



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)
Campus A.C. Simões, Cidade Universitária, Av. Lourival Melo Mota,
Tabuleiro dos Martins, Maceió, Alagoas, CEP: 57072-970



AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA DO
SOLO COM CONTAMINANTES ORGÂNICOS EMPREGANDO TÉCNICAS
ESPECTROSCÓPICAS EM CONDIÇÕES AMBIENTAIS SIMULADAS**

Maceió – AL
2018

AMANDA LUISE ALVES NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA DO
SOLO COM CONTAMINANTES ORGÂNICOS EMPREGANDO TÉCNICAS
ESPECTROSCÓPICAS EM CONDIÇÕES AMBIENTAIS SIMULADAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

Maceió – AL
2018



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceio-AL, 57072-970, Brasil.
www.qui.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 13 de julho de 2018

2. Aluno / matrícula: Amanda Luise Alves Nascimento /14113919

3. Orientador / Unidade Acadêmica: Josué Carinhanha Caldas Santos / IQB

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

Josué Carinhanha Caldas Santos (IQB, Presidente)	Nota: <u>9,25</u>
Daniela Santos Anunciação (IQB, 1º avaliadora)	Nota: <u>9,50</u>
André Gustavo Ribeiro Mendonça (IQB, 2º avaliador)	Nota: <u>9,00</u>

5. Título do Trabalho:

Avaliação da interação de frações da matéria orgânica do solo com contaminantes orgânicos empregando técnicas espectroscópicas em condições ambientais simuladas.

6. Local: Instituto de Química e Biotecnologia

7. Apresentação: Horário início: 14:02 h Horário final: 14:27 h
Arguição: Horário início: 14:28 h Horário final: 16:00 h

8. Nota final: 9,25

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 25 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 1:30 minutos, tendo como resultado:

APROVADO

APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

NÃO APROVADO.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 13 de julho de 2018.

Presidente: [Assinatura]
1º Avaliador: [Assinatura]
2º Avaliador: [Assinatura]
Candidato: Amanda Luise Alves Nascimento

RESUMO

O crescente desenvolvimento de produtos agrícolas e o uso intensivo do solo permitiu a introdução no ambiente de compostos com alto índice poluidor, que acarreta em riscos para saúde humana e animal. A matéria orgânica do solo apresenta em sua composição Substâncias Húmicas (SH), que devido à diversidade de grupos funcionais em sua estrutura. Logo, atua como excelente agente complexante, o que permite a interação com espécies poluentes no meio ambiente, podendo produzir diferentes efeitos sobre sua distribuição. Desta forma, é importante avaliar a interação entre as SH e espécies contaminantes, constituindo o objetivo do trabalho. Dois compostos foram analisados, o antibiótico, sulfaquinoxalina (SQX) e o composto orgânico de arsênio(V), roxarsone (RX) em condições ambientais simuladas. Avaliou-se o processo de interação com base em técnicas espectroscópicas. A SH (20 mg L^{-1}) foi titulada com cada um dos ligantes ($5\text{-}250 \text{ }\mu\text{M}$) separadamente. O processo de interação foi observado pelo decaimento do sinal de fluorescência da SH ($\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 497 \text{ nm}$) na presença dos ligantes devido à formação do complexo supramolecular não fluorescente. Nos experimentos empregou-se tampão fosfato (10 mM) em pH 5 e 6 para o RX e SQX, respectivamente. Para os compostos avaliados, o mecanismo de interação seguiu o processo de *quenching* estático, devido redução de K_{SV} com o aumento da temperatura. Sendo estes resultados foram confirmados por UV-vis devido a comprovação da formação de complexo no estado fundamental. A partir dos parâmetros termodinâmicos, observou-se que ambos os processos foram espontâneos ($\Delta G < 0$) e que, a SQX interage predominantemente por interações hidrofóbicas ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$) com a SH, enquanto que o RX por forças de van der Waals e ligações de hidrogênio ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$), havendo para ambos os compostos, uma contribuição de interações eletrostáticas. Os valores de K_b obtidos de $1,38 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (SQX) e $1,20 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (RX) a 30°C , indicam uma força de interação mediana em ambos os processos. A influência de dez íons metálicos ($10 \text{ }\mu\text{M}$) foi investigada quanto à interação SH-ligantes, sendo que em cada um dos processos as espécies influenciaram de formas diferentes. Os estudos por RMN ^1H foram realizados com o intuito de monitorar o processo de interação avaliando as mudanças no ambiente químico do ligante, sendo possível propor as regiões onde o processo de interação ocorria de forma preferencial. Adicionalmente, realizou-se o ensaio de inibição da fosfatase alcalina a fim de verificar o comportamento da atividade enzimática frente ao RX e SH-RX. Logo, este trabalho mostrou os principais parâmetros associados ao processo de interação entre a SH e os ligantes simulando as condições ambientais, objetivando entender o comportamento desses contaminantes no meio ambiente e assim prever os possíveis impactos ambientais causados.

Palavras chaves: Substâncias húmicas; Sulfaquinoxalina; Roxarsone; fluorescência molecular; impacto ambiental.

ABSTRACT

The increasing development of agricultural products and the intensive use of the soil allowed the introduction of compounds with high pollutant content into the environment, which entails risks to human and animal health. The organic matter of the soil presents in its composition Humic Substances (HS), and due to the diversity of functional groups in its structure. Thus, they act as excellent complexing agents, allowing the interaction with polluting species in the environment, being able to produce different effects on their distribution. In this way, it is important to evaluate the interaction between HS and contaminant species, constituting the objective of the work. Two compounds were analyzed, the antibiotic, sulfaquinoxaline (SQX) and the organic compound of arsenic (V), roxarsone (RX) under simulated environmental conditions. In this work, the interaction process was evaluated based on spectroscopic techniques. The HS (20 mg L^{-1}) was titrated with each of the ligands ($5\text{-}250 \text{ }\mu\text{M}$), separately. The interaction process was observed by the decay of the SH fluorescence signal ($\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 497 \text{ nm}$) in the presence of the SQX and RX, by formation of the non-fluorescent supramolecular complex. In the assays phosphate buffer (10 mM) at pH 5 and 6 was used for RX and SQX, respectively. For the compounds evaluated, the interaction mechanism followed the static quenching process, based on K_{SV} reduction values with increasing of the temperature. These results were confirmed by UV-vis, confirmation of complex formation in the ground state. From the thermodynamic parameters, it was observed that both processes were spontaneous ($\Delta G < 0$) and that SQX binding to HS predominantly by hydrophobic interactions ($\Delta H > 0$ and $\Delta S > 0$), while RX by van der Waals forces and hydrogen bonds ($\Delta H < 0$ and $\Delta S < 0$), for both compounds, a contribution of electrostatic interactions was observed. The K_b values obtained from $1,38 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (SQX) and $1,20 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (RX) at $30 \text{ }^\circ \text{C}$, represent a median interaction force in both processes. The influence of ten metal ions ($10 \text{ }\mu\text{M}$) was investigated for SH-ligand binding, and in each of the processes the species influenced of the different ways. The ^1H NMR studies were performed with the purpose of monitoring the interaction process by evaluating the changes in the chemical environment of the ligands, being possible to propose the regions where the interaction process occurred preferentially. The alkaline phosphatase inhibition assay was performed to verify the behavior of the enzymatic activity against RX and HS-RX. Therefore, this work showed the main parameters associated to the interaction process between SH and the ligands simulating the environmental conditions, aiming to understand the behavior of these contaminants in the environment and thus predict the possible environmental impacts caused.

Keywords: Humic substances; Sulfaquinoxaline; Roxarsone; molecular fluorescence; environmental impact.

*Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.
Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.
Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciososa.
Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas estarás seguro,
a sua verdade é escudo e broquel.
Não temerás espanto noturno nem seta que voe de dia,
Nem da peste que ande na escuridão, nem da mortandade que assole ao meio-dia.
Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas tu não serás atingido.
Somente com os teus olhos olharás e verás a recompensa dos ímpios.
Porque tu, ó Senhor, és o meu Deus e meu refúgio. No Altíssimo é a tua habitação.
Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.
Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.
Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra.
Pisarás o leão e a áspide, calcarás aos pés o filho do leão e a serpente.
Porque tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei no alto retiro, porque conheceu o meu nome.
Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia, livrá-lo-ei e o glorificarei.
Dar-lhe-ei abundância de dias, e lhe mostrarei a minha salvação.
Amém.*

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus em primeiro lugar, por me sustentar durante toda essa trajetória. Ao meu pai, mãe e irmã por acreditarem e investirem em mim. A minha vó Luiza *in memoriam*, que estaria feliz por cada conquista que alcançamos. Minha obrigada por tudo, pela paciência, compreensão, companheirismo, money e por ser essa mulher incrível que batalha desde sempre por nós, a melhor mãe do mundo. Fernanda, o mais difícil de estar distante durante esse tempo foi não poder acompanhar cada passo seu, cada conquista, cada aborrecimento, cada lágrima, a minha irmãzinha insuportável estava crescendo e eu não estava por perto. Amo vocês incondicionalmente, esse amor além da fé que me dar força para alcançar os meus/nossos sonhos.

Sou grata ao meu Orientador Josué Carinhonha que foi de extrema importância nessa caminhada, agradeço pelo cuidado, paciência, por ser um referencial e o parabeno pelo excelente profissional que és, muito obrigada pela oportunidade. Aos professores Sandra Cidreira, Luciano Matos, Lucyan, Adina, Sinvaldo, Daniela, Ísis, Júlio, André, Aráceles, Pedro e a todos aqueles que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. A CNPq pela oportunidade de desenvolver pesquisas.

Ao LINQA laboratório que graças a Deus eu faço parte. Em especial Shenia, Aryanna, Fátima, Mayara, Janaina, Jaelson, Alef, Woodland, Dayanne e Elysson, obrigada por todo auxílio e por tornarem os dias mais felizes, vocês são demais. Duda, Isabella (boss) e Eric muito obrigada pela amizade, memes e grande apoio. Marina obrigada por toda confiança, pelas conversas todas as manhãs, pela preocupação, amizade e cuidado. À Débora (obrigada pelo apoio nos momentos difíceis), Mariana e Heloize que estão comigo desde o início da graduação. Aos meus companheiros Alice, Natali, Edu e Karolayne pelos momentos e pelas risadas e que risadas né Karol. Aos meus amigos do CA, em especial Pedro e Gley pela amizade construída. Larissa Emenuelle obrigada por tudo, pelos momentos mais loucos e por topar organizar nossa formatura. Aos colegas Jorge, Ivis, Guimirães e Pato pelas risadas. Laura, Allana e Danielle obrigada minhas amigas por me aturarem até nos meus piores momentos.

Aos meus amigos de sempre, os melhores do universo, Ana Lídia, Daiane, Daniela, Elizama, Franciele, Jeferson, Naimisson, Priscilla e Wende. Está em ordem alfabética pra evitar conflitos, o que a distância não separa dura eternamente, faltam palavras pra expressar o que sinto por vocês, mas resumidamente amo cada pedaço em

cada um de vocês, exceto os atrasos de alguns. Aos amigos adquiridos durante o caminho Jonas, Igor, Tayná, Larissa Lopes, Ilane e Erivaldo. À Gorete e Nilda por toda atenção e carinho. Aos que moram ou moraram comigo e continuam sendo especiais, Adriano (aquele que compra as suas brigas e é um bom ouvinte), Leila (cuidadosa e amorosa só que do seu jeito), Octávio (o estrangeiro de alegria contagiante), Keitt (a princesa da casa (coitada), delicada como uma xícara de café), Marina (amiga e irmã, a pessoa que tem um coração enorme), Gustavo (o irmão mais novo e amigo de plantão, obrigada por cuidar de mim do seu jeito) e Moisés (o irmão mais velho, obrigada pelos primeiros pedaços do bolo no seu aniversário rsrs, por ser essa pessoa excepcional, bondoso até demais, agradeço pelos momentos, por estar sempre disponível a ajudar, por acreditar em mim e torcer pra que tudo desse certo, você é demais. Vocês são a família que adquiri, não trocaria nenhum de vocês, vocês são incríveis. Ao seu Esdras *in memoriam*, Marinete, Danielle e Rute por me acolherem com todo amor, vocês são parte da minha família alagoana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas dos compostos avaliados (na forma totalmente associada), (a) sulfaquinoxalina (SQX) e (b) roxarsone (RX).....	19
Figura 2.	Esquematisação da formação dos complexos macromolécula-ligantes e as possíveis interações existentes.....	22
Figura 3.	Resultados obtidos para avaliação da interação SH-SQX por fluorescência molecular. (a) Curva de titulação da SH (20 mg L ⁻¹) com SQX (0 - 250 µM) a 30°C e pH 6; (b) Linearização da curva em função da equação 1 (K _{sv}); (c) Linearização da curva em função da equação 2 (K _b e n)	31
Figura 4.	Representação genérica de um sistema na presença de uma espécie que atua como <i>quencher</i> , com a representação do processo de (a) <i>quenching</i> dinâmico e (b) <i>quenching</i> estático.....	32
Figura 5.	(a) Avaliação do valor do pHPZC (<i>point of zero charge</i>) da SH; (b) Gráfico de distribuição das espécies de SQX em função do pH. A faixa em amarelo indica o pH = 6, no qual as avaliações foram efetuadas e (c) Representação do equilíbrio ácido-base da SQX em meio aquoso	34
Figura 6.	Avaliação do efeito da força iônica na interação do complexo SH-SQX. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6.....	36
Figura 7.	Gráfico de fluorescência 3D, (a) SH (20 mg L ⁻¹) e do (b) do complexo SH-SQX a 30°C e pH 6. A [SQX] utilizada foi de 125 µM.....	38
Figura 8.	Espectro de fluorescência sincronizada da SH (20 mg L ⁻¹) na presença de diferentes concentrações de SQX (0 – 250 µM) utilizando Δλ = 18 nm, a 30°C e pH 6.....	39
Figura 9.	Razão entre as constantes de ligação na presença e na ausência de diferentes competidores iônicos.....	40
Figura 10.	Espectro de absorção no UV-vis dos sistemas SH, SQX e SH-SQX em 30°C e pH 6.....	41
Figura 11.	Espectro de RMN ¹ H da SQX na presença de diferentes proporções de SH.....	42
Figura 12.	Resultados obtidos para avaliação da interação SH-RX por fluorescência molecular. (a) Curva de titulação da SH (20 mg L ⁻¹) com RX (0 - 250 µM) a 30°C e pH 5; (b) Linearização da curva em função da equação 1 (K _{sv}); (c) Linearização da curva em função da equação 2 (K _b e n).....	44
Figura 13.	(a) Gráfico de distribuição das espécies de RX em função do pH. A faixa em amarelo indica o pH = 5, no qual as avaliações foram efetuadas e (b) Representação do equilíbrio ácido-base da SQX em meio aquoso.....	45
Figura 14.	Avaliação do efeito da força iônica na interação do complexo SH-RX. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), RX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 5.....	46
Figura 15.	Gráfico de fluorescência 3D, (a) SH (20 mg L ⁻¹) e do (b) do complexo SH-RX a 30°C e pH 5. A [RX] utilizada foi de 125 µM.....	48
Figura 16.	Espectro de fluorescência sincronizada da SH (20 mg L ⁻¹) na presença de diferentes concentrações de RX (0 – 250 µM) utilizando Δλ = 18 nm, a 30°C e pH 5.....	49
Figura 17.	Razão entre as constantes de ligação na presença e na ausência de diferentes competidores iônicos.	50

