em $436,2 \pm 0,9$ nm. No entanto, sob o aspecto quantitativo foram detectadas diferenças significativas. Foram obtidas as maiores intensidades de fluorescência nas amostras coletadas em agosto, independente do ponto de amostragem (ANOVA, $P < 0,05$), sugerindo uma maior concentração de espécies aromáticas e alifáticas conjugadas com substâncias húmicas e grupos de aminoácidos (APTE et al., 2000) em comparação aos outros meses. No entanto, nas demais comparações por ANOVA, não foram detectadas diferenças significativas ($P > 0,05$) em função da sazonalidade e nem entre os pontos amostrais.

Com maior resolução do que a emissão de fluorescência, a excitação sincronizada apresentou picos definidos em diversas regiões espectrais, que podem ser atribuídos a diferentes estruturas orgânicas (FIGURA 4.13).

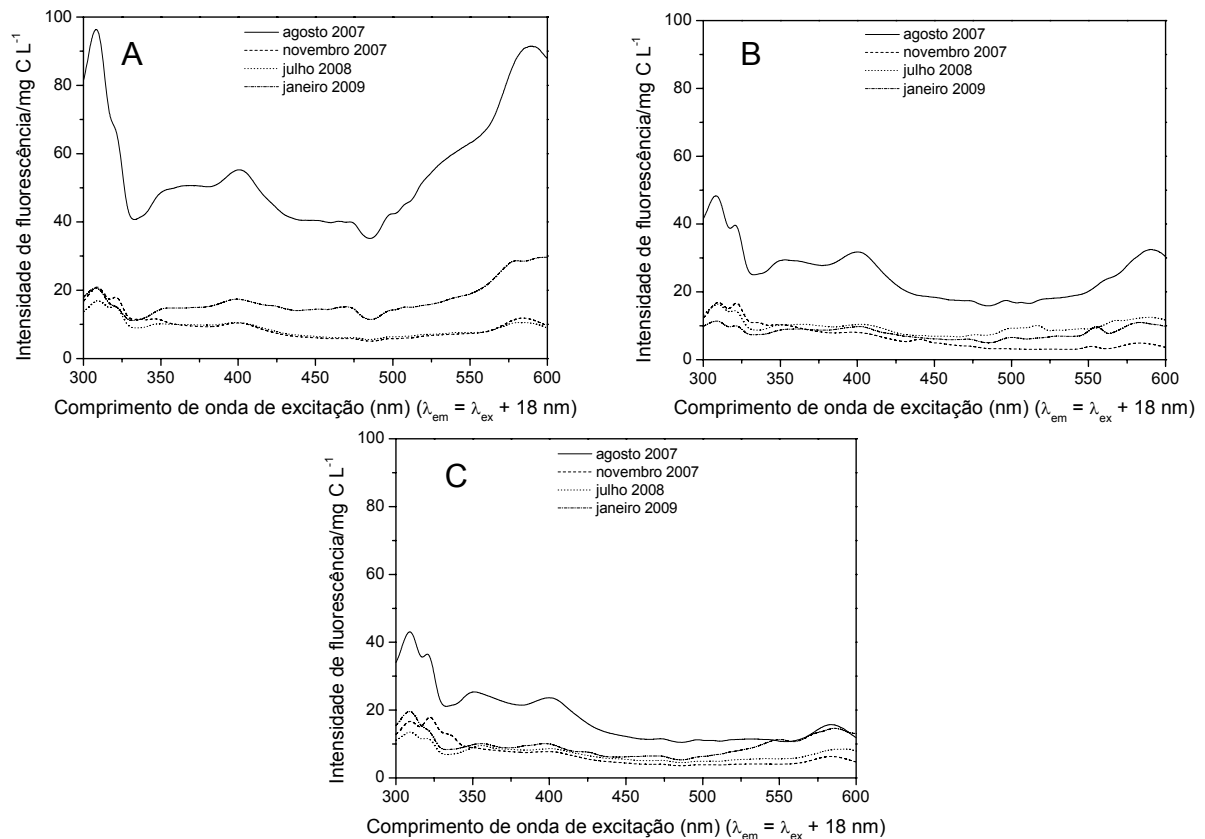


FIGURA 4.13 Espectros de fluorescência de excitação sincronizada obtidos para amostras do ponto 1 (A), ponto 2 (B) e ponto 3 (C).

De modo geral, moléculas de baixa massa molecular fluorescem quando excitadas em baixo comprimento de onda e representam a matéria orgânica autóctone, as moléculas de peso molecular médio representam componentes mais complexos como os ácidos fúlvicos que geralmente possuem origem alóctone (RETAMAL et al., 2006).

Os espectros de fluorescência de excitação sincronizada (FIGURA 4.13) mostraram as maiores intensidades de fluorescência para os pontos 1 e 2, e na região de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 284-432/302-450 nm no ponto 3 (ANOVA, $P < 0,01$) nas amostras de agosto. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os outros meses de amostragem (ANOVA, $P > 0,05$). Na FIGURA 4.13, os picos emitidos em comprimentos de onda mais curtos ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 291/309,0 \pm 0,7 nm) indicam maior concentração relativa de materiais proteicos recém formados (DEL CASTILLO et al., 2000; MOPPER e SCHULTZ, 1993; SIERRA et al., 1997). Segundo Mopper e Shultz (1993) e Parlanti et al. (2000) a abundância de compostos proteináceos nas camadas superficiais de ecossistemas aquáticos pode estar relacionada aos altos índices de atividades biológicas nas zonas fóticas. Já, a ocorrência de picos na região de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 302-304/320-322 nm (FIGURA 4.13)

refere-se à materiais proteicos tanto de origem autóctone quanto alóctone (DEL CASTILLO et al., 2000; MOPPER e SCHULTZ, 1993; SIERRA et al., 1997). Segundo Peuravuori et al. (2002), as proteínas que fluorescem nesta região do espectro geralmente são compostas por aminoácidos aromáticos e outros ácidos voláteis. Além das fontes naturais, o enriquecimento orgânico de origem antrópica pode contribuir com a alta ocorrência de proteínaceos no ambiente aquático (GUSSO, 2008). Baker e Spencer (2004) relatam uma maior ocorrência de proteínas em regiões com influência antrópica, sugerindo assim que os principais afluentes podem contribuir com proteínas para as águas de Barra Bonita.

Em todos os pontos (FIGURA 4.13) observa-se que existe uma grande similaridade entre os espectros de fluorescência sincronizada na região entre $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 332-582/350-600 nm. Essa extensa faixa espectral surge a partir da fluorescência de estruturas aromáticas formadas de 3 a 7 anéis conjugados. Além disso, nas amostras coletadas nos pontos 1 e 3 (FIGURA 4.13A e 4.13C) existem picos definidos de intensidade de fluorescência na região de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 329-338/347-356 nm que podem ser atribuídos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com 3 ou 4 anéis conjugados (PEURAVUORI et al., 2002). Todas as amostras (FIGURA 4.13) apresentaram fluorescência em $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 382/400 nm, que pode ser atribuído a estruturas policíclicas aromáticas formadas por 5 anéis conjugados (LOMBARDI e JARDIM, 1999; PEURAVUORI et al., 2002). Os picos observados na região de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 422-452/440-470 nm são característicos da presença de compostos do tipo lignina, além da presença de compostos orgânicos formados por 7 anéis aromáticos conjugados (LOMBARDI e JARDIM, 1999; PEURAVUORI et al., 2002). Segundo Gusso (2008), essa faixa espectral é característica de matéria orgânica alóctone. O aparecimento de picos nesta região também tem sido atribuído à presença de substâncias húmicas que podem conferir uma maior aromaticidade à matéria orgânica natural (WESTERHOFF e ANNING, 2000).

Com base na interpretação dos resultados obtidos, pode-se concluir que não existem diferenças significativas com relação ao aspecto qualitativo da MOD ao longo do Reservatório de Barra Bonita. A presença de picos característicos nos espectros de fluorescência sincronizada indica que existe influência do aporte de matéria orgânica alóctone de composição diversa a partir dos rios Tietê e Piracicaba e também elevada contribuição autóctone presente nessas águas.

4.4 Análise de componentes principais (PCA)

Neste trabalho, a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para avaliar variações sazonais e pontuais nas concentrações de cobre, zinco e chumbo e, ao mesmo tempo, identificar as influências dos parâmetros medidos na análise de especiação. Cádmio não foi incluído na PCA, pois a análise de especiação para este metal foi realizada em um número pequeno de amostras e sua inclusão na análise afetaria a verdadeira correlação entre as variáveis.

A PCA é considerada uma ferramenta de compressão, que permite diminuir a dimensionalidade da matriz de dados, facilitando, conseqüentemente, a sua visualização. A partir dos parâmetros mostrados no APÊNDICE 2, foi construída uma matriz de dados de dimensão 32×12 , correspondendo aos trinta e dois parâmetros analisados e seus respectivos valores considerando todas as coletas. Os dados originais foram autoescalados e utilizados para gerar o modelo de regressão multivariada. No APÊNDICE 2 estão mostrados os *loadings* estabelecidos para cada variável e a porcentagem de variância capturada para cada uma das quatro componentes principais (PCs) fornecidas.

Em geral, espera-se que um menor número de componentes principais possa explicar a maior parte da variância dos dados originais, sem perda de informação relevante. A PCA reorganizou os dados originais em quatro fatores principais, também denominadas componentes principais, que juntos explicam 75,45% da variância total dos dados originais, sendo que apenas a primeira componente (PC1) foi responsável pela captura de 32,35% da variância.

Considerando a complexidade dos sistemas naturais, nos quais os valores dos parâmetros analisados variam em função do clima, atividades antrópicas e naturais, dentre outras e o fato de apenas duas componentes principais explicarem aproximadamente 53% da variância total dos dados, a PCA é indicada para verificar semelhanças e diferenças dentro do conjunto amostral. Zimmermann et al. (2008) e Sodré et al. (2005) avaliaram a qualidade de águas naturais empregando PCA e utilizaram duas componentes principais, enquanto Tonietto (2006) utilizou três componentes principais para capturar variâncias de 56%, 62% e 58%, respectivamente.

A partir dos dados mostrados no APÊNDICE 2, observa-se que a primeira componente principal (PC1), que explicou 32,35% da variabilidade, é a que apresenta maior correla o com parâmetros analisados que, em conjunto,

determinam o grau de poluição de um corpo aquático natural (alcalinidade, cloreto, nitrato, carbono orgânico dissolvido, carbono inorgânico, OD, pH, condutividade e clorofila-a) e parâmetros relativos à sazonalidade (temperatura da água e concentração de sólidos suspensos). Para esta componente principal nota-se também um elevado coeficiente de correlação para a concentração de cobre nas formas CuT, CuTD e CuL, ZnL, $\log K'_{PbL}$ e PbT, PbTD, PbL e Pblábil.

A segunda componente principal (PC2), que explicou 20,45% da variabilidade, correlacionou principalmente à análise de especiação do cobre e zinco e foi responsável pela correlação inversa entre Culábil, Cu^{2+} , C_LCu , ZnT, ZnTD, ZnL, Znlábil, Zn^{2+} em função do $\log K'_{CuL}$, Pb^{2+} e nitrato.

Para associar estes resultados às coletas e seus respectivos pontos amostrais, são mostrados a seguir os gráficos que representam as correlações entre as variáveis (*loadings*) (FIGURA 4.14A) e os casos (*scores*) (FIGURA 4.14B).

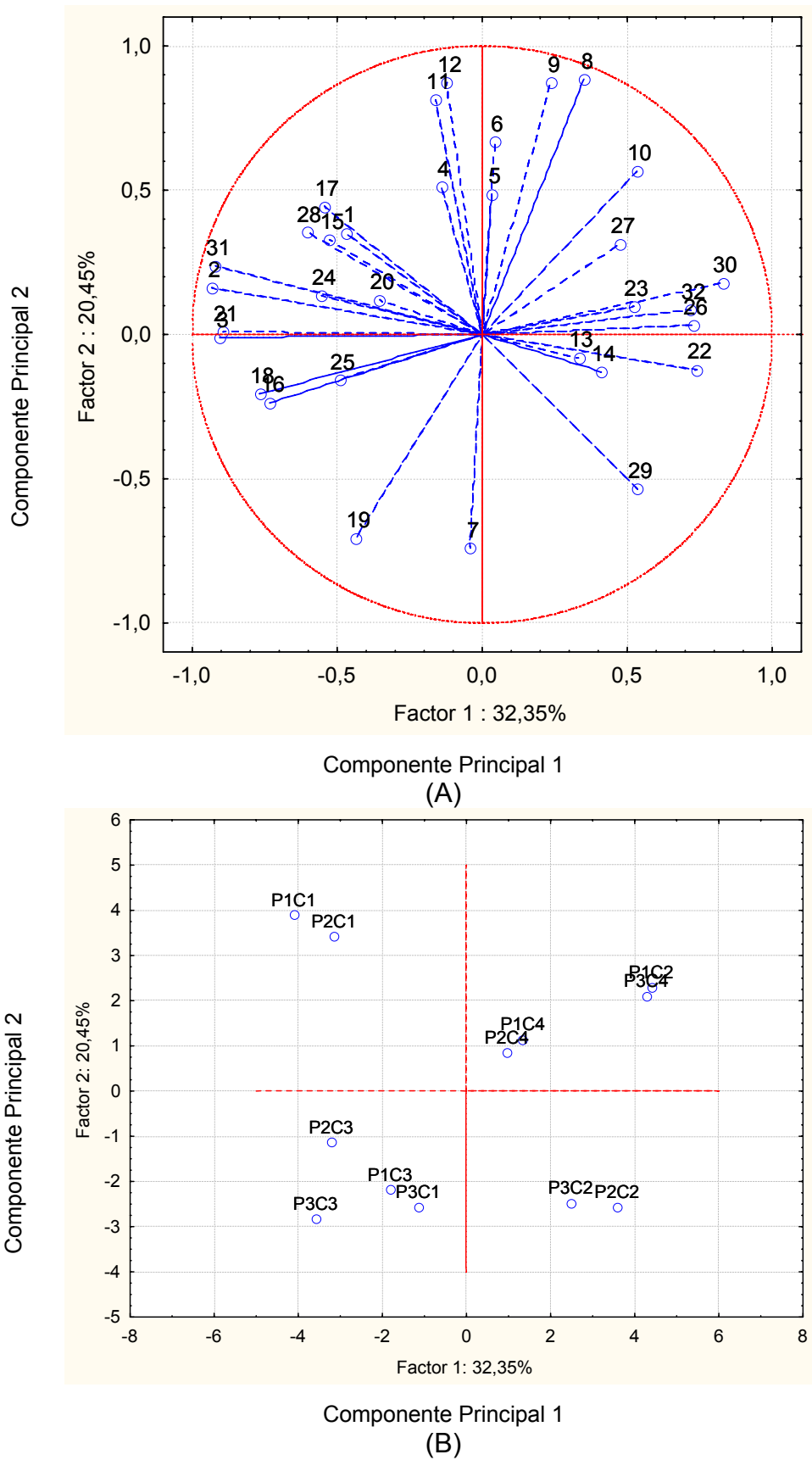


FIGURA 4.14 Gráficos de (A) variáveis (*loadings*) e (B) casos (*scores*), para as duas componentes principais das amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (Factor 1 = PC1; Factor 2 = PC2). Gráfico (A): números representam as variáveis descritas no APÊNDICE 2. Gráfico (B): símbolos que representam os pontos: ponto 1 (P1), ponto 2 (P2), ponto 3 (P3); símbolos que representam as coletas: agosto 2007 (C1), novembro 2007 (C2), julho 2008 (C3) e janeiro 2009 (C4).

O gráfico de *loadings* para as duas primeiras componentes principais é mostrado na FIGURA 4.14A, representando a influência das variáveis sobre a distribuição espacial das amostras. Na FIGURA 4.14B é apresentado o gráfico de *scores* associados aos resultados dos três pontos amostrais (casos) durante as quatro coletas, demonstrando a capacidade da primeira componente principal em discriminar as amostras em função da sazonalidade: estação chuvosa, à direita do gráfico, e estação seca, à esquerda.

Avaliando a PC1 (FIGURA 4.14A), nota-se que a maior quantidade de parâmetros relacionados ao grau de impactação de um corpo aquático, como alcalinidade total (27), cloreto (26), COD (22) e CI (23), nitrato (29) e ainda temperatura da água (30) e condutividade (32), associam-se às amostras do período de maior precipitação, à direita no gráfico (FIGURA 4.14B). A interpretação dos resultados mostra ainda que ZnL (10) relaciona-se a estes parâmetros. É conhecido que valores elevados a estes parâmetros podem ser consequência do aporte de esgotos em águas naturais, sendo que cloreto e COD evidenciam melhor esta possibilidade (PETTINE et al., 1996). Apesar do aporte de esgoto ser constante no Reservatório de Barra Bonita, a interpretação dos resultados obtidos através da PCA mostra que a contribuição no período chuvoso é ainda maior.

