

SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: SISTEMA DE FRACIONAMENTO SEQUENCIAL POR ULTRAFILTRAÇÃO COM BASE NO TAMANHO MOLECULAR[#]**Julio Cesar Rocha***, **Luiz Fabricio Zara**, **André Henrique Rosa**

Instituto de Química de Araraquara - UNESP - CP 355 -14800-900 - Araraquara - SP

Ézio Sargentini Junior

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) - CP 478 - 69083-000 - Manaus - AM

Peter Burba

Institute for Spectrochemistry and Applied Spectroscopy (ISAS) - D-44139 - Dortmund - Germany

Recebido em 30/4/99; aceito em 1/9/99

HUMIC SUBSTANCES: A SEQUENTIAL DEVICE FOR FRACTIONATION BY ULTRAFILTRATION WITH MOLECULAR SIZE BASIS. A sequential system for fractionation by ultrafiltration (SSFU) equipped with advanced membranes filters (molecular size cut-off: 5, 10, 30, 50 and 100 kDalton) of the polyethersulfone type was developed for analytical fractionation of humic substances (HS) extracted from aquatic systems or soils. The device consists of five membrane filters (Sartocon® Micro) operated by a multi-channel peristaltic pump, enabling an easy handling, working in a closed system and with simple collection of the six obtained fractions (F₁>100; F₂: 100-50; F₃: 50-30; F₄:30-10; F₅: 10-5 and F₆ <5 kDalton). Then, the HS sample (250 mL solution 1.0 mg/mL, pH 5.0 to 6.0) to be fractionated is pumped by pump through the series of membrane filters with a tangential flow of 85 mL/min, initial pressure 0.2 to 0.3 bar and permeation flux through the membranes of 0.8 to 1.4 mL/min. The overall time for fractionation and cleaning of the device is about 10 h and 25 mL of each fraction is obtained.

Keywords: humic substances; fractionation; ultrafiltration.**INTRODUÇÃO**

Substâncias húmicas (SH), matéria orgânica em diferentes estágios de degradação, são definidas operacionalmente como macromoléculas de elevado peso e tamanho molecular variado¹. Suas propriedades relacionadas com complexação, transporte e biodisponibilidade de metais²⁻⁴, conservação do solo⁵, interações com pesticidas⁶ etc. têm sido objeto de vários estudos. Entretanto, para trabalhar com SH procedimentos adequados para extração^{7,8} e fracionamento⁹ são de fundamental importância. Fracionamentos baseados em diferenças de solubilidade, tamanho molecular, densidade de carga, precipitações com íons metálicos e características de adsorção são adequados para separar SH em diferentes frações¹⁰.

A técnica de filtração através de membranas tem sido utilizada, principalmente em indústrias, para fracionar material dissolvido e particulado em sistemas aquosos mostrando ser efetiva não apenas em procedimentos preparativos mas também em escala analítica¹¹⁻¹³. Unidades de ultrafiltração (UF) com fluxo tangencial permitem filtração relativamente rápida devido ao reduzido processo de obstrução dos poros pois, os compostos acumulados na superfície da membrana são deslocados pelo forte fluxo cruzado¹⁴. O fracionamento de substâncias húmicas por UF em filtros de membranas adequados é, em princípio, um método mais simples para estudar essa complexa mistura de macromoléculas. Assim, a caracterização de importantes propriedades físicas e químicas das SH dissolvidas tais como solubilidade, comportamento de adsorção, acidez¹⁵, capacidade complexante com íons metálicos, distribuição de grupos funcionais/estruturas reativas etc. pode ser feita em função da distribuição dos diferentes tamanhos moleculares¹⁰.