Figura 18.	Espectro de absorção no UV-vis dos sistemas SH, RX e SH-RX em 30°C e pH 5	51
Figura 19.	Espectro de RMN ¹ H do RX na presença de diferentes proporções de SH.....	52
Figura 20.	Reação que ocorre durante a fosfatase alcalina.....	53
Figura 21.	Resultados da inibição da fosfatase alcalina. a) Avaliação da inibição frente o RX (10 e 100 μM); b) Avaliação da atividade enzimática em diferentes sistemas SH (2 e 20 mg L ⁻¹) em 30°C e pH 9,5.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros de ligação entre SH e AH quanto a interação com SQX. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6.....	33
Tabela 2.	Avaliação da interação entre SQX e SH em função do pH. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6.....	33
Tabela 3.	Parâmetros de ligação e termodinâmicos para o sistema SH e SQX. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6	35
Tabela 4.	Valores das constantes na ausência e presença da SQX. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6	37
Tabela 5.	Valores de deslocamento químico para SQX na presença de diferentes proporções de SH a 30°C e pH 6	42
Tabela 6.	Avaliação da interação entre RX e SH em função do pH. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6.....	44
Tabela 7.	Parâmetros de ligação e termodinâmicos para o sistema SH e RX. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), RX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 5.....	46
Tabela 8.	Valores das constantes na ausência e presença da RX. Condições: SH (20 mg L ⁻¹), RX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 5.....	48
Tabela 9.	Valores de deslocamento químico para RX na presença de diferentes proporções de SH a 30°C e pH 5.....	52

LISTA DE ABREVIATURA e SIGLAS

3D – Tridimensional

A – Absorvância

AF – Ácido Fúlvico

AH – Ácido Húmico

°C – Graus Celsius

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

DMSO – Dimetilsulfóxido

F – Fluorescência

F₀ – Fluorescência na ausência do ligante

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier por transmissão

HSA – Albumina do soro humano

K_b – Constante de ligação

KI – Iodeto de potássio

K_{SV} – Constante de Stern-Volmer

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHz – Megahertz

M – Molar

MO – Matéria orgânica

n – Número de sítios de ligação do complexo

nm – Nanômetros

pH – Potencial hidrogeniônico

pKa – Constante de dissociação ácida

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RX- Roxarsone

SQX – Sulfaquinoxalina

SH – Substâncias Húmicas

T – Temperatura

Tir – Tirosina

Trp – Triptofano

UV-vis – Ultravioleta-visível

ΔG – Energia livre de Gibbs

ΔH – Entalpia

ΔS – Entropia

$\Delta\delta$ – Deslocamento químico

μL – Microlitros

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1	Importância da matéria orgânica do solo	15
1.1.1	Turfa	16
1.2	Substâncias Húmicas	16
1.3	Contaminantes orgânicos no meio ambiente	18
1.3.1	Sulfaquinoxalina	20
1.3.2	Roxarsone	20
1.4	Química supramolecular	21
1.4.1	Interação macromolécula-ligante	22
1.4.2	Técnicas utilizadas para avaliação da interação	23
1.4.2.1	<i>Espectroscopia de fluorescência molecular</i>	23
1.4.2.2	<i>Espectroscopia de absorção (UV-vis)</i>	24
1.4.2.3	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)</i>	24
1.5	Justificativa	25
2.	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivos gerais	26
2.2	Objetivos específicos	26
3.	EXPERIMENTAL	27
3.1	Reagentes e preparo das soluções	27
3.2	Equipamentos utilizados	27
3.3	Procedimentos	28
3.3.1	Espectroscopia de fluorescência	28
3.3.2	Espectrometria no UV-vis	28
3.3.3	Ressonância magnética nuclear	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Estudos de interação da sulfaquinoxalina com frações da matéria orgânica	30
4.1.1	Ensaio empregando fluorescência molecular	30
4.1.1.1	<i>Titulação espectrofluorimétrica</i>	30
4.1.1.2	<i>Efeito da concentração da SH e AH no processo de interação com a SQX</i>	32
4.1.1.3	<i>Avaliação da influência do pH no processo de interação</i>	33
4.1.1.4	<i>Avaliação dos parâmetros termodinâmicos</i>	34

4.1.1.5	<i>Avaliação do efeito da força iônica no processo de interação</i>	36
4.1.1.6	<i>Ensaio com Iodeto de potássio (KI)</i>	37
4.1.1.7	<i>Fluorescência 3D</i>	37
4.1.1.8	<i>Fluorescência sincronizada</i>	38
4.1.1.9	<i>Avaliação do efeito de espécies competidoras</i>	39
4.1.2	Avaliação da interação por espectroscopia de absorção no UV-vis	40
4.1.3	Ressonância magnética nuclear (RMN ¹ H)	41
4.2	Estudos de interação do roxarsone (RX) com substância húmica do solo	43
4.2.1	Estudos empregando fluorescência molecular	43
4.2.1.1	<i>Titulação espectrofluorimétrica para avaliar a interação entre a SH e RX</i>	43
4.2.1.2	<i>Influência do pH e concentração da SH na formação do complexo SH-RX</i>	44
4.2.1.3	<i>Parâmetros termodinâmicos associado ao processo de interação SH-RX</i>	45
4.2.1.4	<i>Avaliação da força iônica na estabilidade do complexo SH-RX</i>	46
4.2.1.5	<i>Ensaio com iodeto de potássio</i>	47
4.2.1.6	<i>Estudos por fluorescência 3D</i>	48
4.2.1.7	<i>Fluorescência sincronizada</i>	49
4.2.1.8	<i>Avaliação do efeito de espécies competidoras</i>	50
4.2.2	Avaliação da interação por espectroscopia de absorção no UV-vis	51
4.2.3	Ressonância magnética nuclear (RMN ¹ H)	52
4.2.4	Inibição da fosfatase alcalina	53
5.	CONCLUSÃO	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Importância da matéria orgânica do solo

Os solos são um recurso natural básico de extrema importância, constituído por matéria mineral e orgânica, onde ocorrem diversas reações químicas resultantes das condições do meio (BERTONCINI, 2008). A decomposição das rochas leva à formação das pequenas partículas das quais os solos são constituídos, chamadas partículas minerais. Tais partículas são associadas a matéria orgânica, proveniente da decomposição de animais e vegetais, dando origem às camadas superficiais do solo, muito importantes para o crescimento das plantas. O papel do solo no ambiente é de grande relevância, pois o mesmo é responsável pelo sustento da flora, determina o destino da água na superfície e reciclagem dos nutrientes, além de ser o *habitat* de muitos organismos (MOREIRA et al., 2013). Essas características devem-se a presença da matéria orgânica (MO) que é essencial para a manutenção da micro e da mesobiota, pois a ação de microrganismos sobre esta matéria cede ao solo os nutrientes necessários para sua conservação, manutenção do equilíbrio e desenvolvimento das suas funções (AGUIAR, 2011).

Além de ser fonte de nutrientes, a MO participa de processos físicos e químicos fundamentais para o solo, como a regulação da disponibilidade dos vários nutrientes, em especial os micronutrientes, bem como a atividade de elementos fitotóxicos como Al(III) e Mn(II) e potencialmente tóxicos (Hg(II), Pb(II), Cd(II), entre outros), capacidade troca de cátions, agregação e retenção de água. Além dos processos biológicos relacionados com os microrganismos e enzimas encontradas em sua composição (ZANDONADI et al., 2014).

Existem diferentes tipos de solos na natureza, podendo ser separados de acordo com suas características, tais como: cor, fertilidade, quantidade e tipo de partículas minerais que os formam, tipo de organização dessas partículas na formação dos agregados, quantidade de água presente, entre outras características. Devido à existência de diferentes tipos de rochas e formas de relevo na superfície da terra, os quais estão sujeitos à ação de diversas condições climáticas e atividade de organismos vivos, assim, não é complicado compreender por que existem tipos de solos distintos (MOREIRA et al., 2013).

1.1.1 Turfa

Dentre os diferentes tipos de solos, vale ressaltar a turfa, que é extraída das turfeiras de grande interesse devido ao seu alto teor de carbono orgânico, o que possibilita uma gama de aplicações, como em fertilizante na agricultura e remediação de áreas contaminadas, além disso, pode ser utilizada como combustível em termoelétricas (SUSZCZYNSKI, 1982; FRANCHI et al., 2003). A turfa é rica em MO, cerca de 70% ou mais em relação ao seu peso, que por sua vez, é constituída de diversos compostos orgânicos encontrados em águas naturais, sedimentos e solos, mudanças na composição desses ecossistemas alteram as características e quantidade da mesma, podendo assim, acarretar em diferentes efeitos biogeoquímicos (CASTRO et al., 2006; AZEVEDO & NOZAKI, 2008).