Considerando que o local de amostragem encontra-se numa região de transição entre clima tropical e subtropical (PANHOTA et al., 2007), onde temperaturas elevadas são comuns durante o período chuvoso (primavera/verão), é esperado que a precipitação e a temperatura (ELCI, 2008), sejam fatores importantes. Entretanto, observa-se que concentrações elevadas de ZnL (10), alcalinidade (27), cloreto (26), COD (22), CI (23) e nitrato (29) também se correlacionam neste período. Portanto, surgem evidências da contribuição de poluição para o reservatório no período de chuvas. Esta contribuição é oriunda dos seus principais afluentes, rio Piracicaba e, principalmente, o rio Tietê (CETESB, 2007, 2008), que contribui com dobro de contaminação nas águas de Barra Bonita (MATSUMURA-TUNDISI e TUNDISI, 2005). Além disso, não deve ser descartada a deposição úmida, que retira o material particulado da atmosfera, e o escoamento que dela resulta, contribuindo para o aporte de metais nos ambientes aquáticos (FONTENELE et al., 2009; MEYLAN et al., 2003). Segundo dados da CETESB (2007, 2008) tem havido uma piora significativa na qualidade da água do Reservatório de Barra Bonita, encontrando-se em estado avançado de trefia. Essa

piora está associada tanto aos poluentes da sua bacia de drenagem, quanto dos provenientes da RMSP.

A esquerda da PC1 localizam-se as amostras coletadas no inverno, (agosto/2007 e julho/2008) (FIGURA 4.14B), período em que ocorreram as menores precipitações, e a PC1 relacionou com parâmetros autóctones (FIGURA 4.14A). Essas amostras foram discriminadas pelas altas concentrações de oxigênio dissolvido (31), com concentrações que variaram de 4,5 a 8,8 mg L⁻¹, pH (28), clorofila-a (24) chegando até 106 mg L⁻¹ e SST (25). As interpretações destes resultados suportam a ideia de que neste período os excessos de nutrientes, oriundo dos rios Tietê e Piracicaba, favorecem os parâmetros relacionados à eutrofização do reservatório. A correlação positiva univariada entre clorofila-a e SST (FIGURA 4.2) é confirmada através da PC1. Tal relação indica que os sólidos suspensos presente no reservatório estão relacionados a uma componente biótica autóctone, na medida em que está vinculado a um parâmetro indicativo da produção primária da comunidade fitoplanctônica e, conseqüentemente, à presença de excretados das microalgas e cianobactérias. Esses parâmetros também se relacionam com CuT (1), CuTD (2) e CuL (3) e grande parte das concentrações analisadas de chumbo (PbT (15), PbTD (16), PbL (17), Pblábil (18) e logK_{PbL} (21)). De fato, a interpretação dos resultados mostra as maiores concentrações de cobre e chumbo em praticamente todos os pontos de amostragem durante o período seco (FIGURA 4.6). Estes resultados estão em acordo com outros da literatura. Mylon et al. (2003) descrevem que a complexação do cobre é muito maior em épocas de seca e que altas concentrações de Cu²⁺ determinadas no início do período chuvoso sofre rápido decaimento, sugerindo uma alta afinidade dos ligantes pelo metal.

A presença de SST (25) associada ao período de seca (inverno) mostra que o aporte de cobre e chumbo pode estar relacionado à presença de sólidos em suspensão oriundos de águas de escoamento superficial. Apesar de o período apresentar escoamento menor, o tempo de retenção da água no reservatório varia de 90 - 150 dias, além da direção dos ventos que coincide com o eixo longitudinal do reservatório (VIEIRA et al., 2008). Esse resultado é corroborado por estudos realizados por Calijuri e dos Santos (2001). Os autores concluíram que as condições físico-químicas do Reservatório de Barra Bonita são afetadas pelas variáveis climáticas, operação da barragem, interações biológicas e pelo processo fisiológico do fitoplâncton. Superpostas às funções de forças climatológicas e hidrológicas, as

atividades humanas na bacia hidrográfica produzem considerável impacto, tais como a descarga de nitrogênio e fósforo de esgotos não tratados, materiais particulados e dissolvidos em suspensão, e fertilizantes provenientes das plantações de cana-de-açúcar na bacia hidrográfica (TUNDISI et al., 2008). Além disso, Fontenele et al. (2009) determinaram as concentrações de cádmio, cobre, chumbo e íons majoritários em águas de chuva coletadas na região central de São Paulo e observaram que cobre foi a espécie predominante com concentração média de $49,5 \text{ nmol L}^{-1}$, enquanto o valor médio para cádmio e chumbo foi de 1,33 e $8,52 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente. Os autores concluíram ainda que as concentrações mais elevadas foram observadas em amostras coletadas após vários dias sem ocorrência de eventos de chuva, sugerindo acumulação dos poluentes na atmosfera durante o período seco.

Através da PC1 confirmou-se também relações observadas na análise univariada entre CuTD e CuL (FIGURA 4.9), ou seja, há uma relação entre o período de menor pluviosidade (agosto/2007 e julho/2008) e os maiores valores de CuTD (2) e CuL (3). Esta correlação direciona para a existência de um sistema de tamponamento metálico suportado pelos ligantes, pois com o aumento do CuTD, CuL aumenta proporcionalmente. Nessa situação há um favorecimento da diminuição da biodisponibilidade do metal no ambiente aquático.

A PC2, que explicou 20,45% da variância total dos dados, diferenciou as amostras em função da especiação, principalmente, de cobre e zinco independente da sazonalidade e dos pontos amostrais. Na variação positiva, acima da linha horizontal (FIGURA 4.14B), localizam-se as amostras de agosto/2007 (pontos 1 e 2), novembro/2007 (ponto 1) e janeiro/2009 (pontos 1, 2 e 3). Estas amostras foram discriminadas pelos parâmetros $\text{Cu}^{\text{lábil}}$ (4), Cu^{2+} (5), C_LCu (6), ZnT (8), ZnTD (9), ZnL (10), $\text{Zn}^{\text{lábil}}$ (11) e Zn^{2+} (12). A correlação entre os parâmetros 4 e 5 mostra que há um aumento da concentração de Cu^{2+} em função do aumento de $\text{Cu}^{\text{lábil}}$, relação observada na análise univariada (FIGURA 4.10). A PC2 (FIGURA 4.14A) confirmou as correlações entre as concentrações de zinco, já relacionadas nas análises univariadas (FIGURAS 4.9 e 4.10), ou seja, o aumento da concentração de zinco nas águas (ZnT e ZnTD) promove o aumento das concentrações de ZnL, $\text{Zn}^{\text{lábil}}$ e Zn^{2+} .

As demais amostras, situadas abaixo da linha horizontal (FIGURA 4.14B), foram discriminadas pela concentração elevada de Pb^{2+} (19), $\log K'_{\text{CuL}}$ (7) e nitrato

(29) (FIGURA 4.14A). Os valores altos desses parâmetros mostra haver contribuição das cargas pontuais e difusas, originadas da contaminação proveniente de efluentes industriais (PRADO et al., 2007) e principalmente oriundo da RMSP (FONTENELE et al., 2009).

Estudo prévio realizado no Médio Tietê detectou a presença de cobre, chumbo, níquel e zinco em concentrações superiores aos limites estabelecidos pela legislação federal (CETESB, 2008). A maior parte dessa contaminação foi proveniente da Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos (UGRHI) à montante, uma vez que os pontos mais próximos da RMSP apresentaram porcentagens históricas maiores quanto ao não atendimento aos padrões de qualidade. O Rio Tietê, na maior parte da RMSP, está enquadrado na classe 4, onde os padrões de qualidade são ausentes. No Reservatório de Barra Bonita, análises da CETESB determinaram em janeiro de 2008, concentrações de mercúrio acima do limite estabelecido pela legislação. Porém, analisando os resultados deste estudo de especiação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo verifica-se que o aporte dessas cargas poluidoras não compromete de maneira significativa a qualidade das águas superficiais do Reservatório de Barra Bonita, permitindo sua classificação como moderadamente comprometido (classe 2) (CETESB, 2007, 2008), segundo a resolução do CONAMA 357/2005.

Estudar um reservatório artificial como o de Barra Bonita, cujo tempo de retenção é controlado pelo Homem na medida de sua necessidade em resposta à pluviosidade, remete para a consideração de que este reservatório contenha características de um sistema misto entre sistemas lêntico e lótico (PETESSE et al., 2007; TUNDISI et al., 2008). Em um sistema lêntico, a dinâmica entre diferentes pontos amostrais tende a variar mais com a profundidade e temperatura, diária em regiões tropicais-subtropicais (ESTEVEZ, 1998) e sazonal em regiões temperadas, gerando estratificação ao longo do ano. Nos casos de sistemas lóticos, a variação entre pontos amostrais é menos percebida, sendo o sistema um todo mais homogêneo (SIGEE, 2005). Essa mistura de sistemas lêntico e lótico que confere ao Reservatório de Barra Bonita uma característica peculiar, o que o torna também mais homogêneo, característica suportada pela similaridade entre os diversos pontos amostrais.

4.5 Competição entre os metais cobre e zinco por ligantes nas águas do Reservatório de Barra Bonita

O objetivo desta parte da pesquisa foi verificar a existência (ou não) de competição por ligantes naturais e identificar a seletividade destes ligantes em relação aos metais cobre e zinco. A partir da titulação de CC das amostras dos pontos 1 e 3 (julho 2008 e janeiro 2009) com cobre e zinco, foram utilizados os resultados para avaliar a competição entre os metais por ligantes naturais. A escolha dos metais e dos pontos amostrais se deve pela presença de ligantes disponíveis nas amostras. A FIGURA 4.15 exemplifica os voltamogramas obtidos na titulação de competição.

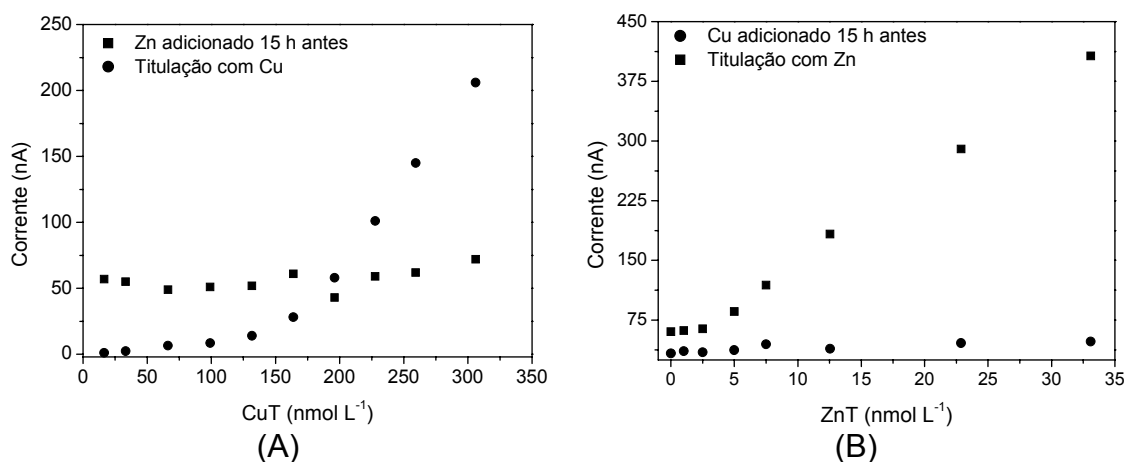


FIGURA 4.15 Voltamogramas obtidos nas titulações de cobre (●) e zinco (■) na amostra de água do Reservatório de Barra Bonita. (A) Adição de Zn e titulação com Cu; (B) Adição de Cu e titulação com Zn.

Observa-se que à medida que a amostra é titulada com cobre (FIGURA 4.15A) ou com zinco (FIGURA 4.15B), não há variação significativa nas correntes dos metais, zinco (FIGURA 4.15A) e cobre (FIGURA 4.15B), previamente adicionados. Isso indica que o cobre não compete pelos ligantes complexados ao zinco e, de modo análogo, que o zinco não compete pelos ligantes inicialmente complexados ao cobre. De fato, como evidenciado pelas análises de complexação nas amostras do reservatório, o $\log K'_{ML}$ médio para os complexos envolvendo cobre e zinco foram similares (teste t, $P = 0,0705$).

No entanto, os resultados de CC dos estudos de competição entre os metais apresentaram diferenças significativas, independente do ponto amostral. Estão apresentados a seguir os valores obtidos para a titulação do cobre (TABELA 4.2) e zinco (TABELA 4.3) antes e após a competição.

TABELA 4.2 Concentração de cobre lábil, complexado e capacidade de complexação (C_L e $\log K'_{ML}$) do cobre na água do Reservatório de Barra Bonita, antes e após adição de zinco ($n = 3$; média \pm desvio padrão).

	Titulação com Cu				Titulação com Cu após adição de Zn			
	Culábil (nmol L ⁻¹)	CuL (nmol L ⁻¹)	C _L Cu (nmol L ⁻¹)	$\log K'_{CuL}$	Culábil (nmol L ⁻¹)	CuL (nmol L ⁻¹)	C _L Cu (nmol L ⁻¹)	$\log K'_{CuL}$
Julho 2008 – Ponto 1	2,68 \pm 1,05	13,8 \pm 1,05	247 \pm 46,1	8,04 \pm 0,24	1,24 \pm 0,59	15,2 \pm 0,59	179 \pm 13,6	8,27 \pm 0,03
Julho 2008 – Ponto 3	1,56 \pm 0,68	21,2 \pm 0,68	219 \pm 7,63	8,10 \pm 0,27	0,98 \pm 0,24	21,8 \pm 0,24	180 \pm 17,7	8,65 \pm 0,35
Janeiro 2009 – Ponto 1	2,63 \pm 0,42	13,9 \pm 0,42	305 \pm 13,7	7,53 \pm 0,07	2,57 \pm 1,26	14,2 \pm 1,26	230 \pm 17,8	7,90 \pm 0,08
Janeiro 2009 – Ponto 3	2,62 \pm 0,34	7,72 \pm 0,34	251 \pm 7,61	7,45 \pm 0,11	3,41 \pm 0,74	6,93 \pm 0,74	168 \pm 11,7	7,57 \pm 0,06

TABELA 4.3 Concentração de zinco lábil, complexado e capacidade de complexação (C_L e $\log K'_{ML}$) do zinco na água do Reservatório de Barra Bonita, antes e após adição de cobre ($n = 3$; média \pm desvio padrão).

	Titulação com Zn				Titulação com Zn após adição de Cu			
	Znlábil (nmol L ⁻¹)	ZnL (nmol L ⁻¹)	C _L Zn (nmol L ⁻¹)	$\log K'_{ZnL}$	Znlábil (nmol L ⁻¹)	ZnL (nmol L ⁻¹)	C _L Zn (nmol L ⁻¹)	$\log K'_{ZnL}$
Julho 2008 – Ponto 1	36,1 \pm 4,01	1,44 \pm 4,01	41,3 \pm 3,99	8,22 \pm 0,09	37,6 \pm 2,09	-	58,2 \pm 4,80	6,59 \pm 0,34
Julho 2008 – Ponto 3	22,6 \pm 1,92	15,7 \pm 1,92	81,4 \pm 7,95	7,67 \pm 0,10	38,3 \pm 2,87	-	44,6 \pm 7,07	6,89 \pm 0,51
Janeiro 2009 – Ponto 1	38,1 \pm 5,68	46,2 \pm 5,68	51,8 \pm 4,26	8,03 \pm 0,05	84,4 \pm 5,19	-	44,3 \pm 3,06	7,80 \pm 0,18
Janeiro 2009 – Ponto 3	81,7 \pm 8,83	91,7 \pm 8,83	89,2 \pm 7,01	8,51 \pm 0,19	110 \pm 8,14	63,5 \pm 8,14	52,3 \pm 4,95	6,67 \pm 0,43

A interpretação dos resultados da titulação da amostra na qual zinco foi previamente adicionado e cobre, o metal titulante (TABELA 4.2), mostrou que não houve diferenças significativas entre as concentrações de $C_{\text{Lábil}}$, C_{CuL} e $\log K'_{\text{CuL}}$ (exceto ponto 1, janeiro 2009) sem a adição de zinco e após a adição deste metal. No entanto, após a titulação de competição, houve uma diminuição da concentração de ligantes disponíveis ao cobre (teste t, $P < 0,0238$), sugerindo que o cobre não compete com o zinco previamente adicionado, por ligantes já complexados, mas os ligantes antes disponíveis ao cobre, complexam zinco.

A determinação da CC para zinco após a titulação de competição (TABELA 4.3) indicou que o cobre, previamente adicionado, afetou a especiação do zinco, ocupando ligantes aos quais este metal já se encontrava complexado no ambiente. Como resultado, houve um aumento de $Zn_{\text{Lábil}}$ (teste t, $P < 0,0152$) e diminuição da C_{LZn} (teste t, $P < 0,0039$) e $\log K'_{\text{ZnL}}$ (teste t, $P < 0,0025$). A interpretação desses resultados mostra a existência de uma maior afinidade do cobre por alguns ligantes que antes estavam complexados ao zinco. A diferença estatística (teste t, $P = 0,003$) observada nas K'_{ML} para os metais após a titulação de competição mostra o envolvimento de diferentes ligantes na complexação de metais em águas naturais. Os ligantes naturais podem ser lábeis ou de natureza húmica. Os lábeis são excretados por microrganismos ou têm origem através da degradação de material biológico (XUE et al., 1995). Em ambos os casos, os ligantes naturais podem incluir algumas estruturas quelantes, tais como grupos funcionais aminos ou sulfídricos. Segundo Xue et al. (1995), a alta seletividade do cobre, comparado ao zinco, é devida a quelantes com grupos amino (etilenodiamina - EN): $\log K'_{\text{CuEN}} = 10,48$ e o $\log K'_{\text{ZnEN}} = 5,66$. Além disso, outros ligantes diamínicos que incluem 3 ou mais grupos aminos têm seletividade e altos valores de K' para cobre. Alguns peptídeos, também apresentam alta seletividade para cobre, exemplo Gly-L-His-L-Lys, $\log K'_{\text{Cu}} = 16,4$, $\log K'_{\text{Zn}} = 8,2$ e fitoquelatinas. Esses compostos incluem estruturas com diversos grupos aminos que complexam cobre e podem ocorrer em ambientes naturais (XUE et al., 1995).