Aster *et al.*¹⁶, Burba *et al.*¹⁷ e Rocha *et al.*¹⁸ mostraram que

sistemas de ultrafiltração com múltiplos estágios, podem ser uma importante técnica para especiação de metais e caracterização de frações de substâncias húmicas aquáticas (SHA) com diferentes tamanhos moleculares. Esses sistemas UF geralmente têm as membranas acopladas em peças individuais construídas em acrílico, encaixadas umas nas outras e com os mini reservatórios das frações torneados nas próprias peças. São de construção relativamente complicada e, para evitar vazamentos, exigem mecânica de alta precisão e mão de obra especializada. Do ponto de vista operacional, têm o inconveniente de fornecer um volume de frações relativamente pequeno (0,5-10 mL), dificultando ou até mesmo impedindo maior número de caracterizações de uma mesma amostra.

A contribuição do presente trabalho foi construir um Sistema de Fracionamento Sequencial por Ultrafiltração (SFSUF), Figura 1, utilizando filtros comercialmente disponíveis, com membranas de *polyethersulfone* (Sartocon® Micro) para fracionar SH em diferentes tamanhos moleculares. No SFSUF a amostra é fracionada passando através de uma série de cinco filtros de membrana, com fluxo tangencial, acoplados "on-line". O sistema é de montagem simples, fácil manuseio, operado por bomba peristáltica com no mínimo cinco canais, custo relativamente baixo, trabalha-se em sistema fechado e possibilita obtenção de 25 mL de cada fração.

O SISTEMA DE FRACIONAMENTO SEQUENCIAL POR ULTRAFILTRAÇÃO

Atualmente, são disponíveis no mercado ampla variedade de filtros de membranas construídas com materiais relativamente inertes, com diferentes porosidades e relativa precisão na definição do tamanho dos poros. Isto traz novas perspectivas para o desenvolvimento de sistemas de fracionamento de macromoléculas com diferentes tamanhos moleculares. Utilizando a técnica de fracionamento por ultrafiltração com membrana *polyethersulfone*, Burba *et al.*⁹, estudaram a influência da concentração, força iônica

* e-mail: jrocha@iq.unesp.br

[#] Dedicado aos 60 anos do Dr. Peter Burba e Prof. Dr. Celso A. F. Graner

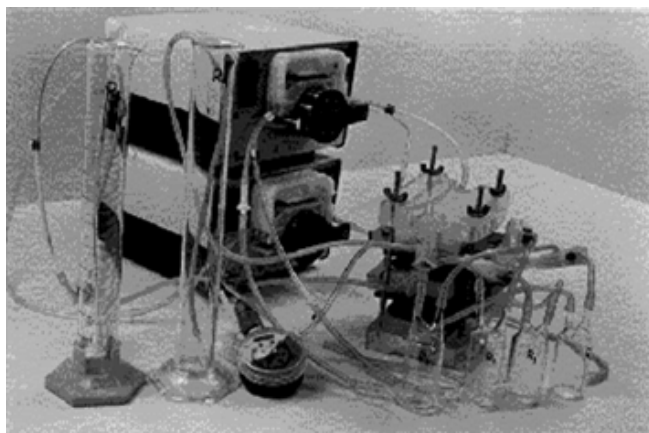
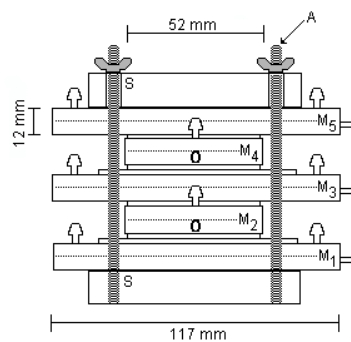


Figura 1. Sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração. Para melhor visualização, R_1 e R_6 foram substituídos por reservatórios menores que os utilizados durante o fracionamento.

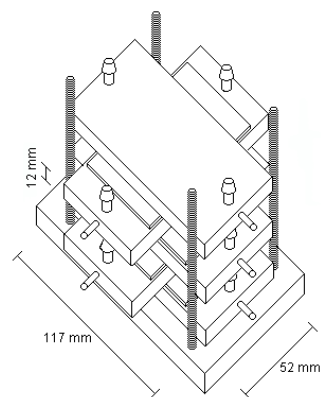
e pH na distribuição de SHA. Caracterizaram que soluções aquosas de SHA 1,0 mg/mL e pH 6,0 são as condições mais adequadas para o fracionamento utilizando-se membranas de *polyethersulfone* (Sartocon® Micro).