As turfas, são formadas a partir da decomposição de materiais de origem vegetal pela atividade de microrganismos em determinados ecossistemas, são classificadas de acordo com a localização em relação a sua formação no lençol freático, havendo assim diferentes tipos de turfa. As turfas existentes no Brasil podem ser classificadas como hídrica, fibrosa e lenhosa, a depender da região onde foi formada (KLAVINS et al., 2012; MOORE, 1989).

Grande parte da matéria orgânica da turfa está na forma de húmus, um material suscetível ao processo de fermentação, com posterior estabilização (LAMIN, 2001). Em geral, os compostos orgânicos no solo podem ser encontrados em duas formas, substâncias não-húmicas como as proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, dentre outros compostos orgânicos de características físicas e químicas bem definidas e as substâncias húmicas que são a parcela quimicamente complexa da MO (AIKEN, 1995). A quantidade de carbono presente na matéria orgânica em solos e turfeiras é superior a aquela presente na atmosfera e na biomassa terrestre, sendo seus principais constituintes as substâncias húmicas (STEVENSON, 1985).

1.2 Substâncias húmicas

As substâncias húmicas (SH) são os componentes fundamentais da mistura de compostos que compreendem a MO do solo, sendo os materiais orgânicos mais abundantes no meio ambiente. As SH podem ser encontradas também em sedimentos de águas naturais, rios e lagos (YEL; AHMETLI, 2015). Pertencem a uma classe de

compostos que não possuem características físicas e químicas bem definidas, contendo diversos grupos funcionais em suas estruturas, como ácidos carboxílicos, cetona, hidroxilas fenólicas e alcoólicas, constituindo uma mistura complexa de compostos orgânicos naturais. Essas substâncias são formadas a partir do processo de humificação, no qual, se decompõem lentamente e acumulam-se nos solos, apresentando elevada complexidade química e forte interação com a fração coloidal inorgânica do solo (HAYES, 2001; PRIMO, 2011; KULIKOWSKA et al., 2015).

Devido a sua elevada complexidade não é possível definir as SH estruturalmente, mas é possível, a partir das características de solubilidade de suas principais frações, sendo: 1) os ácidos húmicos (AH) que são a parte do material orgânico solúvel em meio alcalino diluído e pouco solúvel em meio ácido ($\text{pH} < 2$); 2) os ácidos fúlvicos relativo a fração solúvel em ambos os meios e, 3) a humina, a fração do material orgânico pouco solúvel em ambos os meios (HAYES, 2001).

A presença de distintos grupos funcionais na macroestrutura das SH possibilita que as mesmas atuem como excelentes agentes complexantes, devido a diversidade de grupos com diferentes cargas produzidos de acordo com a variação de pH. As condições do meio e a natureza da SH influenciam no processo de interação/adsorção de diversas espécies, como íons metálicos e espécies poluentes. O sistema SH e contaminante pode atuar em diversos processos no ambiente, desde a distribuição dessas espécies contaminantes o que acarretaria em risco ambiental, ou até, minimizando os efeitos tóxicos destas espécies, a assim, auxiliar no processo de remediação (LEI, 2008; KULIKOWSKA et al., 2015).

Em decorrência disso e por exercerem ampla influência nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo as SH possuem importância ambiental, uma vez que podem interagir com pesticidas, por exemplo, de formas diferentes, incluindo processos de adsorção, partição e solubilização, entre outros. Assim, a interação com as SH podem influenciar no comportamento dos pesticidas no solo, afetando sua degradação, desintoxicação, persistência, mobilização, transporte, biodisponibilidade, fitotoxicidade e bioacumulação (PRIMO, 2011; SENESI, 1992). Tendo em vista a interação das SH com diferentes espécies, é corrente a comercialização de fertilizantes como de origem natural que são enriquecidos com macro e micronutrientes, os quais, são liberados para a planta de acordo com suas necessidades, levando a melhorias na produtividade (BOTERO et al., 2009).

A utilização de tecnologias inadequadas vem resultando na contaminação dos solos, principalmente por resíduos sólidos e líquidos, efluentes provenientes das atividades agrícolas, descargas de suiniculturas ou de indústrias de vários ramos (BERTONCINI, 2008). Os metais que são uma importante fonte de matéria-prima passam também a ser uma fonte antropogênica de contaminação do meio ambiente. Por isso, são necessários estudos que avaliem como as SH interagem frente a diversas espécies. O interesse em estudos voltados para essa área é crescente, pois é um ramo que possui potencial econômico, os mesmos devem visar conhecer melhor a interação das SH com essas espécies. Além disso, uma vez que existem naturalmente no solo espécies metálicas que não são essenciais para as plantas, estudos viabilizando a presença dessas, como macro e micronutrientes, devem fornecer o embasamento necessário para aplicação das SH enriquecida em nutrientes para solos agrícolas (BOTERO et al., 2009).

O tema relevante dentro deste contexto é a remediação e recuperação de terras contaminadas com materiais perigosos, devido à conscientização dos possíveis efeitos adversos no meio ambiente e saúde (VIANA, 2010). Nesses casos a biorremediação é uma técnica que vem sendo utilizada, normalmente é um processo à longo prazo em comparação a outros métodos de remoção física ou química. Porém, esse processo além de ser favorável para a remoção de contaminantes, oferece um processo definitivo, em relação a exclusão do contaminante do meio ambiente (STEHLICKOVA, 2009).

1.3 Contaminantes orgânicos no meio ambiente

Contaminação é a introdução de organismos patogênicos, compostos tóxicos ou outros elementos, em concentrações que além de representar um risco para a população humana, também é uma ameaça para a sobrevivência de outros animais, microrganismos e plantas (BEZERRA et al., 2003).

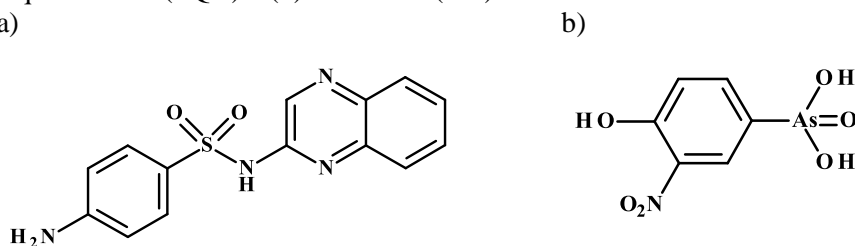
O desenvolvimento gradual de produtos e o uso intensivo dos mesmos no solo trouxe como consequência a inserção no ambiente de compostos com distintos potenciais de poluição prejudicial à saúde humana, animais e vegetal (TASHO & CHO, 2016). Os solos podem estar contaminados por compostos orgânicos e inorgânicos. Compostos orgânicos são aqueles que apresentam carbono como o elemento químico em maior proporção em sua composição, sendo caracterizados também pela capacidade de formar cadeias longas ou curtas. Já os compostos inorgânicos, englobam uma grande

diversidade de produtos, destacando-se os metais potencialmente tóxicos e compostos radioativos (SANTIAGO et al., 2015; ALMEIDA, 2015).

Dentre os contaminantes orgânicos vale destacar as substâncias utilizadas na criação e no tratamento de doenças em animais como antibióticos e/ou aditivos, visto que a produção animal é uma das atividades mais relevantes do agronegócio brasileiro e mundial. Visto que a utilização de medicamentos com fins terapêuticos é uma prática bastante comum, com o intuito de assegurar a produtividade e a competitividade do setor. Como muitas dessas moléculas não são totalmente metabolizadas no organismo animal, seus resíduos têm sido detectados em amostras de solo, água superficial e subterrânea (REGITANO & LEAL, 2010), levando a contaminação/poluição do solo.