Os resultados aqui apresentados são similares ao obtidos por Xue et al. (1995), que estudaram a competição entre cobre e zinco em ambientes naturais. Os autores constataram que a titulação com zinco não afetou a especiação do cobre previamente adicionado, mas a titulação com cobre influenciou a especiação do zinco. Similar a este estudo, as concentrações de $Zn_{\text{Lábil}}$ e Zn^{2+} aumentaram após a

adição do cobre, sugerindo que o cobre adicionado substituiu o zinco nos complexos e o zinco foi então deslocado para espécies mais lábeis. Estudos de competição entre cobre e zinco foram também realizados por Hoffmann et al. (2007) em águas naturais. No entanto, esses autores demonstraram que os metais complexaram-se a ligantes específicos, não competindo entre si. Chakraborty e Chakrabarti (2008) estudaram a competição de cádmio, cobre e zinco por ligantes previamente ocupados por chumbo em substâncias húmicas. Os autores concluíram que cádmio e zinco competem por ligantes fracos (inorgânicos), enquanto cobre compete por ligantes orgânicos promovendo uma maior concentração de íons Pb^{2+} , de maior biodisponibilidade do que complexos Pb-SH. Cao et al. (1995) avaliaram a competição de Ca^{2+} e metais traço (Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+}) por ácidos húmicos em ambientes aquáticos. Os autores observaram competições entre cobre e chumbo, e quando cálcio foi previamente adicionado, a CC frente os metais traço diminuiu, sugerindo que os metais não competem necessariamente pelos mesmos ligantes.

Como a titulação de competição mostrou que zinco, em comparação ao cobre, apresentou menor seletividade frente aos ligantes presentes na água, esse comportamento favoreceu a regulação do $Cu^{lável}$ e o considerável aumento de $Zn^{lável}$. Como consequência do aumento do $Zn^{lável}$, houve um aumento do Zn^{2+} , nas águas de Barra Bonita. Baseado na interpretação desses resultados, conclui-se que a dinâmica dos ligantes pode favorecer a diminuição da disponibilidade dos metais para organismos aquáticos, suportando maiores concentrações de Zn^{2+} em comparação ao Cu^{2+} . As interpretações dos resultados mostram ainda que há uma seletividade dos ligantes disponíveis aos metais cobre e zinco, e que esta seletividade pode estar relacionada a efeitos cinéticos da associação metal-ligante, pois foi detectada alteração na especiação de zinco mediante adição do cobre nas amostras naturais. Portanto, conclui-se que os ligantes disponíveis nas águas do reservatório apresentam certa especificidade/seletividade quanto à sua capacidade de complexar os metais cobre e zinco.

5 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados dos parâmetros físico-químicos e biológicos foi possível atribuir elevado grau de deterioração da qualidade da água do Reservatório de Barra Bonita (SP).

A ordem das concentrações total e total dissolvida dos metais foi $Zn > Cu > Pb > Cd$ independente da localização amostral, sendo que os pontos 1 e 2 apresentaram os maiores valores de CuT. Quanto à sazonalidade, concentrações elevadas de CuTD e PbTD foram obtidas nas coletas de inverno (menor pluviosidade).

A avaliação da capacidade de complexação da água para os quatro metais indicou maior concentração de ligantes disponíveis para cobre, seguido de chumbo, zinco e cádmio, entretanto a estabilidade da ligação metal-ligante foi similar para todos os metais.

A variação sazonal resultou em diferenças significativas na especiação dos metais. No inverno (seco) predominou CuL, Zn_lábil, PbP e Pb_lábil, enquanto que no verão (chuvoso) zinco predominou na forma ZnL, cobre nas formas CuL e CuP, e chumbo predominou na forma PbP.

Aumento das concentrações de CuTD, ZnTD e PbTD na água do reservatório, resultou em aumento de CuL, ZnL, Zn_lábil e Pb_lábil, mas não afetou as concentrações de Cu_lábil e PbL.

Segundo o modelo de equilíbrio químico MineqL+, cobre e chumbo predominam na forma de complexos com carbonatos, enquanto cádmio e zinco permanecem na forma iônica livre. Relações diretamente proporcionais foram obtidas entre as concentrações de zinco, cobre e chumbo livres e as concentrações desses metais nas respectivas formas lábeis.

A emissão de fluorescência da água é similar ao longo do reservatório, entretanto, maior intensidade de fluorescência foi obtida nas amostras coletadas em agosto, sugerindo uma maior concentração de espécies aromáticas e alifáticas conjugadas, substâncias húmicas e aminoácidos em comparação aos outros meses. A fluorescência de excitação sincronizada mostrou que tanto o aporte de matéria orgânica alóctone de composição diversa é importante no reservatório, como também a contribuição autóctone da MOD lábil.

A competição entre os metais cobre e zinco por ligantes na água do reservatório mostrou que durante a titulação os metais não competem por ligantes já complexados. Entretanto, cobre previamente adicionado afetou a especiação do zinco, ocupando ligantes fortes que eram anteriormente disponíveis ao zinco. Quando zinco foi previamente adicionado e cobre o titulante, notou-se que aquele metal ocupou ligantes antes disponíveis ao cobre, mas não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de $Cu_{\text{lábil}}$, Cu_L e $\log K'_{CuL}$.

As interpretações dos resultados obtidos nesta parte da pesquisa contribuem para o entendimento de como fatores físico-químicos e biológicos afetam a especiação dos metais em ambientes aquáticos eutróficos e contaminados. Dentre os metais, cádmio foi o que menos se associou à MOD, estando preferencialmente nas formas biodisponíveis (lábil e livre). Cobre apresentou alta afinidade pela MOD, e no verão chuvoso também dominou no material particulado. Zinco predominou associado à MOD. A presença da matéria orgânica particulada promoveu a transferência do chumbo da fração dissolvida para o material particulado, indicando que o sedimento pode atuar como fonte de chumbo para a coluna d'água.

CAPÍTULO 2:

**CARACTERIZAÇÃO E CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO DOS
EXCRETADOS DE *Cylindrospermopsis raciborskii* FRENTE AOS
METAIS Cu, Zn, Cd e Pb**

6 INTRODUÇÃO

O aumento das florações de algas e outros microrganismos nocivos em ambientes aquáticos tornou-se um problema mundial (FASTNER et al., 2003; KUBO et al., 2005). Estima-se que 40 gêneros sejam responsáveis pelas florações, dentre eles, cita-se as cianobactérias de água doce *Anabaena* sp., *Microcystis* sp., *Cylindrospermopsis* sp. e *Planktothrix* sp. (KUBO et al., 2005; VIEIRA et al., 2008). Um dos fatores que suportam tais florações é o aumento do grau trófico dos ecossistemas aquáticos, decorrente do aporte de nutrientes (FASTNER et al., 2003). Certas espécies de cianobactérias são conhecidas por suas toxinas intracelulares (hepato- e neurotoxinas), as microcistinas e cilindrospermopsinas, que no ambiente ameaçam a saúde humana e da biota (BOGIALLI et al. 2006; FASTNER et al., 2003).

Cylindrospermopsis raciborskii, principal produtora de cilindrospermopsina, recebe crescente atenção por parte de toxicólogos e autoridades ambientais, devido à sua considerável expansão geográfica (BOGIALLI et al. 2006; FASTNER et al., 2003). Há 10 anos esta alga era rara, mas nos dias atuais é frequentemente observada em florações que ocorrem em lagos e reservatórios para abastecimento, expondo a população humana a estas toxinas (BOGIALLI et al. 2006). Efeitos nocivos causados pela toxina de *C. raciborskii* em seres humanos foi observado pela primeira vez em 1979 no Reservatório de Solomon (Austrália). Parte da população local foi abastecida com a água deste reservatório, provocando a intoxicação de 148 pessoas (BOGIALLI et al., 2006; FASTNER et al., 2003). No Brasil, a grande expansão na distribuição de *C. raciborskii* deu-se a partir da década de 90, coincidindo com o aumento da eutrofização dos ecossistemas aquáticos (TUCCI e SANTANNA, 2003). Há indícios de que o forte evento El Niño de 1997-1998 tenha também favorecido o desenvolvimento desta cianobactéria tornando-a um dos mais importantes componentes das comunidades fitoplanctônicas (TUCCI e SANTANNA, 2003).

Além da toxicidade intrínseca das toxinas produzidas pelas cianobactérias, Moeller et al. (2007) relata que o efeito tóxico de certas toxinas podem ser potencializados em condições ambientais específicas. Os autores observaram que a associação da toxina produzida por *Pfiesteria piscicida* (dinoflagelado marinho) com metais presentes no ambiente, pode potencializar sua toxicidade.

6.1 Importância das microalgas e cianobactérias na química de metais traço em ambientes aquáticos

Em ambientes aquáticos, importante fração da MOD é originada de organismos ali presentes, como algas, fungos, bactérias, macrófitas, peixes e outros animais (KOUKAL et al., 2007) e portanto, é produzida *in situ* através da acumulação e subsequente degradação. O fitoplâncton, onde se incluem as microalgas e cianobactérias, são importantes produtores primários nesses ambientes (LORENZO et al., 2007). Dentre os vários mecanismos de produção de MOD autóctone por esses organismos, incluem-se a liberação ativa de compostos fotossintetizados (excretados algais), ruptura e degradação de células e ruptura de células devido à pastagem do zooplâncton (KOUKAL et al., 2007; LORENZO et al., 2007).

Os microrganismos e seus produtos de excreção geralmente apresentam a habilidade de se associar a elementos metálicos, em menor ou maior grau, e assim alterar a especiação dos metais no ambiente. Essa associação é importante, pois pode solubilizar um íon que antes se encontrava precipitado, tornando-o menos ou mais disponível. Essa habilidade varia de acordo com o organismo e o metal, podendo ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas (KNAUER, 1996; LOMBARDI et al., 2002). Fatores do ambiente como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros metais, influenciam a eficiência e seletividade dos mecanismos de absorção/adsorção dos metais por células (WILDE et al., 2006).

Muitos dos metais traço são essenciais aos organismos, sem os quais haverá deficiência, mas acima de determinada concentração, haverá toxicidade. Para esses metais, os organismos exibem um estreito limite de tolerância (KAPLAN et al., 1988; LOMBARDI et al., 2002; SUEUR et al., 1982).

Estudar a interação entre metais traço e partículas naturais como microalgas, bactérias, fungos e seus produtos de excreção, além de macromoléculas orgânicas é indispensável para o conhecimento da biodisponibilidade destes elementos em rios, lagos e oceanos (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995; SANTANA-CASIANO et al., 1995). Knauer et al. (1997) e Lorenzo et al. (2007), destacam a importância da MOD excretada pelo fitoplâncton para diminuição do metal biodisponível no ambiente aquático. A disponibilidade, assim como os efeitos tóxicos dos metais para as microalgas, são dependentes da especiação desses elementos (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995; SANTANA-CASIANO et al., 1995). Segundo Bradac et al. (2009), em ambientes aquáticos os ligantes atropogênicos e naturais formam

complexos lábeis que contribuem para o fluxo de metal para as algas e indiretamente afetam os organismos aquáticos através de transferência trófica.

Células algais possuem superfícies com sítios de coordenação de alta afinidade para ligações reversíveis com metais (BRULAND et al., 1991; MOFFETT et al., 1990). Estas superfícies, predominantemente com cargas negativas, consistem de ligantes provenientes de grupamentos aminos, fosfóricos, sulfidrílicos e carboxílicos (SANTANA-CASIANO et al., 1995; SIGG, 1987). A ligação de íons metálicos na parede celular de microalgas vivas é rápida e o íon metálico é transportado lentamente através da membrana celular até o citoplasma (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995). Entretanto, estas duas reações, de adsorção e transporte do metal através da parede celular, não são os únicos processos que podem ocorrer na presença dos organismos e os excretados algais assumem um importante papel nessa relação (LOMBARDI et al., 2007).

A interação entre metais e excretados de microalgas/cianobactérias contribui para o aprimoramento do estudo do ciclo biogeoquímico dos metais nas águas superficiais (LAMELAS et al., 2009). Na literatura, diversos trabalhos mostram que os efeitos da ligação dos excretados algais com metais são muito mais significativos para especiação do que aqueles ligados apenas à superfície das células algais (GONZALEZ-DAVILA, 1995; MULLER e KESTER, 1991). Segundo estudos realizados por Kozarac et al. (1989) e Zhou e Wangersky (1985) as mudanças na qualidade e quantidade da MOD presente em ambientes aquáticos, deve-se à liberação de excretados durante o crescimento algal. Xue e Sigg (1990) determinaram que excretados têm efeito significativamente maior na especiação do cobre do que a ligação com as células algais.

Os excretados algais são constituídos por compostos de natureza biológica, como carboidratos, proteínas e lipídios (LENOBLE et al., 2008). É bastante conhecido que os carboidratos e proteínas estão envolvidos na regulação, transporte, biodisponibilidade e toxicidade do metal dissolvido em sistemas aquáticos. Há uma extensa quantidade e variedade de ligantes produzidos pelas células de microalgas que geralmente são de pouca especificidade para os metais. No entanto, por similaridade, alguns metais podem substituir um ao outro nos ligantes, competindo por sítios de coordenação nesses materiais biológicos (KNAUER, 1996). Diversas interações de competição entre Cu e Zn (XUE et al., 1995), Cu, Zn e Pb (AL-RUB et al., 2006), Cd, Pb, Zn e Mn (TOPPERWIEN et al.,

2007), Cu, Cd e Pb (TIEN, 2002) e entre Cu e Pb (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995; SANTANA-CASIANO et al., 1995) têm sido identificadas nos excretados do fitoplâncton e dependendo da substituição do metal no sítio ativo de coordenação, variam os efeitos ambientais. Em alguns casos, os mesmos metais que competem pelo ligante podem ativar uma função metabólica específica (KNAUER, 1996). Interações sinérgicas e antagônicas são ainda observadas. Al-Rub et al. (2006) detectaram uma elevada capacidade da microalga de água doce *Chlorella vulgaris* em remover cobre de ambientes aquáticos, mas na presença de zinco e chumbo a alga diminuiu sua capacidade de adsorver o metal.

Diante do exposto, a produção de excretados algais pode ser um parâmetro influente em avaliações de toxicidade e gestão de ambientes aquáticos, uma vez que é comum o uso de algas para avaliar a qualidade da água (KOUKAL et al., 2007). Assim como a MOD natural é complexa e formada por uma grande variedade de compostos, os excretados também são constituídos por misturas complexas. Para buscar maior especificidade nas relações com os metais e também na caracterização bioquímica, os excretados da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* foram fracionados e agrupados em compostos com diferentes massas moleculares (> 30 kDa; 30 - 10 kDa; 10 - 3 kDa).

7 OBJETIVOS

Os objetivos gerais desta parte do trabalho consistiram em avaliar a interação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo com a MOD produzida pela cianobactéria tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolada das águas do Reservatório de Barra Bonita (SP) e caracterizar bioquimicamente seus constituintes. Como objetivos específicos pretendeu-se:

- i. Manter *Cylindrospermopsis raciborskii* sob condições controladas em culturas de laboratório para a obtenção e fracionamento de seus excretados em diferentes massas moleculares ($0,65 \mu\text{m} > \text{fração} > 30 \text{ kDa}$; $30 \text{ kDa} > \text{fração} > 10 \text{ kDa}$; $10 \text{ kDa} > \text{fração} > 3 \text{ kDa}$);
- ii. Avaliar a interação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo com a MOD excretada pela cianobactéria através de titulações de capacidade de complexação;
- iii. Quantificar a composição total de carboidratos, proteínas, lipídios e CHNS das frações com diferentes massas moleculares dos excretados da *C. raciborskii*;
- iv. Determinar a composição das proteínas (aminoácidos) e classes de lipídios presentes nas três frações dos excretados da cianobactéria;
- v. Caracterizar a MOD excretada e suas frações de diferentes massas moleculares através de fluorescência de emissão e de excitação sincronizada;
- vi. Verificar a competição entre os metais cobre e zinco, e entre cádmio e chumbo por ligantes nas diferentes frações dos excretados de *C. raciborskii*.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Culturas de *Cylindropermopsis raciborskii* e obtenção dos excretados

Microcystis aeruginosa, *Anabaena spiroides*, *Aulacoseira ambigua*, *Planktothrix tropicalis* e *Cylindropermopsis raciborskii* representam espécies fitoplanctônicas dominantes no Reservatório de Barra Bonita (VIEIRA et al., 2008). Dentre elas, escolheu-se trabalhar com a espécie *Cylindropermopsis raciborskii* por ser potencialmente tóxica, capaz de liberar hepatotoxinas e neurotoxinas (BERGER et al., 2006; BOGIALLI et al., 2006). Duas das toxinas produzidas são a cilindropermopsina, um alcaloide com ação no fígado e rins e a potente toxina paralisante do tipo PSP (*Paralytic Shellfish Poisons*), que age no sistema neuromuscular. As florações e a produção de toxinas comprometem a qualidade da água para abastecimento, além de aumentarem consideravelmente os custos de tratamento (TUCCI e SANTANNA, 2003).