Devido à pressão utilizada durante o fracionamento das substâncias húmicas, para construção do SFSUF, fixaram-se (com quatro parafusos de aço inox) cinco filtros comerciais (Sartocon® Micro) de membrana de *polyethersulfone* com diferentes porosidades, em suportes de sustentação. Estes, foram construídos em acrílico com placas intermediárias entre os filtros como ilustram as Figuras 2a e 2b. A pressão é ajustada nos reguladores P_1 - P_5 (Figura 3), conectados nos respectivos tubos, os quais dão retorno ao material não filtrado, e pode variar de 0 a 0,5 bar. Porém, para evitar vazamentos nas conexões, optou-se por operar com 0,3 bar de pressão. O conjunto bomba peristáltica com cinco canais e tubos de Tygon® acoplado ao SFSUF, permite vazão máxima de até 85 mL/min. Embora seja uma vazão relativamente menor que a máxima especificada pelo fabricante dos filtros, é possível trabalhar sem obstruir significativamente os poros das membranas Sartocon® Micro, permitindo o fracionamento dos extratos húmicos, inclusive das frações com maiores tamanhos moleculares. A importância de uma alta velocidade do fluxo tangencial sobre as superfícies das membranas é deslocar os compostos acumulados evitando a obstrução dos poros. Entretanto, a eficiência de um sistema de filtração não está relacionada só com a vazão do fluxo tangencial mas, principalmente, com as pressões exercidas nos tubos pelos reguladores (P_1 - P_5) que dão retorno ao material não filtrado.

A Figura 4 ilustra um reservatório para coleta das frações construído em vidro de borossilicato e suas respectivas dimensões. O extrato húmico entra pelo ponto (1) e é aspirado pelo ponto (2), o qual está conectado a um dos filtros de membrana (M) do sistema ilustrado na Figura 3. Como o fluxo no interior do filtro é tangencial sobre a membrana, o material não filtrado retorna ao reservatório pelo ponto (3). Essa circulação contínua evita o entupimento da membrana, concentra o material não filtrado no reservatório e fraciona o extrato húmico em diferentes tamanhos moleculares. O reservatório R_1 (Figura 3), no qual concentra a fração F_1 , é o próprio frasco da solução de SH que está sendo fracionada. Por outro lado, R_6 é um frasco com cerca de 400 mL para coletar a fração F_6 . Esta, é composta pelo volume inicial do extrato a ser fracionado mais cerca de 150 mL de água os quais são aspirados após fracionamento da amostra através de todo o SFSUF para limpeza preliminar do sistema, com recolhimento em R_6 .



(a)



(b)

Figura 2. Montagem do conjunto de filtros. (a) vista lateral, (b) vista superior tridimensional. S: suporte de sustentação, construído em acrílico com placas intermediárias entre os filtros; A: parafusos de aço inox para ajustes; M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 : filtros equipados com membranas comerciais polyethersulfone, Sartocon® Micro (M_1 -100; M_2 -50; M_3 -30; M_4 -10 e M_5 -5 kDalton).