Nesse estudo, foram avaliados dois compostos de diferentes classes, o antibiótico sulfaquinoxalina (SQX) e o composto orgânico de arsênio(V), o roxarsone (RX) (Fig. 1), com ampla aplicação na medicina veterinária. Práticas inadequadas de utilização do SQX e RX pode ocasionar em impactos ao ambiente, devido ao descarte inadequado de excrementos de animais que possuem uma quantidade elevada destes compostos. Assim, a adsorção e fixação no solo do SQX e RX são dependentes das suas propriedades físico-químicas, e de alguns atributos inerentes ao solo como, por exemplo, tipo de matéria orgânica predominante, densidade, formação química e umidade, entre outras (DONGMEI, 2011, TASHO & CHO, 2016). Além disso, a administração incorreta de antibióticos na medicina veterinária impõe o grande risco potencial de que tais resíduos possam conduzir a danos no ambiente, e por consequência, à saúde humana (HOFF & KIST, 2009).

Figura 1. Estruturas dos compostos avaliados (na forma totalmente associada), (a) sulfaquinoxalina (SQX) e (b) roxarsone (RX).



Fonte: Elaborado pela autora, 2018

1.3.1 Sulfaquinoxalina

As sulfonamidas constituem uma classe de antibióticos utilizados em larga escala principalmente na medicina veterinária, devido seu amplo espectro antibacteriano, ampla variedade estrutural, estabilidade química e principalmente seu baixo custo (LYRA, 2017). As sulfonamidas são frequentemente utilizadas em animais produtores de alimentos para prevenção de doenças, promoção do crescimento e ganho de peso. Dentre as drogas que fazem parte do grupo das sulfonamidas destaca-se a sulfaquinoxalina (SQX, Fig. 1a). Geralmente quando boas práticas veterinárias não são realizadas, observa-se a presença de resíduos proibitivos desse antibiótico em carne e ovos. No Brasil é de responsabilidade da rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) fiscalizar sobre a presença de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal (LANDONI, 2015).

O principal risco para a saúde humana no uso de antibióticos em animais é o fato das bactérias presentes nesses poderem desenvolver resistência, a qual, pode se desenvolver por caminhos diferentes, como a mutação, a aquisição de genes resistentes ou a associação de ambos. É necessário entender que o aumento da resistência bacteriana em humanos está relacionado ao aumento da resistência desses microrganismos em espécies animais. Outra grande preocupação com o uso das sulfonamidas e outras drogas utilizadas na produção intensiva de animais, está voltada para a quantidade de resíduos que é transferida para o ambiente por meio dos resíduos gerados por estes animais (SANTOS, 2013; HOFF & KIST, 2009).

1.3.2 Roxarsone

Compostos orgânicos de arsênio(V) podem estar presentes em aves provenientes de operações comerciais por seu uso como aditivo alimentar, com destaque para o roxarsone (ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsônico) utilizado no tratamento de frangos. O roxarsone (RX) é um composto orgânico de arsênio é empregado na indústria aviária como aditivo alimentar, para o tratamento de doenças parasitárias, crescimento mais rápido e melhoramento da pigmentação da carne em frangos (RUTHERFORD, 2003).

Estudos recentes mostram que a utilização de compostos orgânicos de arsênio(V) como aditivos podem causar efeitos tóxicos quando são utilizados níveis superiores ao recomendado (15 mg kg^{-1} , segundo a resolução CONAMA nº 420). Então,

para garantir confiança na indústria de carne e ovos e evitar o uso desordenado dessa classe de compostos, a quantidade de compostos organoarsenicais em alimentos destinados aos animais deve ser monitorada (DONGMEI, 2011). Quase todo RX ingerido na alimentação é excretado de forma inalterada no estrume. Os resíduos provenientes de aves de capoeira composto de esterco e material de cama tem um alto teor de nutrientes e é usado rotineiramente como fertilizante em terras agrícolas e pastagens. Essa prática pode resultar em altas concentrações de arsênio na água, que pode contribuir para a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, e no solo, que conseqüentemente podem levar ao aumento de sua concentração nas plantas, tornando as mesmas inadequadas para consumo humano e animal (GARBARINO, 2003; BAYSE, 2013).

Compostos como a SQX e RX interagem com as SH por meio de interações não covalentes. O processo de interação pode ser avaliado explorando os conceitos provenientes da química supramolecular, que se trata do ramo da química que estuda sistemas de reconhecimento ou organização molecular.

1.4 Química supramolecular

Nas últimas décadas, a química supramolecular tem estado na frente da pesquisa química, com o intuito de compreender a química além da ligação covalente. A química supramolecular é um campo altamente interdisciplinar abrangendo as diferentes áreas da ciência. Os sistemas biológicos são um alvo frequente para a pesquisa supramolecular, pois não envolvem a formação ou quebra de ligações covalentes, essas interações não covalentes são fracas, mas de extrema importância para a compreensão de diversos processos biológicos (RESNATI et al., 2015).

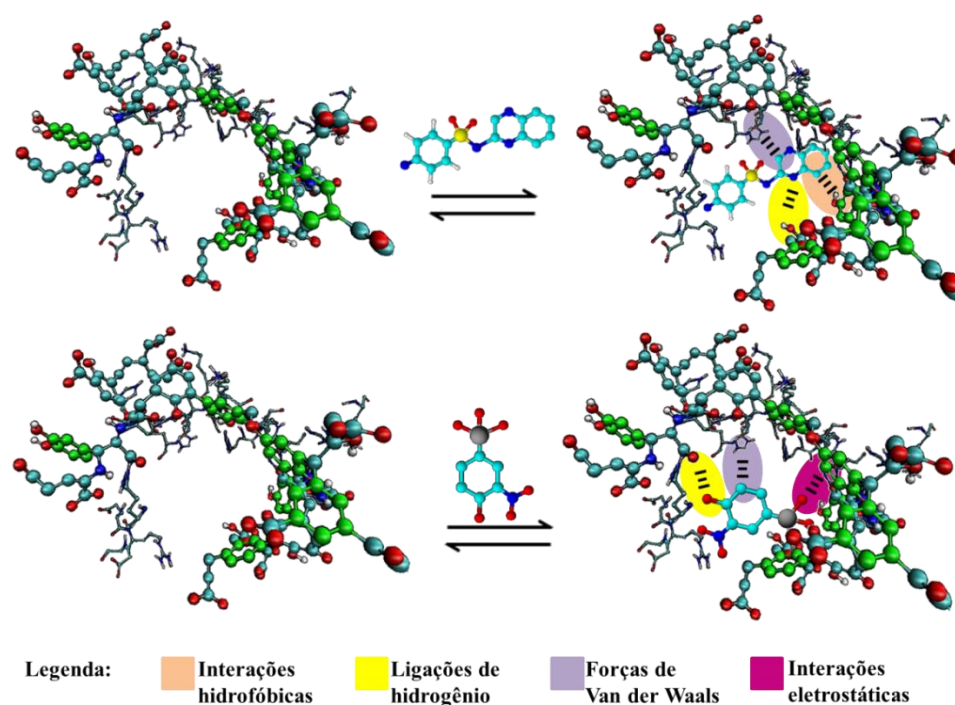
Definida por Jean-Marie Lehn em 1969 como a química das interações intermoleculares não covalentes, a química supramolecular, contempla compostos associados por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, com diferentes graus de complexidade. Da mesma forma que moléculas são construídas conectando-se átomos através de ligações covalentes, compostos supramoleculares são construídos ligando-se moléculas através de interações intermoleculares, direcionais e não direcionais. Assim, são de grande utilidade conceitos como reconhecimento molecular, química hospedeira e conceitos de automontagem (LYRA, 2017; VARSHEY et al., 2012).

As SH possuem um comportamento semelhante ao das proteínas quanto aos processos de interação sem a formação de ligações covalentes e são definidas atualmente como associações supramoleculares de moléculas heterogêneas relativamente pequenas. Estes agregados são associados a interações não covalentes e interagem com outras espécies formando complexos supramoleculares macromolécula-ligante (AZEVEDO & NOZAKI, 2008).