A cepa da espécie estudada foi isolada do Reservatório de Barra Bonita e mantida na coleção de culturas de microalgas de água doce, sob o código BB0048, no laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos (São Paulo, Brasil). Foram realizadas culturas unialgais durante dois anos e meio, com o objetivo de obter excretados algais e a partir deles, avaliar a capacidade de complexação frente aos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo.

Para o cultivo, foram preparados garrafões com 7L de meio ASM-1 (pH 7,8) (GORHAM et al., 1964, modificado por REYNOLDS e JAWORSKI, 1978) que foram autoclavados durante 40 minutos e deixados esfriar por 24 horas. A composição do meio de cultura é apresentada na TABELA 8.1.

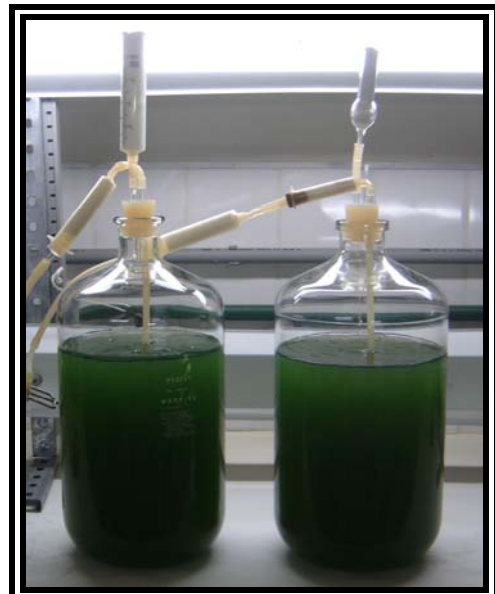
TABELA 8.1 Composição do meio de cultura ASM-1.

Composto	Concentração (mol L ⁻¹)
NaNO ₃	2,0.10 ⁻³
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0.10 ⁻⁴
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,8.10 ⁻⁴
CaCl ₂	2,6.10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	1,0.10 ⁻⁴
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	6,4.10 ⁻⁵
H ₃ BO ₃	4,0.10 ⁻⁵
MnCl ₂ .4H ₂ O	7,0.10 ⁻⁶
FeCl ₃ .6H ₂ O	4,0.10 ⁻⁶
ZnCl ₂	2,5.10 ⁻⁶
CoCl ₂ .6H ₂ O	8,0.10 ⁻⁸
CuCl ₂ .2H ₂ O	8,2.10 ⁻⁹
EDTANa ₂	2,2.10 ⁻⁵

Os garrafões foram inoculados com culturas de *Cylindrospermopsis raciborskii* em fase exponencial de crescimento e mantidos em condições controladas de intensidade luminosa (41,52 mol m⁻² s⁻¹), temperatura (23 ± 1 °C) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro). Toda a manipulação laboratorial foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal (VLFS-12, VECO) para restringir qualquer contaminação microbiana. Para garantir aeração suficiente, as culturas eram cuidadosamente agitadas uma vez ao dia e mantidas sob aeração constante através de aerador artificial. A FIGURA 8.1 mostra duas culturas do tipo “batch”.



(A)



(B)

FIGURA 8.1 Culturas tipo “batch” de *Cylindrospermopsis raciborskii* (A) 3º dia de cultura (B) 37º dia de cultura.

A FIGURA 8.1A representa o 3º dia de cultivo e a FIGURA 8.1B o 37º e último dia de cultivo. Para obter curvas de crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii* em cultura, a cada 2-3 dias uma alíquota da cultura era retirada para determinação da concentração de clorofila-a. As concentrações de clorofila-a, COD e CI nas amostras retiradas das culturas de *C. raciborskii* foram determinadas como descrito na seção 3.6. A FIGURA 8.2 mostra a curva de crescimento de *C. raciborskii* através das concentrações de clorofila-a, COD e CI em função do tempo.

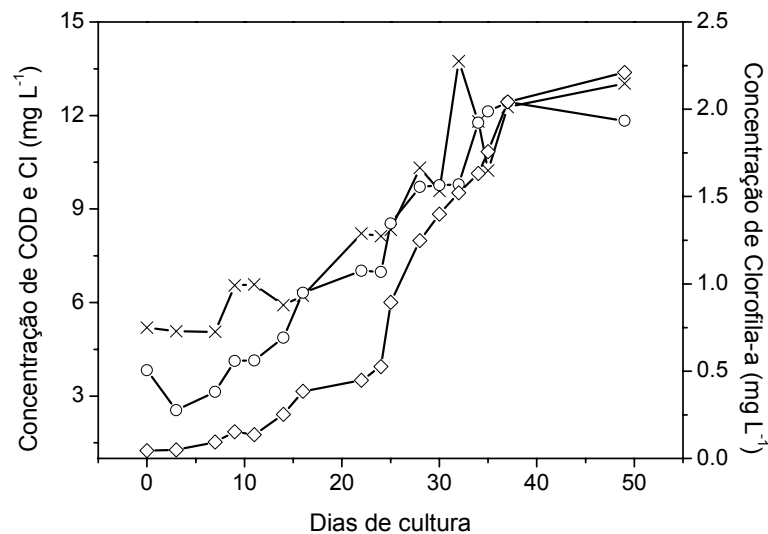


FIGURA 8.2 Curva de crescimento de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Concentrações de (×) COD (○) CI e (◇) clorofila-a em função dos dias de cultura.

Como mostra a FIGURA 8.2, entre 35-37 dias a cultura encontra-se no final da fase exponencial e início da fase estacionária. Ao atingirem o final da fase exponencial de crescimento, as células foram separadas do meio de cultura por filtração tangencial (GE Watson Marlow 313) em cartuchos de fibra oca (A/G Technology Corporation) com poros de 0,65 µm. As células foram descartadas e o meio de cultura foi fracionado através da filtração em cartuchos de 30 kDa, 10 kDa e 3 kDa (A/G Technology Corporation) para a obtenção dos excretados com diferentes massas moleculares. A FIGURA 8.3 mostra o procedimento adotado para filtração das culturas de *C. raciborskii*.

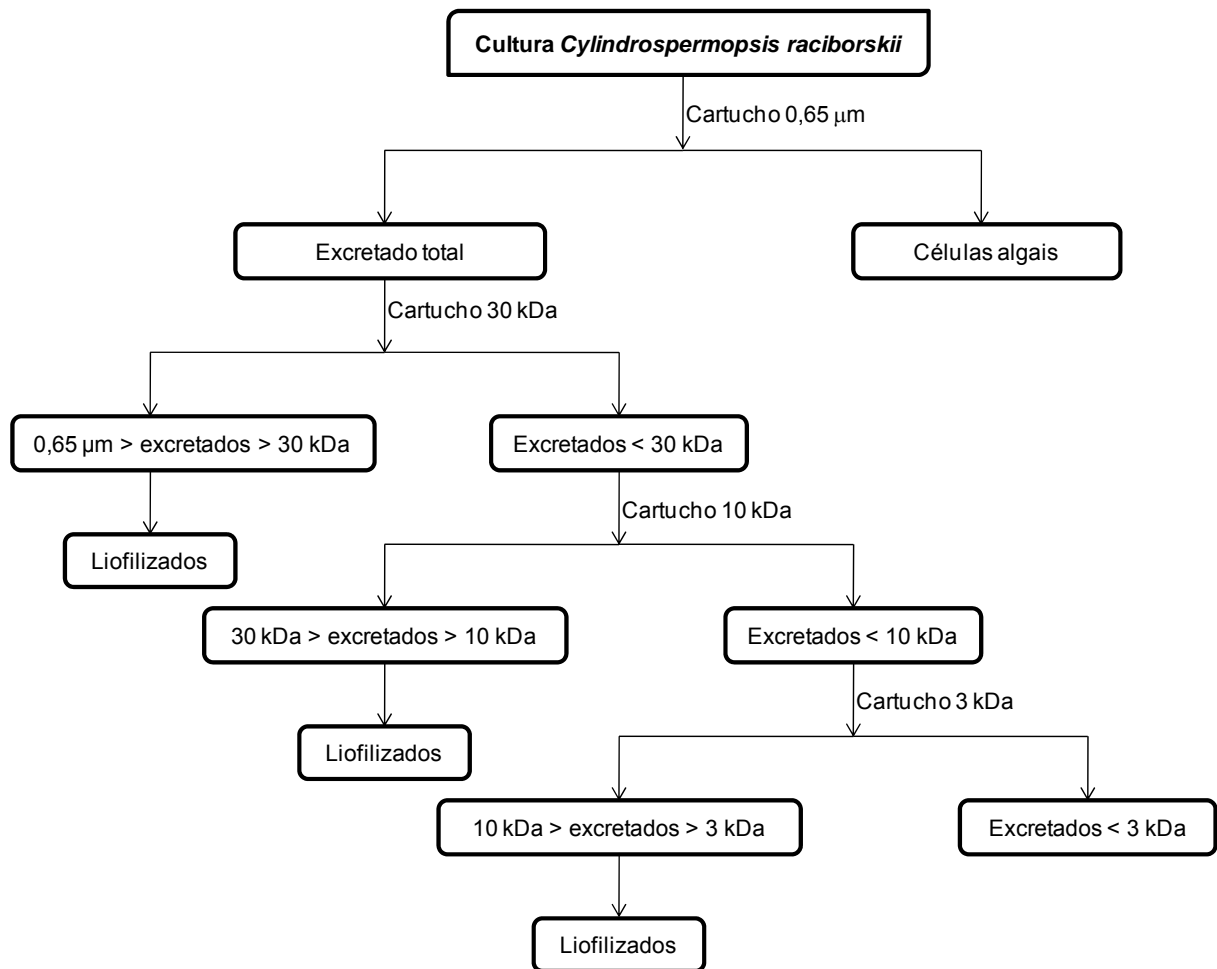


FIGURA 8.3 Fluxograma do procedimento adotado para filtração das culturas de *Cylandrospermopsis raciborskii* em diferentes massas moleculares.

A cada término da filtração nos diferentes cartuchos, o material filtrado (excretados em diferentes massas moleculares) era liofilizado (Heto Drywinner, UK) e mantido no congelador até o momento da análise.

8.2 Proporção dos elementos C, H, N e S

As proporções dos elementos C, H, N e S foram obtidas com um analisador elementar EA 1110 CHNS (CE Instruments, ThermoQuest, Rodano, Milan, Italy). Amostras de 3 a 5 mg do material excretado fracionado em diferentes massas moleculares e liofilizado foram pesados em cadinhos de estanho (ThermoQuest, Rodano, Milan, Italy) em balança de precisão (AT21 Comparator balance, Mettler Toledo, Laboratory & Weighing Technologies). Os cadinhos foram colocados no auto-amostrador do aparelho, que os injetou em um forno, onde a análise foi feita após o processo de combustão. A determinação das proporções foi obtida através de calibração com os padrões cistina, metionina e sulfanilamida e BBOT (ThermoQuest, Rodano, Milan, Italy).

8.3 Composição bioquímica: carboidratos, proteínas e lipídios

Nos excretados fracionados nas diferentes massas moleculares foram determinadas as concentrações totais de carboidratos, proteínas e lipídios. O conteúdo de carboidrato foi determinado através do método de Dubois et al. (1956) com glicose como padrão, utilizando espectrofotometria (Pharmacia Biotech Novaspec II). A quantificação e classificação dos aminoácidos foram realizadas utilizando CG-FID (Varian CP-3800, Walnut Creek, CA, USA) e lipídios utilizando TLC-FID (Chromarod- Iatroscan, MK III, Iatron Laboratories, Tokyo) (PARRISH, 1999).

8.4 Espectroscopia de fluorescência

As diferentes frações dos excretados foram avaliadas quanto à fluorescência de emissão e sincronizada. Soluções com concentrações conhecidas desse material foram analisadas em espectrofluorímetro (FP 6500 Jasco, Tokyo, Japão) como descrito na seção 3.5.

8.5 Carbono total: carbono orgânico e inorgânico

As concentrações de CT (COD + CI) nas diferentes frações dos excretados algais foram determinadas como descrito na seção 3.6.

8.6 Determinação da capacidade de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nos excretados de *Cylindrospermopsis raciborskii*

Para determinar a capacidade de complexação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo, 100 a 150 mg L⁻¹ dos excretados previamente fracionados e liofilizados foram diluídos até 10 mL e titulados em pH natural utilizando-se DPASV, e 0,01 mol L⁻¹ de KNO₃ (Merck) como eletrólito de suporte e ajuste da força iônica. A concentração citada é estatisticamente similar as concentrações de MOD determinadas nas amostras de água de Barra Bonita, de onde as algas foram isoladas. Os parâmetros utilizados no polarógrafo para a titulação da capacidade de complexação dos metais nos excretados são os mesmos citados anteriormente para as amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (seção 3.3.1). As titulações foram realizadas utilizando padrões de cobre, zinco, cádmio e chumbo contendo 78,7 µmol L⁻¹, 152,7 µmol L⁻¹, 133,4 µmol L⁻¹ e 72,4 µmol L⁻¹, respectivamente e as

adições variavam desde 5 μL até 200 μL , dependendo do metal. Quando realizada a adição de padrão na amostra, esta permaneceu em equilíbrio durante 20 minutos para que se completasse a complexação dos ligantes disponíveis nos excretados ao metal adicionado (CAPODAGLIO et al., 2002 *apud* MYLON et al., 2003). As características de complexação dos metais foram obtidas através da aplicação do Método de Linearização de Ruzic (RUZIC, 1982). O procedimento detalhado está descrito na seção 3.3.1.

8.7 Titulação de competição entre os metais cobre e zinco, e cádmio e chumbo nos excretados das cianobactérias

A titulação de competição entre os metais cobre/zinco e cádmio/chumbo por ligantes disponíveis nos excretados da cianobactéria foi realizada da mesma maneira e utilizando os mesmos parâmetros que aqueles descritos para as titulações de competição entre os metais cobre e zinco por ligantes disponíveis nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (seção 3.4).

A partir das concentrações de ligantes disponíveis (C_L), obtidos separadamente nas titulações dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo nos excretados da cianobactéria, obteve-se os valores correspondentes à concentração dos metais que foram adicionados antes da titulação (XUE et al., 1995). A partir destes valores, realizaram-se as titulações de competição. Os parâmetros de complexação foram obtidos a partir da Linearização de Ruzic (RUZIC, 1982), procedimento detalhado na seção 3.3.1.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Caracterização e capacidade de complexação dos excretados de *Cylindrospermopsis raciborskii* frente aos metais Cu, Zn, Cd e Pb, considerando diferentes frações moleculares

O excretado total produzido por *Cylindrospermopsis raciborskii* foi fracionado em três massas moleculares distintas (> 30 kDa, 30-10 kDa, 10-3 kDa), nas quais foram determinadas as concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) e composição elementar (C, H, N, S). Estes resultados são mostrados na TABELA 9.1.

TABELA 9.1 Proporção dos elementos C, H, N e S. Média \pm desvio padrão (n = 3). (– não detectado).

Fração (kDa)	COD mg g ⁻¹ excretado	% C	% H	% N	% S
>30	41,9 \pm 0,48	18,9 \pm 0,75	3,80 \pm 0,19	9,60 \pm 0,15	-
30-10	28,7 \pm 1,09	12,3 \pm 0,11	2,82 \pm 0,19	10,3 \pm 0,13	-
10-3	29,9 \pm 0,58	10,2 \pm 0,15	2,31 \pm 0,20	9,42 \pm 0,20	-

A concentração de COD na fração >30 kDa foi expressivamente maior que aquelas encontradas nas frações entre 30-10 kDa e 10-3 kDa (ANOVA, $P < 0,0001$). A composição elementar foi significativamente diferente entre as frações, tanto para % de carbono (C) (ANOVA, $P < 0,0001$), quanto para % de hidrogênio (H) (ANOVA, $P = 0,0002$), sendo a menor diferença obtida para o nitrogênio (N), apesar destas concentrações serem também consideradas estatisticamente diferentes (ANOVA, $P = 0,0013$).

Os resultados da composição bioquímica foram significativamente diferentes entre as frações (ANOVA, $P < 0,0010$) (FIGURA 9.1).

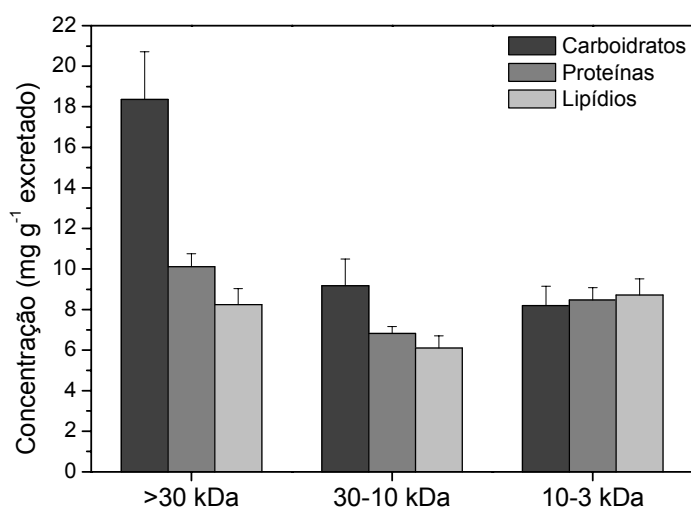


FIGURA 9.1 Concentração total de carboidratos (cinza escuro), proteínas (cinza médio) e lipídios (cinza claro) presentes nas diferentes frações moleculares dos excretados da cianobactéria *C. raciborskii*.