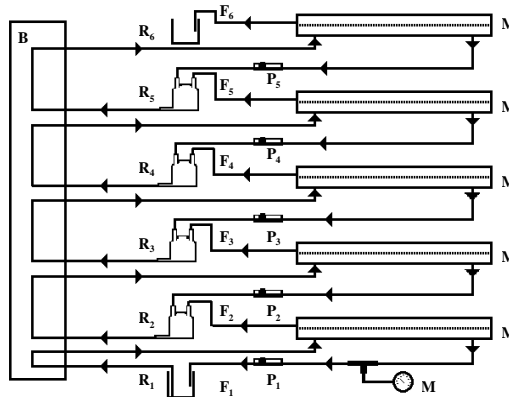


Figura 3. Esquema do sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração utilizado para fracionar substâncias húmicas. Condições: filtros equipados com membranas comerciais polyethersulfone (Sartocon® Micro), com 50 cm², M_1 -100; M_2 -50; M_3 -30; M_4 -10 e M_5 -5 kDalton; frações obtidas e respectivos intervalo de tamanho molecular médio de F_1 (>100), F_2 (100-50), F_3 (50-30), F_4 (30-10) e F_5 (<5 kDalton); B: bomba peristáltica com 5 canais (Ismatec) e tubos de bombeamento Tygon®(AU-95609-10); reservatórios (construídos em vidro de borossilicato) de frações R_2 , R_3 , R_4 , R_5 (25 mL), R_1 (250 mL) e R_6 (500 mL); reguladores de pressão (pinça de Mohr - Fisher Nº Cat. 05-875A) P_1 , P_2 , P_3 , P_4 e P_5 ; manômetro (Ma); 250 mL de solução de substância húmica aquática 1,0 mg/mL em pH-5; fluxo tangencial com vazão de 85 mL/min em todos os filtros; pressão inicial de 0,2-0,3 bar; fluxo de permeação através das membranas 0,8-1,4 mL/min.

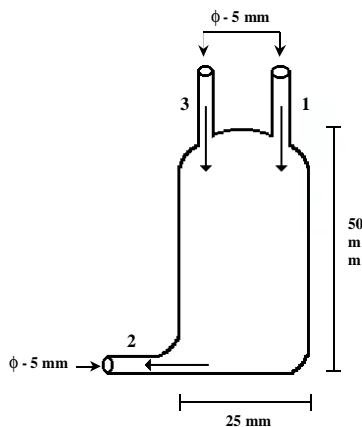


Figura 4. Reservatório construído em vidro de borossilicato com volume interno de 25 mL, para coleta das frações (F_2 - F_5) durante o fracionamento dos extratos húmicos utilizando-se o sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração. 1: entrada do filtrado húmico; 2: aspiração do filtrado húmico para o filtro subsequente; 3: retorno para recirculação do material não filtrado no filtro subsequente.

FRACIONAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

O extrato húmico (250 mL; 1,0 mg/mL e pH 5-6) é aspirado do reservatório R_1 pela bomba peristáltica (B) passando através da série de filtros de membranas M_1 - M_5 , conectados entre si por tubos de Tygon de acordo com as condições experimentais descritas na Figura 3. Após fracionamento da amostra, nas mesmas condições experimentais, aspiram-se cerca de 150 mL de água pelo SFSUF para limpeza preliminar. A retirada das seis frações com diferentes tamanhos moleculares é feita individualmente. Para o SFSUF entrar em equilíbrio interno, desliga-se a bomba peristáltica, descomprimem-se os tubos de bombeamento e os reguladores de pressão. Com o respectivo tubo de bombeamento pressionado na bomba peristáltica, por sucção, retira-se a fração F_1 , após transferir o tubo de retorno de R_1 para uma proveta de 50 mL. Para remoção do material aderido no interior dos tubos e no filtro M_1 , adicionam-se 10-15 mL de água em R_1 e repete-se a sucção recolhendo-se a água na mesma proveta de F_1 . Como R_2 é diferente de R_1 , para retirar F_2 troca-se o tubo de sucção ligado no ponto 2 de R_2 (Figura 4), por um outro tubo através do qual o material é transferido para uma proveta. Transferem-se 10-15 mL de água para um bequer e, pelo tubo de sucção, remove-se o material aderido recolhendo-se a água na mesma proveta de F_2 . Repete-se este procedimento para retirada de F_3 , F_4 e F_5 . Por ser a última fração, F_6 é recolhida concomitantemente durante o processo de fracionamento. Entretanto, como o volume final de F_6 é grande (cerca de 400 mL), posteriormente esta fração precisa ter o volume reduzido aos volumes das demais frações utilizando-se evaporador rotativo.