1.4.1 Interação macromolécula ligante

O complexo macromolécula-ligante formado por meio das interações intermoleculares entre o ligante e o sítio de ligação das frações da MO (Fig. 2), possuem estabilidade, solubilidade, reatividade e volatilidade diversificadas. Tais propriedades são importantes e definem a disponibilidade e o transporte das diferentes espécies no ambiente, sejam elas contaminantes ou nutrientes, bem como, alterações conformacionais na estrutura nativa da SH após o processo de interação. A afinidade do ligante com os sítios de ligação da SH dependem de fatores como natureza e carga dos íons, grupo funcional do ligante, pH do meio, entre outros (HU & LI, 2014; AREND, 2010).

Figura 2. Esquematização da formação dos complexos AH-ligantes e as possíveis interações existentes.



Assim, para avaliar os diferentes processos de interações que ocorrem no complexo macromolécula-ligante é necessária a utilização de diferentes técnicas. Existe uma grande variedade de técnicas que possibilita monitorar a interação entre as espécies (MOCZ & ROSS, 2013), desta forma, para o presente estudo foram selecionadas técnicas com notória aplicação neste campo do conhecimento, sendo capazes de avaliar qualitativamente e quantitativamente sobre o processo de interação macromolécula ligante (SIRAJUDDIN et al., 2013) as quais são: a espectroscopia de fluorescência molecular, espectroscopia de absorção no UV-vis e ressonância magnética nuclear.

1.4.2 Técnicas utilizadas para avaliação da interação

As técnicas espectroscópicas de emissão de fluorescência, absorbância (UV-vis), ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e infravermelho com transformada de Fourier por transmissão (FTIR) têm sido aplicadas, nas últimas décadas, para caracterizar, diferenciar e classificar a matéria orgânica natural (DICKI et al., 2008; AZEVEDO & NOZAKI, 2008). Essas técnicas também podem ser utilizadas quando o alvo dos estudos é avaliar o processo de interação quanto a formação de complexos supramoleculares.

1.4.2.1 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência molecular destaca-se por ser uma técnica importante na análise de grandes quantidades de amostras, devido à sua rapidez, custo-benefício, não-destrutividade e quantidade de informação possíveis de fornecer. Em geral, de forma simplista, o fenômeno de fluorescência deriva de transições eletrônicas de moléculas que possuem elevado número de conjugações. Genericamente, esse efeito ocorre quando um fluoróforo (molécula fluorescente) é excitado por um fóton, passando para o estado de maior energia e, ao retornar para o estado fundamental, libera energia em um comprimento de onda diferente daquele utilizado no processo de excitação (LYRA, 2017). As SH possuem diversos fluoróforos em sua macroestrutura, cuja característica fluorescente contém informações de natureza estrutural, grupos funcionais, conformação, grau de heterogeneidade e características dinâmicas moleculares. (SILVA et al., 1997; GIU et al., 2013).

Devido as suas características e simplicidade a espectroscopia de fluorescência pode ser considerada uma ferramenta universal para o estudo de interações macromolécula-ligante (SILVA et al., 1997). Essa técnica pode ser utilizada para avaliar diferentes aspectos como intensidade de emissão de fluorescência, perfil dos espectros de excitação e emissão, rendimento quântico e outros fenômenos eletrônicos. Deve-se considerar a associação de algumas dessas características para a análise de complexos macromolécula-ligante e para a determinação de constantes de ligação (MOCZ & ROSS, 2013). Em estudos de interação, normalmente se utiliza titulações espectrofluorimétricas afim de se obter informações acerca do processo de interação tais como mecanismo de *quenching*, valor das constantes de interação, sítios preferenciais de ligação, parâmetros termodinâmicos e tipo de forças intermoleculares preferenciais (ZHAO et al., 2014).

1.4.2.2 Espectroscopia de absorção (UV-vis)

A espectroscopia de absorção no UV-vis é a mais simples entre as técnicas utilizadas na análise das interações macromolécula-ligante, ela permite o monitoramento da formação do complexo supramolecular e monitorar alterações originadas durante o processo de interação (SALDANHA et al., 1999).

Estudos de interações podem ser realizados com base técnica em função das variações das propriedades espectrais durante o processo de absorção de radiação eletromagnética pela macromolécula, ligante ou complexo, uma vez que, possibilita avaliação de sistemas conjugados, e assim, permite que grupos característicos possam ser reconhecidos em sistema de complexidade bastante variável (SILVA, 2016).

1.4.2.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais empregadas para caracterização estrutural de moléculas e macromoléculas, além da avaliação da formação de complexos entre macromoléculas e diferentes ligantes, mesmo sendo considerada uma técnica pouco sensível. A capacidade da espectroscopia de RMN para caracterizar alguns sistemas é única entre os métodos espectroscópicos disponíveis, e por exemplo, pode fornecer informações sobre a função biológica de muitas moléculas (SHEKHTMAN & BURZ, 2012).

Diferente das técnicas aplicadas para avaliar o processo de interação, as quais de forma geral, exploram as mudanças ou variação nas propriedades espectroscópicas da macromolécula, a ressonância magnética nuclear monitorar o processo de interação sob a perspectiva do ligante, ou seja, comparar o comportamento do ligante com base no perfil espectral no estado livre e complexado. Dentre os parâmetros observados, o mais típico e simples de ser analisado é o deslocamento químico. As perturbações no ambiente químico dos núcleos (^1H , por exemplo) monitorados do ligante na ausência e presença da macromolécula consiste na estratégia utilizada para localizar a região do ligante onde ocorrem preferencialmente as interações, neste caso, se determina o epítipo da molécula (BEDARD et al., 2014; SILVA, 2017).

1.5 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO PROPOSTO

A vida humana depende das diferentes funções desempenhadas pelo solo. Neste sentido, alguns estudos relatam que, excrementos e lodo de esgoto são utilizados como adubo, contém resíduos de antibióticos e aditivos utilizados em animais, contudo não foram totalmente metabolizados, sendo liberados na urina e nas fezes. Esse processo de adubação consiste numa das principais vias de disseminação desses compostos no ambiente. Uma vez no ambiente, os resíduos de antibióticos e aditivos podem acumular no solo, modificar a microbiota, sofrer lixiviação ou, ainda, ser transportados, via escoamento superficial, para nascentes de rios e lagos. Além disso, alguns desses resíduos no solo podem ser absorvidos e se acumular nos tecidos vegetais, devido sua introdução via cadeia alimentar, resultando em risco à saúde humana (REGITANO & LEAL, 2010). Diante disso, faz-se necessário uma atenção maior para essa temática. Por isso, estudos que investigam o comportamento da MO frente diferentes espécies contaminantes são de extrema importância, principalmente no intuito desse trabalho de avaliar a interação dos principais constituintes da MO com espécies de elevado impacto ambiental e para saúde, no caso a SQX e RX.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a interação entre a substância húmica do solo com antibiótico (SQX) e composto orgânico de arsênio(V) (RX) empregando técnicas espectroscópicas em condições ambientais simuladas

2.2 Específicos

- a) Avaliar parâmetros de ligação (constante de Stern-Volmer, constante de ligação, estequiometria) e termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) por espectroscopia de fluorescência molecular para ambos os ligantes com a frações da matéria orgânica;
- b) Confirmar a formação do complexo SH-ligante e o processo de *quenching* envolvido por UV-vis;
- c) Avaliar a influência da força iônica no processo de interação para a SQX e RX;
- d) Avaliar mudanças estruturais na SH devido ao processo de interação empregando fluorescência tridimensional e sincronizada;
- e) Verificar possíveis competidores no processo de interação da SH com os ligantes;
- f) Avaliar o possível epítipo dos ligantes SQX e RX no processo de interação com a SH por RMN de ^1H ;
- g) Monitorar a influência do RX na atividade da fosfatase alcalina.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e preparo das soluções

A substância húmica e ácido húmico utilizados neste trabalho são provenientes da turfa, os quais foram extraídos conforme procedimentos preconizados pela *International Humic Substances Society* e caracterizados por BOTERO, 2010. Todos os reagentes utilizados são de pureza analítica, não sendo necessária nenhuma etapa de purificação adicional. A sulfaquinoxalina, roxarsone, Tris-HCl, KI, utilizados foram da Sigma-Aldrich (EUA), enquanto que o dimetilsulfóxido (DMSO) da Vetec (Brasil) e o Na_2HPO_4 da Dinâmica (Brasil). O tampão fosfato 10 mM (pH $5,0 \pm 0,1$ e $6,0 \pm 0,1$) foi preparado pela dissolução de 0,1419 g do sal Na_2HPO_4 em água deionizada. Para o ajuste do pH final utilizou-se HCl 1 M.