Analisando a contribuição da composição bioquímica em relação ao carbono orgânico dissolvido (COD) (TABELA 9.1), observa-se que na fração >30 kDa (FIGURA 9.1) predominam altas concentrações de carboidratos (44%) em relação às proteínas (24%) e lipídios (20%) (ANOVA, $P = 0,0004$). Considerando a fração com massa molecular entre 30-10 kDa, carboidratos (32%) estiveram presentes em concentrações mais altas (ANOVA, $P = 0,0116$) do que proteínas (24%) e lipídios (21%), cujas concentrações foram similares (ANOVA, $P > 0,05$). A composição bioquímica relativa na fração entre 10-3 kDa apresentou-se sem variação quantitativa, ou seja, a concentração de proteínas (28%) foi similar à de carboidratos (28%) que por sua vez foi similar à de lipídios (29%) (ANOVA, $P = 0,7344$).

Embora sejam poucos os estudos sobre a composição bioquímica dos excretados algais, tem sido mostrado que os carboidratos, ácidos orgânicos e os aminoácidos são seus principais constituintes (BRIDGE et al., 1999; LENOBLE et al., 2008). Koukal et al. (2007) quantificou altas concentrações de carboidratos (30% do COD) e baixas concentrações de proteínas (5% do COD) nos excretados da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. De modo geral, excretados e células fitoplanctônicas contêm diferentes grupos carboxílicos, aminídicos, fosfatos e sulfidrílicos, dentre outros. Tais grupos são provenientes dos carboidratos, proteínas e, em menor proporção, lipídios, que atuam como ligantes na complexação com metais e diferem em afinidade e especificidade (KOUKAL et al., 2007; LORENZO et al., 2007; TIEN, 2002).

A seguir são apresentados os aminoácidos livres (TABELA 9.2) detectados nas três frações dos excretados da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*.

TABELA 9.2 Aminoácidos livres presentes nas diferentes frações dos excretados da cianobactéria *C. raciborskii*. (– não detectado).

Aminoácidos	0,65µm > fração > 30 kDa	30 kDa > fração > 10 kDa µg g ⁻¹ excretado	10 kDa > fração > 3 kDa
Ácido α-aminoadípico - AAA	33,58	86,58	3,355
Ácido α-aminobutírico - ABA	-	-	15,02
Ácido α-aminopimelico - APA	-	-	10,03
Alanina - ALA	523,2	1134	29,67
Asparagina - ASN	-	57,69	55,68
Fenilalanina - PHE	-	-	11,17
Glicil-prolina - GPR	1,939	30,07	14,34
Glicina - GLY	33,81	46,22	41,79
Hidroxilisina - HLY	14,54	23,41	38,23
Histidina - HIS	20,09	-	-
Isoleucina - ILE	5,909	-	-
Leucina - LEU	12,56	-	23,20
Lisina - LYS	41,16	90,01	35,75
Metionina - MET	-	0,652	1,553
Prolina - PRO	38,25	67,37	51,51
Prolina-hidroxiprolina - PHP	8,993	11,96	43,93
Tirosina - TYR	38,77	18,99	74,47
Triptofano - TRP	-	-	2,126
Valina - VAL	181,4	606,7	202,3

A caracterização por fluorescência nos modos emissão e excitação sincronizada nas diferentes frações dos excretados é mostrada na FIGURA 9.2.

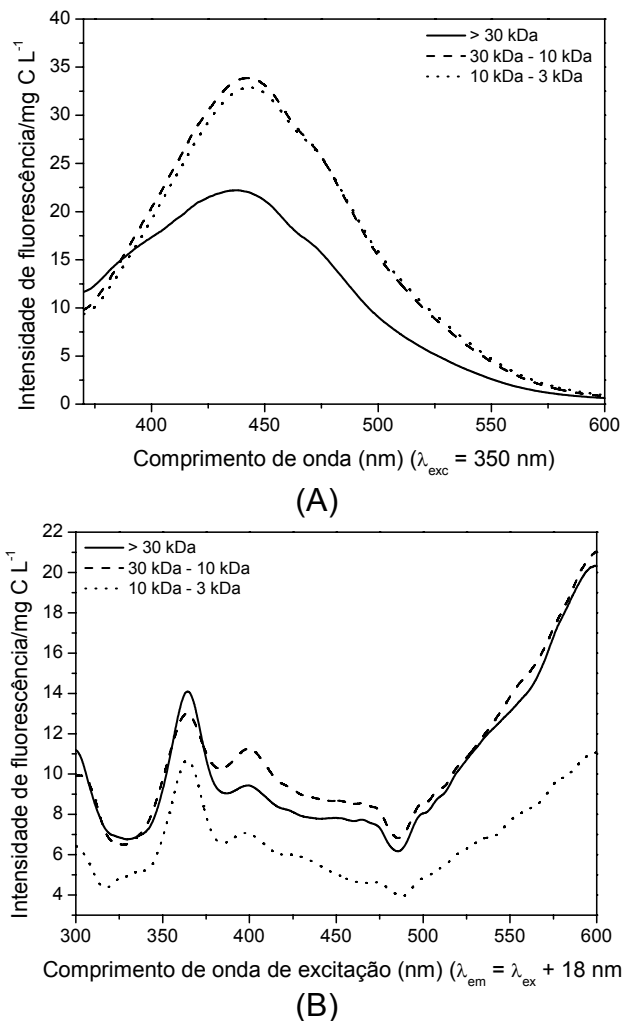


FIGURA 9.2 Espectros de fluorescência nos modos (A) emissão e (B) excitação sincronizada obtidos para as diferentes frações dos excretados de *C. raciborskii*.

Os espectros de emissão das três frações de excretados (FIGURA 9.2A) apresentaram a mesma forma, com um pico de base larga e máximo de emissão próximo de $441,3 \pm 2,5$ nm com excitação fixa em 350 nm (ANOVA, $P > 0,05$), mas com diferentes intensidades de fluorescência (ANOVA, $P < 0,0001$). A fração >30 kDa apresentou menor intensidade de fluorescência por unidade de carbono orgânico, indicando que esta fração apresenta estrutura orgânica com menor quantidade de anéis aromáticos condensados na sua composição (AZEVEDO e NOZAKI, 2008) em relação às outras duas frações.

Os espectros de fluorescência de excitação sincronizada (FIGURA 9.2B) mostraram picos acentuados similares definidos em $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 346/364 (ANOVA, $P = 0,7118$), indicando que é formado por anéis aromáticos com estruturas mais simples na sua composição (PEURAVUORI et al., 2002). Dados da literatura mostram que o pico entre $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 277-340/307-370 nm, é característico de materiais proteínicos

e produtos recém formados pelo fitoplâncton (COBLE et al., 1998; DEL CASTILLO, 1999; DEL CASTILLO et al., 2000). Para Ferrari e Mingazinni (1995) picos em $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 285-345/310-370 nm estão relacionados a dois anéis aromáticos e para Peuravuori et al. (2002) picos em $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 322-352/340-370 são característicos de estruturas que contém 3 ou 4 anéis aromáticos. Dentre os aminoácidos (tirosina, triptofano e fenilalanina) e lipídios (fosfolipídios, lipofuscinas e ceroides) fluorescentes, o pico em $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 346/364 nm na fração entre 10-3 kDa (TABELA 9.2) indica a presença de triptofano (LAKOWICZ, 1983). Nas três frações, picos similares em $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ $380,7/398,7 \pm 0,6$ nm (ANOVA, $P = 0,0787$) caracterizam materiais associados à produção fitoplanctônica (COBLE et al., 1998; STEDMON et al., 2003) e formados por estruturas com 5 anéis aromáticos (FIGURA 9.2B) (LOMBARDI e JARDIM, 1999; PEURAVUORI et al., 2002).

Em relação à capacidade de associação com íons metálicos, os excretados de diferentes espécies de microalgas apresentam comportamentos distintos. Segundo resultados da literatura, a CC varia conforme a espécie de microalga, fase de crescimento, luminosidade, concentração de nutrientes e o metal que será complexado (TIEN, 2002; KAPLAN et al., 1988; LORENZO et al., 2007).

Neste estudo, titulações dos excretados da cianobactéria resultaram em diferentes afinidades quanto à complexação com os diferentes metais (cobre, zinco, cádmio e chumbo) (FIGURA 9.3).

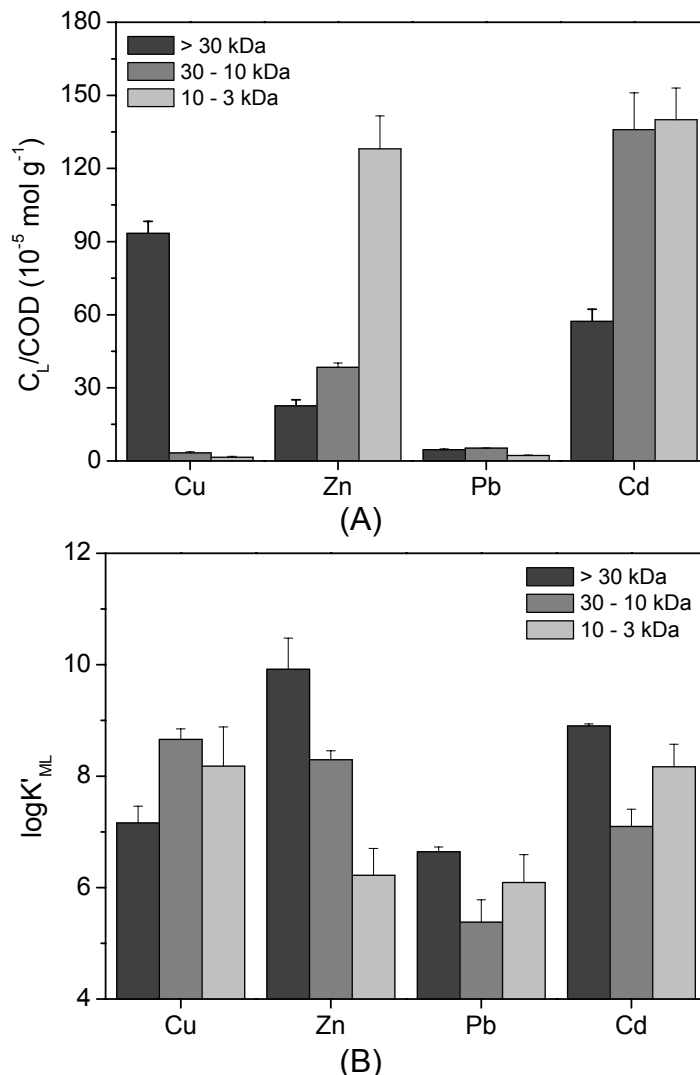


FIGURA 9.3 Capacidade de complexação, C_L (A) e $\log K'_{ML}$ (B) dos excretados da cianobactéria: fração > 30 kDa (cinza escuro); fração entre 30 kDa - 10 kDa (cinza médio); fração entre 10 kDa - 3 kDa (cinza claro) frente aos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo.

Diferenças significativas nas concentrações de ligantes disponíveis (C_L) para os metais, quer entre as frações (ANOVA, $P < 0,0001$), quer entre os metais (ANOVA, $P < 0,0002$) (FIGURA 9.3A) indicam que a interação metal-excretado é específica. Observa-se que na fração >30 kDa, as maiores C_L foram para cobre (ANOVA, $P < 0,0001$) (FIGURA 9.3A), entretanto zinco complexou-se mais fortemente, ou seja, apresentou maior $\log K'_{ML}$ (ANOVA, $P < 0,0001$) (FIGURA 9.3B). Além da concentração de carboidratos predominantes nesta fração (FIGURA 9.1), altas C_L são suportadas pelos aminoácidos alanina, valina, glicina, histidina e leucina (TABELA 9.2) presentes na fração proteica, conferindo alta concentração de ligantes disponíveis para complexar os metais (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995), principalmente, o cobre (ALLEN e HANSEN, 1996; HUMBLE et al., 1997). Diversos autores mostram que não somente aminoácidos, mas também os carboidratos, que estão presentes nessa fração, podem estar relacionados à complexação do cobre

(GOUVÊA et al., 2005; KAPLAN et al., 1988). Resultados similares aos obtidos neste estudo foram obtidos por Muller e Kester (1991). Os autores avaliaram que zinco estava uma ou duas ordens de magnitude mais fortemente complexado a excretados algais de alta massa molecular presentes na Baía Narragansett do que os outros metais analisados.

Na fração entre 30-10 kDa, observa-se maior C_L para cádmio (ANOVA, $P < 0,0001$) (FIGURA 9.3A), e maiores $\log K'_{ML}$ para cobre e zinco (ANOVA, $P < 0,0001$) (FIGURA 9.3B). Além dos carboidratos como importante fonte de ligantes nesta fração, deve-se considerar a presença de aminoácidos. Valina e alanina estavam presentes de 2 a 38 vezes mais concentrados nesta fração do que nas outras, além de glicina e tirosina (TABELA 9.2), que também favorecem a complexação de metais (ALLEN e HANSEN, 1996; GONZALEZ-DAVILA et al., 1995).

Altas concentrações de carboidratos (TOWN e FILELLA, 2000) (FIGURA 9.1) e do aminoácido valina e menores proporções de glicina, tirosina, alanina, leucina, fenilalanina e triptofano (TABELA 9.2), conferiram à fração de baixa massa molecular (entre 10-3 kDa) altas C_L para cádmio e zinco (ANOVA, $P < 0,0001$) (FIGURA 9.3A) e valores mais elevados de $\log K'_{ML}$ para cobre e cádmio (ANOVA, $P = 0,0014$) (FIGURA 9.3B) em relação aos outros metais (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995; HUMBLE et al., 1997). Segundo Humble et al. (1997) a força da ligação metal-ligante nessa fração de baixa massa molecular (10-3 kDa), é justificada pela presença de aminoácidos que complexam o cobre mais fortemente em relação aos outros metais. Além disso, mostra-se que a elevada C_L para cádmio nas frações entre 30-10 kDa e 10-3 kDa (ANOVA, $P = 0,0002$) ocorra, principalmente, pelas diferenças estruturais dos ligantes presentes na fração polissacarídica, além de grupos aminos e sulfidrílicos existentes nas demais frações, conferindo maior quantidade de sítios de coordenação disponíveis para complexar o referido metal (TOPPERWIEN et al., 2007).

Vários trabalhos mostram que diversas espécies de microalgas excretam produtos complexantes de metais. Excretados da microalga *Dunaliella tertiolecta* complexam chumbo (C_L : 158 nmol L⁻¹, $\log K'_{PbL}$: 8,4) e cobre (C_L : 255 nmol L⁻¹, $\log K'_{CuL}$: 9,3) (GONZALEZ-DAVILA et al., 1995; SANTANA-CASIANO et al., 1995). Sueur et al. (1982) avaliaram a CC dos excretados em três diferentes espécies algais frente ao cobre, *Ectocarpus siliculosus* (C_L : 1,0 μmol L⁻¹, $\log K'_{CuL}$: 10,1), *Audouinella purpurea* (C_L : 0,3 μmol L⁻¹, $\log K'_{CuL}$: 9,9) e *Antithamnion spirographidis*

(C_L : $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\log K'_{CuL}$: 9,8). Tien (2002) avaliou a CC de quatro espécies de microalgas: *Oscillatoria limnetica*, *Anabaena spiroides*, *Eudorina elegans* e *Chlorella vulgaris*, todas de águas naturais, frente aos metais cobre, chumbo e cádmio. O autor concluiu que as quatro espécies têm elevada capacidade de complexar metais, principalmente o chumbo, sugerindo que estas possam ser utilizadas em tratamentos de efluentes industriais que contenham altas concentrações destes três metais.

Sabe-se que a complexação de metais por carboidratos de microalgas/cianobactérias ocorre através de interações com cargas negativas presentes nas macromoléculas (MANZINI et al., 1984). Sulfatos e grupos carboxílicos de monossacarídeos ácidos, como por exemplo, os ácidos urônicos, são sugeridos como ligantes de complexação de metais nos polissacarídeos (KAPLAN et al., 1987, 1988). A maioria dos aminoácidos pode complexar M^{2+} através dos grupos α -amino ou α -carboxilatos e seu $\log K'_{ML}$ é similar ao da glicina ($\log K'_{CuL} \approx 8,1$) porque sua cadeia não é envolvida no processo metal-ligante (LORENZO et al., 2007). Kaplan et al. (1987, 1988) avaliaram a interação de cobre, zinco, cádmio e chumbo com excretados da microalga *Chlorella stigmatophora* em função de diferentes concentrações de carboidratos. Os autores concluíram que o metal complexado foi diretamente proporcional à concentração de polissacarídeos em solução e que a complexação se deve à presença de sulfatos e, principalmente, ácidos urônicos nas macromoléculas. Além disso, dados da literatura mostram que proteínas (aminoácidos) e lipídios também conferem ligantes disponíveis à complexação com metais (HUMBLE et al., 1997; SANTANA-CASIANO et al., 1995).