LIMPEZA DOS FILTROS

Para fracionamento de outra amostra, faz-se a limpeza dos filtros M_1 - M_5 individualmente lavando-se através de sucção de 200 mL de solução de NaOH 0,1 mol/L e 200 mL de água com aplicação de um fluxo reverso ao utilizado durante o fracionamento. Eventualmente, quando fracionam-se soluções contendo íons metálicos, deve-se lavar os filtros também com cerca de 100 mL de solução de HCl 0,01 mol/L e posteriormente com água.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O Sistema de Fracionamento Sequencial por Ultrafiltração desenvolvido, possibilita separar e concentrar substâncias húmicas extraídas de amostras de águas e de solos em seis frações com diferentes tamanhos moleculares: frações F_1 : >100, F_2 : 50-100, F_3 : 30-50, F_4 : 10-30, F_5 : 5-10 e F_6 : < 5 kDalton;

- É adequado para trabalhar com grandes volumes de amostras, fracionando e concentrando simultaneamente. O tempo total gasto para fracionar 250 mL de solução de substância húmica 1,0 mg/mL em pH 5,0-6,0 é cerca de 10 horas, incluindo limpeza com 150 mL de água.

- O número de frações obtidas é opcional. Pois, como os filtros de membrana são acoplados sequencialmente, a quantidade de filtros assim como suas respectivas porosidades podem ser alteradas de acordo com a característica da amostra e a necessidade do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- Aiken, G. R. In: *Humic substances in soil, sediment and water geochemistry, isolation and characterization*; Aiken, G. R.; McKnight, M. D.; Wershaw, R. L.; MacCarthy, P., Eds.; John Wiley & Sons; New York, 1985; p 363-385.
- Rocha, J. C.; Toscano, I. A. S.; Cardoso, A. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 239.
- Zhang, Y. J.; Bryan, N. D.; Livens, F. R.; Jones, M. N. In: *Humic and fulvic: isolation, structure and environmental role*; Gaffney, J. S.; Marley, N. A., Eds.; ACS (Symposium series, 651); Washington, 1996, p 194-206.
- Lund, W. In: *Metal speciation in the environment*; Brockaert J. A. C.; Güçer, S.; Adams, F., Eds.; Wiley, New York, 1990, p 43-55.
- Barros, M. C. P.; Paula, J. R.; Resende, M. O. O.; *Quím. Nova* **1994**, *17*, 376.
- Santos, T. C. R.; Rocha, J. C.; Barceló, D.; *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **1998**, *70*, 19.
- Rocha, J. C.; Rosa, A. H.; Furlan, M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 51.
- Rosa, A. H.; Rocha, J. C.; Sargentini Jr, E.; *Eur. J. Soil. Sci.* **2000** (in press).
- Burba, P.; Shkinev, V.; Spivakov, B. Ya.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *351*, 74.
- Swift, R. S. In: *Methods of soil analysis: chemical methods*; Sparks, D. L., Ed.; SSSA; Maddison, 1996, p 1011-1069.
- Buffle, J.; Perret, D.; Newman, M.; In Buffle, J.; Leeuwen H.P. van (Eds.) *Environmental particles*, Boca Raton Ann Arbor, London Tokyo, 1992; p171.
- Kilduff, J.; Weber, W. J.; *Sci. Tecnol.* **1992**, *26*, 569.
- Geckeler, K. E.; Bayer, E.; Shkinev, V. M.; Gomolitskii, N. N.; Spivakov, B. Ya.; *International Labmate* **1992**, *47*, 17.
- Shkinev, V. M.; Fedorova, O. M.; Spivakov, B. Ya.; Mattusch, J.; Wennrich, R.; Lohse, M.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *327*, 167.
- Prado, A. G. S.; Souza, S. M.; Silva, W. T. L.; Rezende M. O. O.; *Quím. Nova* **1999**, *22*, 894.
- Aster, B.; Burba, P.; Broekaert, J. A. C.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1996**, *354*, 722.
- Burba, P.; Aster, B.; Ninfant'eva, T.; Shkinev, V.; Spivakov, B. Ya.; *Talanta* **1998**, *45*, 977.
- Rocha, J. C.; Sargentini Jr, E.; Toscano, I. A.; Rosa, A. H.; Burba, P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 169.