As soluções estoques de SQX e RX foram preparadas dissolvendo-se respectivamente 3,22 e 2,63 mg, em 3 mL de DMSO. Em seguida, as soluções foram diluídas as concentrações desejadas empregando-se uma solução de tampão fosfato 10 mmol L^{-1} a pH $6,0 \pm 0,1$ e pH $5,0 \pm 0,1$; respectivamente. Um estoque de SH a 100 mg L^{-1} foi dissolvida diretamente na solução tampão. As demais diluições foram realizadas até atingir a concentração pretendida.

3.2 Equipamentos utilizados

Empregou-se nas medidas espectrofluorimétricas um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) com cubetas plástico (polimetacrilato) de 10 mm de caminho óptico e um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. As medidas de pH foram realizadas empregando eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). As massas dos reagentes foram medidas em balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg. Para as medidas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) um espectrômetro de RMN Bruker 400 ($B_0 = 9,4 \text{ T}$), operando a 400,35 MHz para ^1H e equipado com sondas de 5,0 mm para detecção indireta, realizado no Laboratório de pesquisa em Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Espectroscopia de fluorescência:

Para obtenção dos espectros de emissão as soluções foram excitadas em 310 nm e os espectros registrados na faixa de 320-600 nm empregando abertura de fenda (*slit*) de 5 nm para excitação e, 10 nm para emissão. A titulação espectrofluorimétrica de todos os experimentos foi realizada com soluções de SH 20 mg L⁻¹ em tampão fosfato 10 mM (pH 5,0 e 6,0). Na titulação, empregaram-se concentrações de RX e SQX entre 5-250 µM. Para determinação dos parâmetros termodinâmicos as titulações foram realizadas em 22, 30 e 38°C. Foram utilizadas soluções de NaCl de 0,05 a 0,3 M para avaliar a influência da força iônica no processo de interação da SH com o RX e SQX. Para avaliação do grau de exposição dos fluoróforos presentes na SH na presença e ausência dos ligantes (0, 25 e 100 µM) foram realizadas titulações com KI na faixa de 0-250 mM. Os espectros de fluorescência 3D foram obtidos a partir de SH na ausência e na presença dos ligantes (125 µM). Neste ensaio, as soluções foram excitadas no intervalo de 240-500 nm e a emissão de fluorescência registrada de 250-700 nm. Enquanto que na fluorescência sincronizada se utilizou $\Delta\lambda = 18$ nm (AZEVEDO & NOZAKI, 2008). Foi avaliado o efeito da influência de alguns íons competidores na interação da RX com a SH, as espécies avaliadas foram: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Fe(II), Fe(III), Cu(II), Al(III), Cr(III), Cr(VI) e Mn(II), todos com concentração final 10 µM, exceto o Fe(III) 2,5 µM.

No ensaio de inibição da atividade enzimática da fosfatase alcalina (2,5 U mL⁻¹) pelo RX, se empregou 1 mM de MgCl₂ e 50 µM de ZnCl₂ como cofatores e 10 µM da sonda 4-MUP. As análises foram realizadas nas concentrações de 1, 10 e 100 µM para o RX e 2, 10 e 20 mg L⁻¹ para a SH. Por fim, após a mistura dos reagentes se adicionou volume suficiente de tampão 50 mM Tris.HCl à pH 9,5 para perfazer um volume final de 2 mL. Aguardou-se 60 min, e foi adicionado 500 µL de uma solução de Na₂CO₃ 0,4 M estabelecendo, para interromper a reação. Para monitorar a força da sonda fluorescente derivado de coumarina o sistema foi excitado em 364 nm.

3.3.2 Espectrometria no UV-vis

Neste estudo, foram registrados espectros usando absorbância como modo de medida para soluções de SH na concentração final de 5 e 10 mg L⁻¹. O processo de interação foi avaliados empregando soluções dos ligantes RX e SQX a concentração final 10 e 25 µM. As medidas foram realizadas na faixa de 200-500 nm.

3.3.3 Ressonância magnética nuclear

Os estudos de interação empregando a espectroscopia de RMN ^1H foram avaliados empregando como parâmetro a variação dos deslocamentos químicos (δ) dos ligantes RX e SQX na ausência e na presença da SH. Os sistemas foram avaliados mantendo-se a massa dos ligantes (0,66 mg) e variando-se a massa da SH (0,17; 0,33 e 0,66 mg), com adição de 10 μL de TMSP 2,5 mM como padrão interno e, por fim, completadas com tampão fosfato 10 mM em água deuterada (D_2O , 99,9%) para um volume final de 600 μL . Para o RX acrescentou-se no preparo da amostra 60 μL de DMSO deuterado para auxiliar na solubilização deste reagente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos de interação da sulfaquinoxalina com frações da matéria orgânica

4.1.1 Ensaios empregando fluorescência molecular

Uma das estratégias utilizadas para realizar o monitoramento do processo de interação entre a SQX e os constituintes das frações da matéria orgânica extraídas de amostras de turfa (SH e AH) foi o emprego de fluorescência molecular, visto que a SQX não fluoresce próximo a banda de emissão das SH ou AH. Para essa avaliação realizaram-se os seguintes ensaios: titulação espectrofluorimétrica no estado estacionário para determinação dos parâmetros de ligação e termodinâmicos, influência da concentração da SH e do pH do meio, alterações conformacionais baseados na fluorescência 3D e sincronizada, efeito da força iônica, ensaio com KI e estudo de competição simulando condições ambientais. Os resultados dos ensaios realizados foram avaliados com base na equação de Stern-Volmer, que mede a capacidade de supressão de fluorescência do ligante frente ao fluoróforo:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{equação (1)}$$

onde F_0 e F representam a fluorescência na ausência e presença da SQX, respectivamente; $[Q]$ a concentração molar do ligante e K_{SV} a constante de *quenching* de Stern-Volmer. A constante de ligação (K_b) pôde ser calculada a partir da equação 2:

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{equação (2)}$$

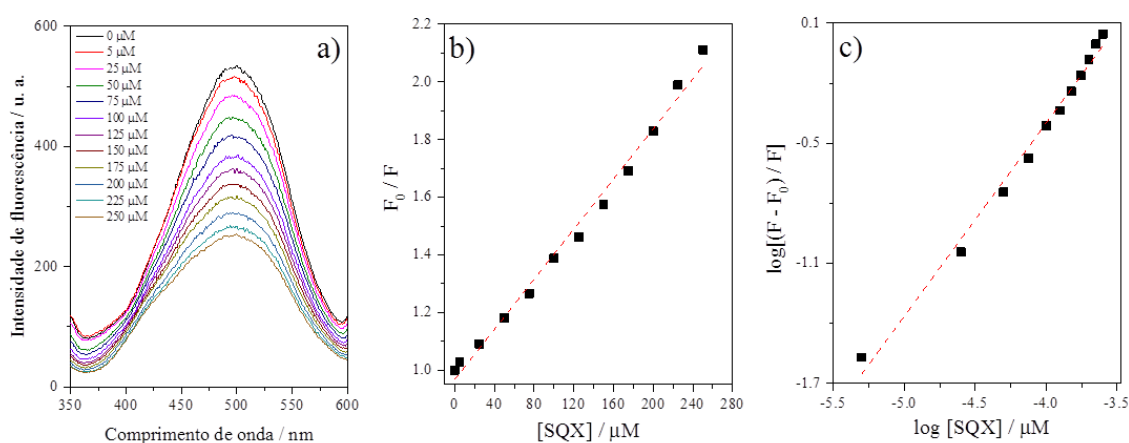
onde K_b é a constante de ligação e n o número de sítios de ligação (relação estequiométrica). Assim, com base na linearização das equações (1) e (2) pode-se determinar K_{SV} , K_b e n .