Os resultados da composição lipídica dos excretados de *C. raciborskii* são mostrados na TABELA 9.3 a seguir.

TABELA 9.3 Classes lipídicas quantificadas nas diferentes frações dos excretados da cianobactéria *C. raciborskii*. (– não detectado).

Lipídios	0,65µm > fração > 30 kDa	30 kDa > fração > 10 kDa mg g ⁻¹ excretado	10 kDa > fração > 3 kDa
Ácidos graxos livres	0,72	-	0,14
Álcoois	0,11	-	-
Diacilgliceróis	-	-	-
Estéris ésteres	-	-	-
Esteróis	-	-	0,08
Etil cetonas	-	-	-
Etil ésteres	-	-	-
Fosfolipídios	0,21	0,03	0,81
Glicerol éteres	0,39	0,03	0,60
Hidrocarbonetos	1,58	0,23	2,14
Lipídios polares (acetona)	0,27	0,06	0,13
Metil cetonas	-	0,04	0,18
Metil ésteres	-	-	-
Triacilgliceróis	4,95	0,36	4,63

Dentre as classes lipídicas quantificadas nas três frações (TABELA 9.3), predominaram as concentrações de hidrocarbonetos e triacilgliceróis, além dos ácidos graxos livres na fração >30 kDa e fosfolipídios e glicerol éteres na fração entre 10-3 kDa.

A importância de estudos de complexação de metais com ligantes naturais relaciona-se diretamente à interação dos complexos com a biota aquática. Tem-se, por exemplo, que moléculas de natureza lipídica ou mesmo resíduos lipídicos, ao formar complexos com o cobre, torna-os de maior biodisponibilidade do que íons Cu²⁺ devido à facilidade de penetração em membranas lipoproteicas (FLORENCE et al., 1992). Batley et al. (2004) determinaram que o cádmio adsorvido por *Daphnia magna* aumentou 50% na presença de dietilditiocarbamato (DDC), formando complexos lipídicos que levaram ao aumento da interação do metal com o animal, aumentando a toxicidade do elemento. De acordo com Phinney e Bruland (1994) complexos de cobre, cádmio e chumbo com DDC e oxima foram bioacumulados mais rapidamente que espécies inorgânicas por microalgas costeiras. Segundo Florence e Stauber (1986) nem excretados algais e nem hidróxidos metálicos foram capazes de diminuir a toxicidade dos complexos lipo-solúveis de cobre, altamente tóxicos para organismos marinhos.

9.2 Competição entre os metais cobre e zinco, e cádmio e chumbo nos excretados de *Cylindrospermopsis raciborskii*

O estudo da competição entre os metais cobre e zinco, e cádmio e chumbo pelos ligantes nas três frações moleculares do excretado de *C. raciborskii*, teve como base os valores de C_L de cada metal, garantindo assim que todos os ligantes disponíveis fossem previamente saturados pelo metal adicionado. À medida que as frações foram tituladas separadamente com os quatro metais (Cu/Zn e Cd/Pb), não houve variação significativa nas correntes dos metais adicionados no dia anterior à titulação. Este resultado indica que os metais titulantes não competem pelos ligantes inicialmente complexados ao metal previamente adicionado. Comportamento similar foi obtido nos experimentos de competição entre cobre e zinco na água do Reservatório de Barra Bonita (FIGURA 4.15).

Apesar de aparentemente não haver competição entre os metais pelos ligantes, os valores de C_L e $\log K'_{ML}$ obtidos através da titulação de competição entre os metais Cu/Zn e Cd/Pb apresentaram diferenças significativas, como pode ser visto na FIGURA 9.4.

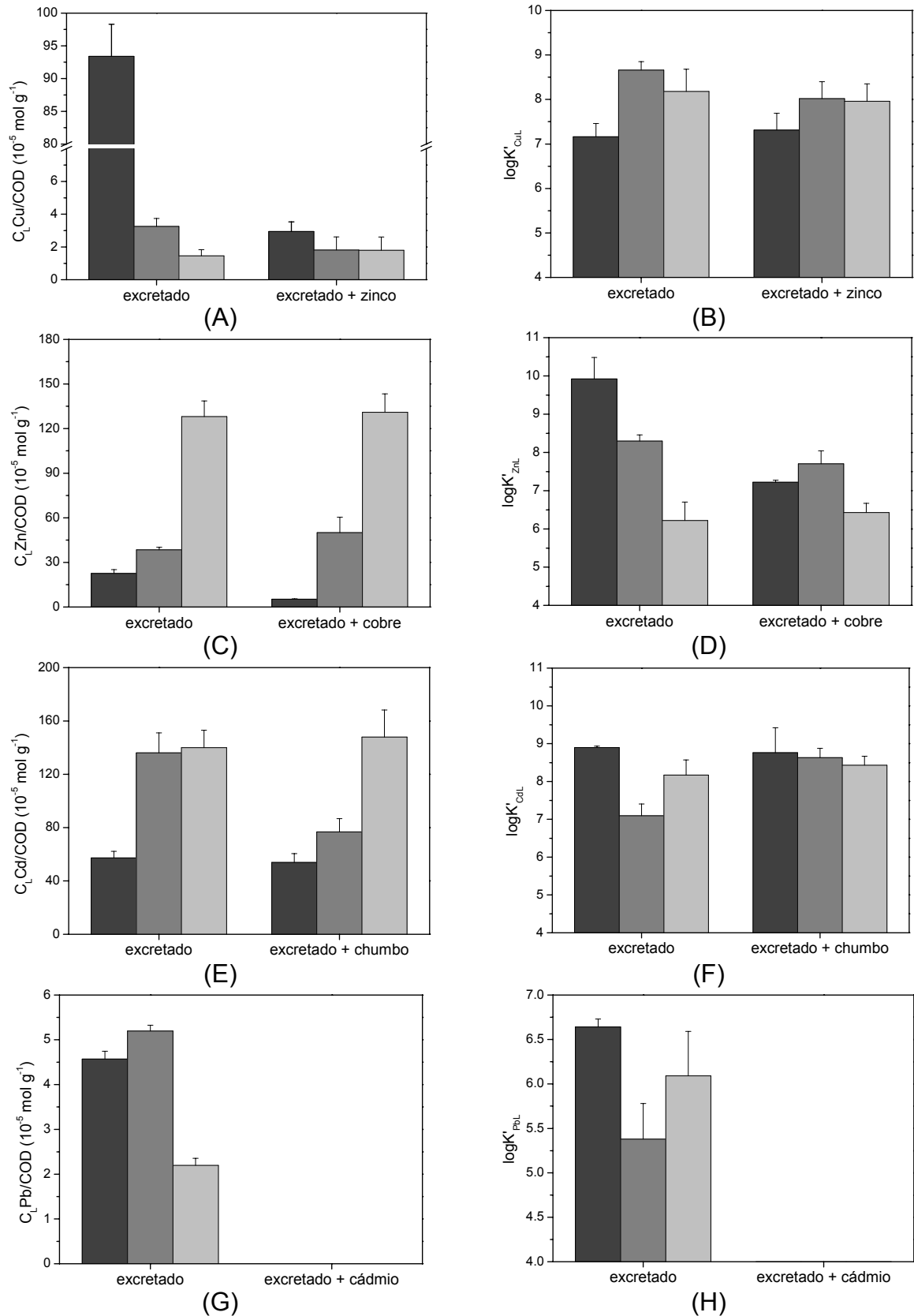


FIGURA 9.4 Capacidade de complexação dos excretados nas frações >30 kDa (cinza escuro), 30-10 kDa (cinza médio) e 10-3 kDa (cinza claro). (A) C_L e (B) $\log K'_{CuL}$ para cobre antes e após adição de zinco; (C) C_L e (D) $\log K'_{ZnL}$ para zinco antes e após adição de cobre; (E) C_L e (F) $\log K'_{CdL}$ para cádmio antes e após adição de chumbo; (G) C_L e (H) $\log K'_{PbL}$ para chumbo antes e após adição de cádmio.

Para a fração >30 kDa, na titulação de competição tendo o cobre como titulante e zinco previamente adicionado (FIGURAS 9.4A e 9.4B), a $C_L\text{Cu}$ foi significativamente menor do que sem a adição de zinco (teste t, $P < 0,0001$). Isso mostra que o zinco previamente adicionado complexa ligantes antes disponíveis ao cobre, no entanto o $\log K'_{\text{CuL}}$ manteve-se constante (teste t, $P = 0,6200$). Nas mesmas condições, não houve diferença significativa quanto aos valores de C_L e $\log K'$ para as frações 30-10 kDa ($C_L\text{Cu}$: teste t, $P = 0,0565$; $\log K'_{\text{CuL}}$: teste t, $P = 0,0595$) e 10-3 kDa ($C_L\text{Cu}$: teste t, $P = 0,5432$; $\log K'_{\text{CuL}}$: teste t, $P = 0,5803$) antes e após a adição de zinco tendo cobre como titulante, indicando especificidade nos ligantes de massas moleculares menores.

Na titulação de competição tendo o zinco como titulante e cobre previamente adicionado (FIGURAS 9.4C e 9.4D), $C_L\text{Zn}$ (teste t, $P = 0,0003$) e $\log K'_{\text{ZnL}}$ (teste t, $P = 0,0011$) foram significativamente menores para a fração >30 kDa do que sem a adição do cobre. Esse resultado indica que o cobre previamente adicionado foi complexado por ligantes fortes, que anteriormente complexavam zinco. Para as frações 30-10 kDa ($C_L\text{Zn}$: teste t, $P = 0,1294$; $\log K'_{\text{ZnL}}$: teste t, $P = 0,0522$) e 10-3 kDa ($C_L\text{Zn}$: teste t, $P = 0,7660$; $\log K'_{\text{ZnL}}$: teste t, $P = 0,5351$) não houve diferença significativa após a adição de cobre e tendo zinco como titulante, indicando especificidade nos ligantes de massas moleculares menores. Esses resultados mostram que o comportamento observado tanto na adição prévia de cobre, quanto na adição prévia de zinco (FIGURA 9.4A, 9.4B, 9.4C e 9.4D) relaciona-se a uma maior afinidade dos ligantes por cobre em comparação ao zinco (XUE et al., 1995).

A titulação de competição na fração entre 30-10 kDa (FIGURAS 9.4E e 9.4F) tendo o cádmio como titulante e chumbo previamente adicionado, indicou que os ligantes, antes disponíveis ao cádmio, complexaram chumbo, pois houve uma diminuição significativa na $C_L\text{Cd}$ (teste t, $P = 0,0048$). No entanto, a força da ligação Cd-ligante ($\log K'_{\text{CdL}}$) aumentou significativamente (teste t, $P = 0,0026$), sugerindo que ligantes mais fracos complexaram chumbo. Nas demais frações não foram observadas diferenças significativas na $C_L\text{Cd}$ (>30 kDa: teste t, $P = 0,5149$; 10-3 kDa: teste t, $P = 0,5950$) e $\log K'_{\text{CdL}}$ (>30 kDa: teste t, $P = 0,7323$; 10-3 kDa: teste t, $P = 0,3890$) antes e após a adição do chumbo, tendo cádmio como titulante.

Nas três frações dos excretados, após a adição prévia de cádmio (FIGURAS 9.4G e 9.4H) e tendo chumbo como titulante, os ligantes não complexaram este metal e conseqüentemente não foi determinado nem $C_L\text{Pb}$, nem $\log K'_{\text{PbL}}$, ou seja,

todos os ligantes disponíveis complexaram cádmio, e todo o chumbo adicionado durante a titulação permaneceu na forma eletroativa, aquela considerada biodisponível para biota aquática.

Muitos trabalhos demonstram a capacidade dos excretados algais em complexar metais (GOUVÊA et al., 2005; KAPLAN et al., 1988; TOPPERWIEN et al., 2007), mas apesar da importância ecológica de estudos de competição de metais por ligantes, a maioria dos trabalhos de complexação encontrados na literatura não enfoca estudos de competição. A competição entre íons metálicos ocorre devido a não especificidade mostrada por diversos ligantes biológicos (SANTANA-CASIANO et al., 1995).

Similar a este trabalho, Topperwien et al. (2007) avaliaram a competição entre cádmio e chumbo por ligantes nos excretados da microalga *Scenedesmus vacuolatus*, mas os autores mostraram que não há competição entre eles. Al-Rub et al. (2006) detectaram que a microalga *Chlorella vulgaris* apresenta elevada capacidade de complexar cobre em águas naturais. Entretanto, na presença de chumbo e zinco, sua capacidade diminui significativamente. Tien (2002) avaliou a competição entre os metais cobre, cádmio e chumbo por sítios de ligação presentes nas superfícies de quatro espécies de microalgas e observou que a competição mostrou-se dependente da espécie e da concentração do íon metálico. Freire-Nordi et al. (2005) avaliaram a competição do cobre, chumbo e mercúrio por ligantes previamente complexados com manganês nos excretados da cianobactéria *Anabaena spiroides*. Dentre os metais, chumbo apresentou maior afinidade com os ligantes disponíveis, e quanto à competição, os autores mostraram que cobre, chumbo e mercúrio deslocam o manganês inicialmente complexado. Gonzalez-Davila et al. (1995) e Santana-Casiano et al. (1995) avaliaram a competição entre cobre e chumbo nos excretados da microalga *Dunaliella tertiolecta* e mostraram que chumbo previamente adicionado não alterou a especiação do cobre, entretanto, como consequência da adição prévia de cobre, a capacidade de complexação do chumbo diminuiu 70%, aumentando a concentração na forma lábil. Desse modo, os autores demonstraram a alta afinidade e preferência dos ligantes por esse metal.

No presente estudo, a competição entre os metais Cu/Zn e Cd/Pb, revelou que a complexação do metal previamente adicionado às frações do excretado da cianobactéria *C. raciborskii*, principalmente na fração >30 kDa, altera a especiação do metal titulado. A interpretação destes resultados mostra a possibilidade de

diversas aplicações dos excretados de microalgas/cianobactérias e sua importância ambiental. Especificidade quanto aos ligantes disponíveis para metais pode ter aplicações médicas e farmacológicas quanto a processos de desintoxicação de metais em organismos vivos. Os excretados algais dão ainda suporte para sistemas de remoção de metais nos tratamentos de água através de sistemas de áreas alagadas, pois suportam toda a comunidade biológica associada, como bactérias.

10 CONCLUSÕES

O excretado fracionado em diferentes massas moleculares de *Cylindrospermopsis raciborskii* possui afinidade e liga-se aos metais cádmio, chumbo, cobre e zinco.

As frações >30 kDa e 30-10 kDa apresentaram altas concentrações de carboidratos em relação a proteínas e lipídios, entretanto na fração 10-3 kDa lipídios, proteínas e carboidratos estiveram presentes em concentrações similares. Concentrações elevadas dos aminoácidos alanina e valina foram identificadas nas frações >30 kDa e 30-10 kDa, enquanto na fração 10-3 kDa destacou-se apenas a valina. Além dos carboidratos e aminoácidos predominantes, atribuí-se à presença de fenilalanina, glicina, histidina, leucina, tirosina e triptofano a elevada concentração de ligantes disponíveis nos excretados. Análise de fluorescência sincronizada nas frações mostrou máximos característicos de materiais proteínicos e produtos recém formados pelo fitoplâncton.

Ampla diversidade de composição química esteve presente nos ligantes dos excretados, uma vez que complexaram-se com afinidades distintas a variadas concentrações de metais. Na fração >30 kDa, as maiores C_L foram para cobre, mas os ligantes complexaram mais fortemente o zinco (maior $\log K'$). Na fração 30-10 kDa, a maior C_L foi para o cádmio, mas as maiores afinidades dos ligantes foram para cobre e zinco (maior $\log K'$). Na fração 10-3 kDa, havia mais ligantes para cádmio e zinco, enquanto que cobre e cádmio apresentaram as maiores forças de ligação.

Os ligantes disponíveis nas diferentes frações moleculares dos excretados da cianobactéria são específicos para os metais, havendo alteração da capacidade de complexação quando a competição de metais foi realizada. Na fração >30 kDa, tendo cobre como titulante e zinco previamente adicionado, os ligantes antes disponíveis ao cobre, complexaram zinco, diminuindo a C_{LCu} . Por outro lado, alta afinidade por cobre foi detectada nos ligantes antes disponíveis ao zinco, diminuindo a C_{LZn} e $\log K'_{ZnL}$. Chumbo previamente adicionado foi complexado por ligantes antes disponíveis ao cádmio na fração 30-10 kDa. Nas três frações não houve capacidade de complexação frente ao chumbo após a prévia adição de cádmio, indicando a alta afinidade dos ligantes pelo cádmio, antes disponíveis ao chumbo.

11 REFERÊNCIAS

ABRIL, G.; FRANKIGNOULLE, M. Nitrogen-alkalinity interactions in the highly polluted Scheldt basin (Belgium). **Water Research**, v. 35, n. 3, p. 844-850, 2001.

ACHTERBERG, E.P. et al. Speciation and cycling of trace metals in Esthwaite Water: a productive English lake with seasonal deep-water anoxia. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 61, n. 24, p. 5233-5253, 1997.

ALLEN, H.E.; HANSEN, D.J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environment Research**, v. 68, n. 1, p. 42-54, 1996.

ALONSO, E. et al. Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadiamar river basin. **Chemosphere**, v. 56, n. 6, p. 561-570, 2004.

AL-RUB, F.A.A. et al. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 457-464, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th. ed. Washington, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th. ed. Washington, 1992.

APTE, S.; ROWLAND, R.; PATNEY, H. Size distribution of copper complexing ligands in tropical freshwaters. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 12, n. 3, p. 79-88, 2000.

ARAÚJO, A.B. et al. Distribuição de metais e caracterização das constantes de troca entre espécies metálicas e frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1103-1107, 2002.

AVDEEF, A.; ZABRONSKY, J.; STUTING, H.H. Calibration of copper-ion selective electrode response to pCu 19. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 298-304, 1983.

AVILA-PEREZ, P. et al. Heavy metal concentrations in water and bottom sediments of a Mexican reservoir. **Science of the Total Environment**, v. 234, n. 1-3, p. 185-196, 1999.

AZEVEDO, J.C.R.; NOZAKI, J. Análise de fluorescência de substâncias húmicas extraídas da água, solo e sedimento da Lagoa dos Patos - MS. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1324-1329, 2008.

BAIRD, C. Química ambiental. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

BAKER, A. et al. Relating dissolved organic matter fluorescence and functional properties. **Chemosphere**, v. 73, n. 11, p. 1765-1772, 2008.

- BAKER, A.; SPENCER, R.G.M. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. **Science of the Total Environment**, v. 333, n. 1-3, p. 217-232, 2004.
- BAKKER, E.; PRETSCH, E. Potentiometric sensors for trace-level analysis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 199-207, 2005.
- BATLEY, G.E.; APTE, S.C.; STAUBER, J.L. Speciation and bioavailability of trace metals in water: progress since 1982. **Australian Journal of Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 903-919, 2004.
- BENOIT, G.; HUNTER, K.S.; ROZAN, T.F. Sources of trace metal contamination artifacts during collection, handling, and analysis of freshwaters. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 1006-1011, 1997.
- BERGER, C. et al. Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in lake guiers (Senegal, West Africa). **Fems Microbiology Ecology**, v. 57, n. 3, p. 355-366, 2006.
- BOGIALLI, S. et al. Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 9, p. 2917-2923, 2006.
- BRADAC, P.; BEHRA, R.; SIGG, L. Accumulation of cadmium in periphyton under various freshwater speciation conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 19, p. 7291-7296, 2009.
- BRIDGE, T.A.M.; WHITE, C.; GADD, G.M. Extracellular metal-binding activity of the sulphate-reducing bacterium *Desulfococcus multivorans*. **Microbiology-Sgm**, v. 145, p. 2987-2995, 1999.
- BROOKS, M.L.; MEYER, J.S.; MCKNIGHT, D.M. Photooxidation of wetland and riverine dissolved organic matter: altered copper complexation and organic composition. **Hydrobiologia**, v. 579, p. 95-113, 2007.
- BRULAND, K.W. et al. Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample. **Analytica Chimica Acta**, v. 405, n. 1-2, p. 99-113, 2000.
- BRULAND, K.W.; DONAT, J.R.; HUTCHINS, D.A. Interactive influences of bioactive trace-metals on biological production in oceanic waters. **Limnology and Oceanography**, v. 36, n. 8, p. 1555-1577, 1991.
- BUFFLE, J. Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach. New York: Ellis Horwood, 1988. 692 p.
- BUFFLE, J.; TERCIER-WAEBER, M.L. Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 172-191, 2005.
- CALIJURI, M.C.; DOS SANTOS, A.C.A. Short-term changes in the Barra Bonita reservoir (São Paulo, Brazil): emphasis on the phytoplankton communities. **Hydrobiologia**, v. 330, n. 3, p. 163-175, 1996.

CALIJURI, M.C.; DOS SANTOS, A.C.A. Temporal variations in phytoplankton primary production in a tropical reservoir (Barra Bonita, SP Brazil). **Hydrobiologia**, v. 445, n. 1-3, p. 11-26, 2001.

CALIJURI, M.C.; DOS SANTOS, A.C.A.; JATI, S. Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, SP-Brazil). **Journal of Plankton Research**, v. 24, n. 7, p. 617-634, 2002.

CAMPOS, M.L.A.M.; BENDO, A.; VIEL, F.C. Low cost methods to purify low grade reagents and to control contamination for trace metal determination in natural waters. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 808-813, 2002.

CAO, Y.; CONKLIN, M.; BETTERTON, E. Competitive complexation of trace-metals with dissolved humic-acid. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 29-32, 1995.

CAPODAGLIO, G. et al. ASV determination of cadmium complexation in seawater: methodology evaluation. **Annali Di Chimica**, v. 92, n. 3, p. 163-176, 2002.

CHAKRABORTY, P.; CHAKRABARTI, C.L. Competition from Cu(II), Zn(II) and Cd(II) in Pb(II) binding to Suwannee river fulvic acid. **Water Air and Soil Pollution**, v. 195, n. 1-4, p. 63-71, 2008.

CHENG, T. et al. Measurement and computation of zinc binding to natural dissolved organic matter in European surface waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 2, p. 230-239, 2005.

CHRISTENSEN, J.B.; BOTMA, J.J.; CHRISTENSEN, T.M. Complexation of Cu and Pb by DOC in polluted groundwater: a comparison of experimental data and predictions by computer speciation models (WHAM and MINTEQA2). **Water Research**, v. 33, n. 15, p. 3231-3238, 1999.

COBLE, P.G.; DEL CASTILLO, C.E.; AVRIL, B. Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. **Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography**, v. 45, n. 10-11, p. 2195-2223, 1998.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente. Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo. São Paulo, 2008. 538 p. (Série Relatórios 2007). Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: novembro 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente. Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo. São Paulo, 2009. 530 p. (Série Relatórios 2008). Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: outubro 2009.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº. 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em:

- <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: junho 2007.
- DA SILVA, I.S. et al. Heavy metal distribution in recent sediments of the Tiete-Pinheiros river system in São Paulo state, Brazil. **Applied Geochemistry**, v. 17, n. 2, p. 105-116, 2002.
- DAVISON, W.; ZHANG, H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**, v. 367, n. 6463, p. 546-548, 1994.
- DE CARVALHO, L.M. et al. Speciation analysis of arsenic compounds by voltammetric and polarographic methods: a comparative review of their main advantages and applications. **Quimica Nova**, v. 27, n. 2, p. 261-269, 2004.
- DEL CASTILLO, C.E. et al. Analysis of the optical properties of the Orinoco river plume by absorption and fluorescence spectroscopy. **Marine Chemistry**, v. 66, n. 1-2, p. 35-51, 1999.
- DEL CASTILLO, C.E. et al. On the dispersal of riverine colored dissolved organic matter over the West Florida Shelf. **Limnology and Oceanography**, v. 45, n. 6, p. 1425-1432, 2000.
- DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J. et al. Phytoplankton taxonomic composition and temporal changes in a tropical reservoir. **Fundamental and Applied Limnology**, v. 171, n. 1, p. 27-38, 2008.
- DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; COLOMBO-CORBI, V.; VIEIRA, A.A.H. Carboidratos dissolvidos do Reservatório de Barra Bonita (Estado de São Paulo, Brasil) e sua relação com as algas fitoplanctônicas abundantes. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 59-66, 2007.
- DONAT, J.R.; LAO, K.A.; BRULAND, K.W. Speciation of dissolved copper and nickel in south San-Francisco Bay - a multimethod approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 284, n. 3, p. 547-571, 1994.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ELCI, S. Effects of thermal stratification and mixing on reservoir water quality. **Limnology**, v. 9, n. 2, p. 135-142, 2008.
- ESTEVEZ, F.A. Fundamentos de limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 602 p.
- FASTNER, J. et al. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 313-321, 2003.
- FERRARI, G.M.; MINGAZZINI, M. Synchronous fluorescence-spectra of dissolved organic-matter (DOM) of algal origin in marine coastal waters. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 125, n. 1-3, p. 305-315, 1995.

- FIORIO, P.R.; DEMATTÊ, J.A.M. Orbital and laboratory spectral data to optimize soil analysis. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 2, p. 250-257, 2009.
- FLORENCE, T.M. Electrochemical approaches to trace-element speciation in waters - a review. **Analyst**, v. 111, n. 5, p. 489-505, 1986.
- FLORENCE, T.M. et al. Toxicity of lipid-soluble copper(II) complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*: amelioration by humic substances. **Water Research**, v. 26, n. 9, p. 1187-1193, 1992.
- FLORENCE, T.M.; BATLEY, G.E. Chemical speciation in natural-waters. **Crc Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 219-296, 1980.
- FLORENCE, T.M.; STAUBER, J.L. Toxicity of copper-complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. **Aquatic Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 11-26, 1986.
- FLORENCE, TM. The speciation of trace elements in waters. **Talanta Review**, v. 29, p. 345-364, 1982.
- FONTENELE, A.P.G.; PEDROTTI, J.J.; FORNARO, A. Evaluation of trace metals and major ions concentrations in rainwater in downtown São Paulo city. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 839-844, 2009.
- FREIRE-NORDI, C.S.; VIEIRA, A.A.H.; NASCIMENTO, O.R. The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2215-2224, 2005.
- GONZALEZ-DAVILA, M. et al. Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n. 2, p. 289-301, 1995.
- GORHAM, P.R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. **International association of theoretical and applied limnology, proceedings**, v. 15, p. 796-804, 1964.
- GOUVÊA, S.P.; VIEIRA, A.A.H.; LOMBARDI, A.T. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. **Chemosphere**, v. 60, n. 9, p. 1332-1339, 2005.
- GUNDERSEN, P.; STEINNES, E. Influence of pH and TOC concentration on Cu, Zn, Cd, and Al speciation in rivers. **Water Research**, v. 37, n. 2, p. 307-318, 2003.
- GUSSO, P.K. Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica dissolvida e sua relação autóctone/alóctone na Baía de Paranaguá. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Departamento de Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- GUTHRIE, J.W. et al. Complexation of Ni, Cu, Zn, and Cd by DOC in some metal-impacted freshwater lakes: a comparison of approaches using electrochemical determination of free-metal-ion and labile complexes and a computer speciation model, WHAM V and VI. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, n. 2, p. 205-218, 2005.

- HAMILTON-TAYLOR, J. et al. Sorption of trace metals (Cu, Pb, Zn) by suspended lake particles in artificial (0.005 M NaNO₃) and natural (Esthwaite Water) freshwaters. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 120, n. 1-3, p. 205-219, 1997.
- HOFFMANN, S.R.; SHAFER, M.M.; ARMSTRONG, D.E. Strong colloidal and dissolved organic ligands binding copper and zinc in rivers. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 6996-7002, 2007.
- HOLM-HANSEN, O.; RIEMANN, B. Chlorophyll a determination: improvements in methodology. **Oikos**, v. 30, n. 3, p. 438-447, 1978.
- HUMBLE, A.V.; GADD, G.M.; CODD, G.A. Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography. **Water Research**, v. 31, n. 7, p. 1679-1686, 1997.
- KAPLAN, D.; CHRISTIAEN, D.; ARAD, S.M. Binding of heavy metals by algal polysaccharides. In: STADLER, T. et al. *Algae biotechnology*. New York: Elsevier Applied Sciences, 1988. p. 179-187.
- KAPLAN, D.; CHRISTIAEN, D.; ARAD, S.M. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 2953-2956, 1987.
- KNAUER, K. et al. Metal and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 2444-2452, 1998.
- KNAUER, K. Interactions of trace metals (Cu, Zn and Mn) with freshwater phytoplankton. 119 p. Dissertation (Doctor of Natural Science) – Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 1996.
- KNAUER, K.; BEHRA, R.; SIGG, L. Effects of free Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 220-229, 1997.
- KOTAS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, v. 107, n. 3, p. 263-283, 2000.
- KOUKAL, B. et al. Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. **Water Research**, v. 41, n. 1, p. 63-70, 2007.
- KOZARAC, Z. et al. Interaction of cadmium and copper with surface-active organic-matter and complexing ligands released by marine-phytoplankton. **Marine Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 313-330, 1989.
- KOZELKA, P.B. et al. Physico-chemical speciation of lead in South San Francisco Bay. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 44, n. 6, p. 649-658, 1997.
- KUBO, T. et al. A new simply and effective fractionation method for cylindrospermopsin analyses. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 104-107, 2005.

- LAKOWICZ, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press, 1983. 496 p.
- LALAH, J.O.; WANDIGA, S.O. Copper binding by dissolved organic matter in freshwaters in Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 633-638, 2007.
- LAMELAS, C.; PINHEIRO, J.P.; SLAVEYKOVA, V.I. Effect of humic acid on Cd(II), Cu(II), and Pb(II) uptake by freshwater algae: kinetic and cell wall speciation considerations. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 730-735, 2009.
- LENOBLE, V. et al. Combination of C-13/Cd-113 NMR, potentiometry, and voltammetry in characterizing the interactions between Cd and two models of the main components of soil organic matter. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, n. 2, p. 749-757, 2008.
- LIU, J.L. et al. Ecological risk of heavy metals in sediments of the Luan river source water. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 6, p. 748-758, 2009.
- LOMBARDI, A.T. et al. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, n. 1, p. 74-78, 2007.
- LOMBARDI, A.T.; JARDIM, W.F. Fluorescence spectroscopy of high performance liquid chromatography fractionated marine and terrestrial organic materials. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 512-520, 1999.
- LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H.; SARTORI, L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 332-337, 2002.
- LOMBARDI, A.T.; WANGERSKY, P.J. Particulate lipid class composition of 3 marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. **Hydrobiologia**, v. 306, n. 1, p. 1-6, 1995.
- LORENZO, J.I. et al. Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Marine Chemistry**, v. 103, n. 1-2, p. 61-75, 2007.
- LOUIS, Y. et al. Speciation of trace metals in natural waters: the influence of an adsorbed layer of natural organic matter (NOM) on voltammetric behaviour of copper. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 1, p. 37-44, 2008.
- MACKERETH, F.J.H.; HERON, J.; TALLING, J.F. *Water analysis: some revised methods for limnologists*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, 36. Kendall: Titus Wilson & Sons Ltda, 1978. 117 p.
- MANZINI, G. et al. Copper(II) binding by natural ionic polysaccharides: potentiometric and spectroscopic data. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 12, n. 5-6, p. 443-454, 1984.

- MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J.G. Plankton richness in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). **Hydrobiologia**, v. 542, p. 367-378, 2005.
- MEYLAN, S.; BEHRA, R.; SIGG, L. Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 22, p. 5204-5212, 2003.
- MEYLAN, S.; BEHRA, R.; SIGG, L. Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: a microcosm study. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 11, p. 3104-3111, 2004.
- MILESI, S.V. et al. Efeito de metais Cobre (Cu) e Zinco (Zn) sobre a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em riachos do Sul do Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, n. 3, p. 283-289, 2008.
- MOELLER, P.D.R. et al. Metal complexes and free radical toxins produced by *Pfiesteria piscicida*. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 4, p. 1166-1172, 2007.
- MOFFETT, J.W.; ZIKA, R.G.; BRAND, L.E. Distribution and potential sources and sinks of copper chelators in the Sargasso sea. **Deep-Sea Research Part A-Oceanographic Research Papers**, v. 37, n. 1, p. 27-36, 1990.
- MONTICELLI, D.; CICERI, E.; DOSSI, C. Optimization and validation of an automated voltammetric stripping technique for ultratrace metal analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, n. 2, p. 192-198, 2007.
- MOPPER, K.; SCHULTZ, C.A. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. **Marine Chemistry**, v. 41, n. 1-3, p. 229-238, 1993.
- MULLER, F.L.L.; GULIN, S.B.; KALVØY, A. Chemical speciation of copper and zinc in surface waters of the western Black Sea. **Marine Chemistry**, v. 76, p. 233-251, 2001.
- MULLER, F.L.L.; KESTER, D.R. Voltammetric determination of the complexation parameters of zinc in marine and estuarine waters. **Marine Chemistry**, v. 33, n. 1-2, p. 71-90, 1991.
- MYLON, S.E. et al. Relating the speciation of Cd, Cu, and Pb in two Connecticut rivers with their uptake in algae. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 1261-1267, 2003.
- NEUBECKER, T.A.; ALLEN, H.E. The measurement of complexation capacity and conditional stability-constants for ligands in natural-waters. **Water Research**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 1983.
- OCHIENG, E.Z.; LALAH, J.O.; WANDIGA, S.O. Water quality and trace metal distribution in a Pristine lake in the lake Basin in Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 4, p. 362-368, 2008.
- OMANOVIC, D. et al. Voltammetric determination of the metal complexing capacity in model solutions. **Marine Chemistry**, v. 53, n. 1-2, p. 121-129, 1996.

- PANHOTA, R.S.; BIANCHINI, I.; VIEIRA, A.A.H. Glucose uptake and extracellular polysaccharides (EPS) produced by bacterioplankton from an eutrophic tropical reservoir (Barra Bonita, SP-Brazil). **Hydrobiologia**, v. 583, p. 223-230, 2007.
- PARLANTI, E. et al. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. **Organic Geochemistry**, v. 31, n. 12, p. 1765-1781, 2000.
- PARRISH, C.C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: ARTS, M.T.; WAINMAN, B.C. *Lipids in freshwater ecosystems*. New York: Springer-Verlag, 1999. p. 4-20.
- PARSONS, T.R.; MAITA, Y.; LALLI, M.C. *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. New York: Pergamon Press, 1984. 173 p.
- PERDUE, E.M.; RITCHIE, J.D. Dissolved organic matter in fresh waters. In: DREVER, J.I. (Ed.). *Treatise on Geochemistry*. Oxford: Elsevier-Pergamon, 2003. v. 5. p. 273-318.
- PESAVENTO, M.; ALBERTI, G.; BIESUZ, R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, n. 2, p. 129-141, 2009.
- PETESSE, M.L.; PETRERE, M.; SPIGOLON, R.J. Adaptation of the reservoir fish assemblage index (RFAI) for assessing the Barra Bonita Reservoir (São Paulo, Brazil). **River Research and Applications**, v. 23, n. 6, p. 595-612, 2007.
- PETTINE, M. et al. Contribution of the Lambro river to the total pollutant transport in the Po watershed (Italy). **Science of the Total Environment**, v. 192, n. 3, p. 275-297, 1996.
- PEURAVUORI, J.; KOIVIKKO, R.; PIHLAJA, K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. **Water Research**, v. 36, n. 18, p. 4552-4562, 2002.
- PHINNEY, J.T.; BRULAND, K.W. Uptake of lipophilic organic Cu, Cd, and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 11, p. 1781-1790, 1994.
- PICKERING, W.F. General strategies for speciation. In: URE, A.M; DAVIDSON, C.M. *Chemical Speciation in the Environment* 2nd. ed. Oxford: Blackwell Science, 2002. p. 9-29.
- PRADO, R.B.; NOVO, E.M.L.M. Assessment of the space-time relationships between the UHE Barra Bonita trophic state and its drainage basin pollution potential. **Sociedade & Natureza**, v. 19, n. 2, p. 5-18, 2007.
- PRADO, R.B.; NOVO, E.M.L.M.; PEREIRA, M.N. Evaluation of land use and land cover dynamics in the hydrographic contribution basin of Barra Bonita Reservoir –SP. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 59, n. 2, p. 127-135, 2007.

- RETAMAL, J.C.; DELGADO, A.; SAAVEDRA, C. Atom-field entanglement at the collapse region. **Physics Letters A**, v. 355, n. 1, p. 7-11, 2006.
- REYNOLDS, C.S.; JAWORSKI, G.H.M. Enumeration of natural microcystis populations. **British Phycological Journal**, v. 13, n. 3, p. 269-277, 1978.
- ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. *Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas*. São Paulo: Editora UNESP, 2003. 120 p.
- RODGHER, S. et al. Change in life cycle parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 8, p. 826-833, 2008.
- ROSA, A.H. et al. Estudo da labilidade de Cu(II), Cd(II), Mn(II) e Ni(II) em substâncias húmicas aquáticas utilizando-se membranas celulósicas organomodificadas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 59-65, 2007.
- ROSINI, F. et al. Resolução CONAMA nº 357 e técnicas espectroanalíticas: meios adequados aos fins? **Revista Analytica**, v. 22, p. 74-85, 2006.
- RUZIC, I. Theoretical aspects of the direct titration of natural-waters and its information yield for trace-metal speciation. **Analytica Chimica Acta**, v. 140, n. 1, p. 99-113, 1982.
- RUZIC, I. Trace metal complexation at heterogeneous binding sites in aquatic systems. **Marine Chemistry**, v. 53, n. 1-2, p. 1-15, 1996.
- SANTANA-CASIANO, J.M. et al. Pb²⁺ interactions with the marine-phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. **Marine Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 115-129, 1995.
- SANTOS, M.A.P.F.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T. The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). **Ecotoxicology**, v. 17, n. 6, p. 449-454, 2008.
- SCHECHER, W.D.; MCAVOY, D.C. MINEQL+: A software environment for chemical equilibrium modeling. **Computers Environment and Urban Systems**, v. 16, n. 1, p. 65-76, 1992.
- SCHEFFER, E.W.; SODRÉ, F.F.; GRASSI, M.T. Factors governing copper speciation in urban freshwaters: evidences on the contribution of soluble sulfides. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 332-338, 2007.
- SCHEFFER, E.W.O. Dinâmica e comportamento do cobre em ambientes aquáticos urbanos: influência de fatores geoquímicos e de sulfetos solúveis. 108 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- SIERRA, M.M.D.; DONARD, O.F.X.; LAMOTTE, M. Spectral identification and behaviour of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processes. **Marine Chemistry**, v. 58, n. 1-2, p. 51-58, 1997.

- SIGEE, D.C. *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. England: John Wiley & Sons, 2005. 537 p.
- SIGG, L. et al. Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 6, p. 1934-1941, 2006.
- SIGG, L. Partitioning of metals to suspended particles. In: ALLEN, H.E.; GARRISON, A.W.; LUTHER III, G.W. *Metals in surface waters*. Chelsea: Ann Arbor Press, 1998. p. 221-239.
- SIGG, L. Surface chemical aspects of the distribution and fate of metal ions in lakes. In: STUMM, W. *Aquatic Surface Chemistry*. New York: Wiley, 1987. p. 331-350.
- SKOOG, D.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
- SODRÉ, F.F. et al. Identification of copper sources in urban surface waters using the principal component analysis based on aquatic parameters. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 7, n. 6, p. 581-585, 2005.
- SODRÉ, F.F.; PERALTA-ZAMORA, P.G.; GRASSI, M.T. Microwave-assisted photochemical digestion of natural waters: application in partition and speciation studies of copper. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 695-700, 2004.
- SOTERO-SANTOS, R.B. et al. Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê river, São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 163-170, 2006.
- STEDMON, C.A.; MARKAGER, S.; BRO, R. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. **Marine Chemistry**, v. 82, n. 3-4, p. 239-254, 2003.
- STUMM, W.; MORGAN, J.J. *Aquatic chemistry - chemical equilibria and rates in natural waters*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- SUEUR, S.; VANDENBERG, C.M.G.; RILEY, J.P. Measurement of the metal complexing ability of exudates of marine macro-algae. **Limnology and Oceanography**, v. 27, n. 3, p. 536-543, 1982.
- TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F.L. *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse*. 3rd. ed. New York: McGraw Hill Inc., 1991. 1334 p.
- TEMPLETON, D.M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). **Pure Application Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.
- TIEN, C.J. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 605-613, 2002.

TONIETTO, A.E. Especiação química de cobre e zinco nas águas do Reservatório do Iraí: efeitos da matéria orgânica e interação com microalgas. 163 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

TONIETTO, A.E.; GRASSI, M.T. Análise de especiação de cobre e zinco empregando voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial. **Química Nova**, submetido em 2009.

TOPPERWIEN, S. et al. Cadmium accumulation in *Scenedesmus vacuolatus* under freshwater conditions. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 15, p. 5383-5388, 2007.

TOWN, R.M.; FILELLA, M. A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. **Aquatic Sciences**, v. 62, n. 3, p. 252-295, 2000.

TOWN, R.M.; FILELLA, M. Implications of natural organic matter binding heterogeneity on understanding lead(II) complexation in aquatic systems. **Science of the Total Environment**, v. 300, n. 1-3, p. 143-154, 2002.

TUCCI, A.; SANTANNA C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 97-112, 2003.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ABE, D.S. The ecological dynamics of Barra Bonita (Tietê river, SP, Brazil) reservoir: implications for its biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 1079-1098, 2008.

TWISS, M.R. et al. Coupling the use of computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigations of trace metal toxicity. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 13, n. 1, p. 9-24, 2001.

TWISS, M.R. et al. Guidelines for studies of metal bioavailability and toxicity – why metal speciation should be considered and how! Canadian Network of Toxicology Centres (CNTC). **Metal Speciation Theme Team**, version 6, p. 1-30, 2000.

TWISS, M.R.; MOFFETT, J.W. Comparison of copper speciation in coastal marine waters measured using analytical voltammetry and diffusion gradient in thin-film techniques. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 5, p. 1061-1068, 2002.

U.S.EPA. *Method 1669 - sampling ambient water for determination of trace metals at epa water quality criteria level*. U.S.EPA, Washington, DC, 1996.

VAN LEEUWEN, H.P. et al. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 22, p. 8545-8556, 2005.

VANDERCASTEELE, C.; BLOCK, C.B. *Modern methods for trace elements determination*. Chichester: John Wiley, 1993. 330 p.

- VELASQUEZ, I.B.; JACINTO, G.S.; VALERA, F.S. The speciation of dissolved copper, cadmium and zinc in Manila Bay, Philippines. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 210-217, 2002.
- VERBANCK, M.; VANDERBORGHT, J.P.; WOLLAST, R. Major ion content of urban wastewater: an assessment of per capita loading. **Research Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 61, n. 11-12, p. 1722-1728, 1989.
- VESELÝ, J. et al. Solid-water partitioning of elements in Czech freshwaters. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 4, p. 437-450, 2001.
- VIEIRA, A.A.H. et al. Role of hydrophobic extracellular polysaccharide of *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae) on aggregate formation in a turbulent and hypereutrophic reservoir. **Limnology and Oceanography**, v. 53, n. 5, p. 1887-1899, 2008.
- WANG, R.; CHAKRABARTI, C.L. Copper speciation by competing ligand exchange method using differential pulse anodic stripping voltammetry with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as competing ligand. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, n. 2, p. 153-160, 2008.
- WARREN, L.A.; HAACK, E.A. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. **Earth-Science Reviews**, v. 54, n. 4, p. 261-320, 2001.
- WESTERHOFF, P.; ANNING, D. Concentrations and characteristics of organic carbon in surface water in Arizona: influence of urbanization. **Journal of Hydrology**, v. 236, n. 3-4, p. 202-222, 2000.
- WILDE, K.L. et al. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 2, p. 174-185, 2006.
- WORMS, I. et al. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1721-1731, 2006.
- XUE, H.B.; KISTLER, D.; SIGG, L. Competition of copper and zinc for strong ligands in a eutrophic lake. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 6, p. 1142-1152, 1995.
- XUE, H.B.; SIGG, L. Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. **Water Research**, v. 24, n. 9, p. 1129-1136, 1990.
- XUE, H.B.; SIGG, L. Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water. **Analytica Chimica Acta**, v. 363, n. 2-3, p. 249-259, 1998.
- XUE, H.B.; SIGG, L. Comparison of the complexation of Cu and Cd by humic or fulvic acids and by ligands observed in lake waters. **Aquatic Geochemistry**, v. 5, n. 4, p. 313-335, 1999.
- YABE, M.J.S.; DE OLIVEIRA, E. Heavy metals in fresh waters for evaluation of hydrographic basins. **Quimica Nova**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 1998.

ZHOU, X.; WANGERSKY, P.J. Copper complexing capacity in cultures of *Phaeodactylum tricornutum* - diurnal changes. **Marine Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 301-312, 1985.

ZIMMERMANN, C.M.; GUIMARAES, O.M.; PERALTA-ZAMORA, P.G. Evaluation of the quality of the water body of the Tibagi river in the region of Ponta Grossa using principal components analysis (PCA). **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1727-1732, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 Caracterização físico-química da água do Reservatório de Barra Bonita. Concentração média \pm desvio padrão, n = 3.

Variáveis	agosto 2007			novembro 2007			julho 2008			janeiro 2009		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
pH	8,18 \pm 0,03	7,92 \pm 0,04	7,25 \pm 0,07	7,76 \pm 0,15	7,62 \pm 0,19	7,50 \pm 0,03	7,86 \pm 0,02	7,76 \pm 0,02	8,01 \pm 0,01	7,72 \pm 0,05	7,58 \pm 0,02	7,40 \pm 0,07
OD (mg L ⁻¹)	8,75 \pm 0,13	8,83 \pm 0,11	4,51 \pm 1,26	3,49 \pm 0,55	3,45 \pm 0,31	3,47 \pm 0,22	7,47 \pm 0,45	7,87 \pm 0,52	8,11 \pm 0,41	5,63 \pm 0,65	4,70 \pm 0,70	4,15 \pm 0,03
Cloreto (mg L ⁻¹)	26,7 \pm 1,20	29,4 \pm 0,35	32,4 \pm 1,65	58,2 \pm 2,01	46,3 \pm 2,01	39,3 \pm 0,20	26,9 \pm 0,81	25,9 \pm 0,20	22,7 \pm 0,81	26,1 \pm 0,21	27,5 \pm 0,41	32,5 \pm 0,39
COD (mg L ⁻¹)	1,23 \pm 0,09	1,74 \pm 0,14	2,02 \pm 0,53	8,08 \pm 1,94	6,36 \pm 0,23	5,89 \pm 0,46	5,03 \pm 0,35	5,26 \pm 0,03	5,57 \pm 0,99	6,68 \pm 0,15	8,16 \pm 0,03	7,76 \pm 1,02
Cl (mg L ⁻¹)	9,92 \pm 0,01	9,75 \pm 0,04	8,02 \pm 0,21	24,2 \pm 0,58	17,8 \pm 0,60	9,86 \pm 0,56	11,8 \pm 0,13	11,9 \pm 0,07	8,94 \pm 0,27	10,1 \pm 0,46	9,87 \pm 0,11	9,51 \pm 0,36
SST (mg L ⁻¹)	4,12 \pm 0,88	7,12 \pm 0,18	4,75 \pm 0,71	5,75 \pm 0,08	4,75 \pm 0,21	2,00 \pm 0,17	8,00 \pm 2,83	16,8 \pm 1,91	10,7 \pm 0,35	10,3 \pm 0,97	6,25 \pm 1,70	3,44 \pm 2,67
Clorofila-a (μ g L ⁻¹)	46,6 \pm 1,63	55,7 \pm 1,63	25,8 \pm 0,16	47,3 \pm 4,56	23,2 \pm 1,83	14,7 \pm 5,93	34,4 \pm 1,12	106,8 \pm 17,11	62,9 \pm 1,29	37,3 \pm 2,65	37,5 \pm 1,43	33,4 \pm 0,70
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	59,5 \pm 1,50	62,2 \pm 1,81	50,4 \pm 2,15	115,9 \pm 0,01	83,1 \pm 2,65	45,5 \pm 0,01	53,0 \pm 1,00	53,5 \pm 0,71	41,3 \pm 0,58	57,9 \pm 1,54	56,3 \pm 1,07	48,4 \pm 0,37
Nitrato (mg L ⁻¹)	1,23 \pm 0,03	2,45 \pm 0,01	1,10 \pm 0,02	1,63 \pm 0,26	1,95 \pm 0,22	2,86 \pm 0,01	1,71 \pm 0,20	1,41 \pm 0,47	1,90 \pm 0,39	1,75 \pm 0,19	1,60 \pm 0,68	2,53 \pm 0,15
Condutividade (mS cm ⁻¹)	0,183	0,185	0,135	0,405	0,331	0,257	0,198	0,202	0,171	0,202	0,207	0,220
Nível da água (m)	19,00	16,20	19,60	19,50	13,50	16,50	17,25	14,60	18,48	13,20	13,35	15,10
T água (°C)	20,27	20,16	19,65	24,48	24,28	23,90	20,58	20,17	20,85	26,18	26,37	25,96
T ambiente (°C)	19,00	22,73	16,50	22,41	23,95	20,24	21,00	21,03	20,64	24,95	25,10	24,86
Transparência (m)	1,62	1,20	1,30	1,50	1,30	1,60	1,27	1,05	1,12	1,12	1,20	1,40

APÊNDICE 2 Parâmetros analíticos utilizados para construir a PCA e *loadings* estabelecidos para cada variável em relação às quatro componentes principais (fatores) e suas respectivas porcentagens de variância capturada.

Variáveis	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Valor na PCA
% Variância	32,35	20,45	12,19	10,46	–
CuT	-0,47	–	-0,51	–	1
CuTD	-0,93	–	–	–	2
CuL	-0,90	–	–	–	3
Culábil	–	0,51	–	–	4
Cu ²⁺	–	0,49	0,61	-0,51	5
C _L Cu	–	0,67	–	–	6
logK' _{CuL}	–	-0,74	–	–	7
ZnT	–	0,88	–	–	8
ZnTD	–	0,87	–	–	9
ZnL	0,53	0,56	–	–	10
Znlábil	–	0,81	–	–	11
Zn ²⁺	–	0,87	–	–	12
C _L Zn	–	–	–	–	13
logK' _{ZnL}	–	–	–	–	14
PbT	-0,53	–	–	0,48	15
PbTD	-0,73	–	–	–	16
PbL	-0,54	–	–	0,53	17
Pblábil	-0,77	–	–	–	18
Pb ²⁺	–	-0,70	–	–	19
C _L Pb	–	–	–	–	20
logK' _{PbL}	-0,89	–	–	–	21
COD	0,74	–	–	-0,48	22
Cl	0,52	–	-0,79	–	23
Clorofila-a	-0,55	–	–	-0,56	24
SST	-0,49	–	–	-0,73	25
Cloreto	0,73	–	-0,52	–	26
Alcalinidade	0,48	–	-0,74	–	27
pH	-0,60	–	–	–	28
Nitrato	0,53	-0,53	–	–	29
Tágua	0,83	–	–	–	30
OD	-0,92	–	–	–	31
Condutividade	0,72	–	-0,61	–	32