4.1.1.1 Titulação espectrofluorimétrica

As substâncias húmicas e ácidos húmicos possuem fluorescência intrínseca ($\lambda_{ex} = 310 \text{ nm} / \lambda_{em} = 497 \text{ nm}$) devido a fluoróforos presentes em sua estrutura formados durante o processo de decomposição da matéria orgânica (SENESI, 1990). O

decaimento progressivo do sinal de fluorescência da SH no processo de titulação espectrofluorimétrica, é um indício da ocorrência do processo de interação, pois parte da fluorescência da macromolécula é suprimida em função da variação da concentração de SQX no meio (Fig. 3a). As constantes associadas ao processo de *quenching* (Stern-Volmer) e ligação foram calculadas conforme as linearizações mostradas nas Fig. 3b e 3c, respectivamente.

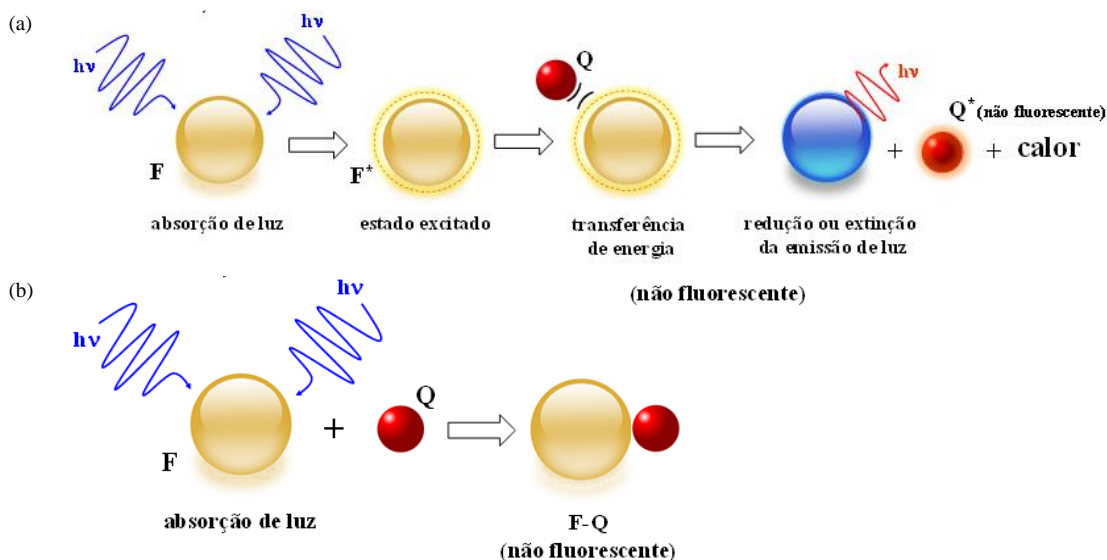
Figura 3. Resultados obtidos para avaliação da interação SH-SQX por fluorescência molecular. (a) Curva de titulação da SH (20 mg L^{-1}) com SQX (0 - 250 μM) a 30°C e pH 6; (b) Linearização da curva em função da equação 1 (K_{sv}); (c) Linearização da curva em função da equação 2 (K_b e n).



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O decaimento da fluorescência intrínseca da SH na presença de um determinado ligante é um indicativo da ocorrência de interação devido a desativação do estado excitado ou pela formação de um complexo supramolecular não fluorescente (SOARES, 2005). Uma vez que, a SQX não fluoresce, então atua como uma molécula *quencher*, a qual é capaz de suprimir a fluorescência da macromolécula, neste caso a SH (LACOWICZ, 2006). O processo de supressão de fluorescência pode ser de natureza preferencialmente estática e/ou dinâmica (Fig. 4). O *quenching* dinâmico refere-se a um processo em que o fluoróforo e o *quencher* entram em contato apenas momentaneamente durante a existência transitória do estado excitado. Em contrapartida o *quenching* estático, neste caso, refere-se à formação de um complexo supramolecular estável entre as espécies (MOLINA-BOLÍVAR, 2014).

Figura 4. Representação genérica de um sistema na presença de uma espécie que atua como *quencher*, com a representação do processo de (a) *quenching* dinâmico e (b) *quenching* estático



Fonte: Adaptado de SILVA, 2016.

Experimentalmente, determina-se a diferença entre esses dois mecanismos ao avaliar o comportamento do sistema em função da dependência da temperatura, sendo o *quenching* estático desfavorecido em temperaturas mais altas, enquanto que o dinâmico é favorecido. Assim, utiliza-se como parâmetro de avaliação a variação dos valores das constantes de Stern-Volmer em diferentes temperaturas, afim de elucidar o mecanismo de *quenching* preferencial (LI et al., 2014).

4.1.1.2 Efeito da concentração da SH e AH no processo de interação com a SQX

Baseando-se na análise dos espectros foi possível notar que quanto maior a concentração das frações da matéria orgânica maior a interação com a SQX, sendo que o ácido húmico (AH) apresentou constante de ligação da ordem de 10^4 , enquanto que a SH da ordem de 10^3 L mol^{-1} (Tabela 1). Este perfil era esperado, pois o AH é uma fração menor da matéria orgânica, sendo necessário procedimentos mais agressivos para obter este material (uso de HF, por exemplo), desta forma, é possível ter um maior número de sítios ativos disponíveis para o processo de interação com a SQX, em relação a SH. Considerando trabalhos da literatura, Acha & Rebhun (1992) encontraram valor de constante da mesma ordem de grandeza para interação do AH com o fluoranteno, enquanto que Wang et al. (2014) avaliaram a interação de uma sulfonamida com albumina do soro humano (HSA) encontrando K_b da ordem de 10^3 . Contudo, há poucos

relatos na literatura sobre a interação das frações da MO com outras espécies potencialmente contaminantes, principalmente das SH, o que limita possíveis comparações.

Tabela 1. Parâmetros de ligação entre SH e AH quanto a interação com SQX. Condições: SH (20 mg L⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6.

Concentração (mg L ⁻¹)	Fração da MO	Equação 1		Equação 2		
		K _{SV} (10 ³ L mol ⁻¹)	r	K _b (10 ³ L mol ⁻¹)	n	r
20	SH	4,50 ± 0,29	0,9814	1,83 ± 0,01	0,91 ± 0,03	0,9943
	AH	6,60 ± 0,39	0,9861	48,20 ± 0,02	1,23 ± 0,06	0,9923
10	SH	4,60 ± 0,28	0,9837	0,85 ± 0,03	0,82 ± 0,08	0,9673
	AH	5,84 ± 0,29	0,9891	6,00 ± 0,02	1,01 ± 0,04	0,9912
5	SH	3,88 ± 0,29	0,9741	0,53 ± 0,02	0,76 ± 0,06	0,9734
	AH	3,67 ± 0,27	0,9758	1,76 ± 0,04	0,94 ± 0,09	0,9621

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

No entanto, optou-se por utilizar a SH nos estudos posteriores, pois para sua obtenção empregam-se procedimentos mais brandos, sendo que esta fração da MO pode ser considerada mais representativo quanto a manutenção das características originais do solo, e assim, um sistema modelo que melhor mimetiza as condições ambientais (BALDOTTO & BALDOTTO, 2014).

4.1.1.3 Avaliação da influência do pH no processo de interação

A influência do pH no processo de interação entre a SH e a SQX foi avaliada no intervalo de 5 a 7 em escala unitária. A maior interação ocorreu em pH 5 (Tabela 2) considerando os valores de K_{SV} e K_b obtidos. Neste pH, a carga global da SH (pH_{PZC} = 5,1) como da SQX (pK_{a1} = 2,62 e pK_{a2} = 6,01) (Fig. 5a-c), são preferencialmente nulas, facilitando as interações. Em pH 6, a SQX estaria em cerca de 70% na forma nula. Assim, a carga global ser nula, não implica na ausência de cargas nas espécies, e sim, que o número de cargas positivas e negativas são iguais.

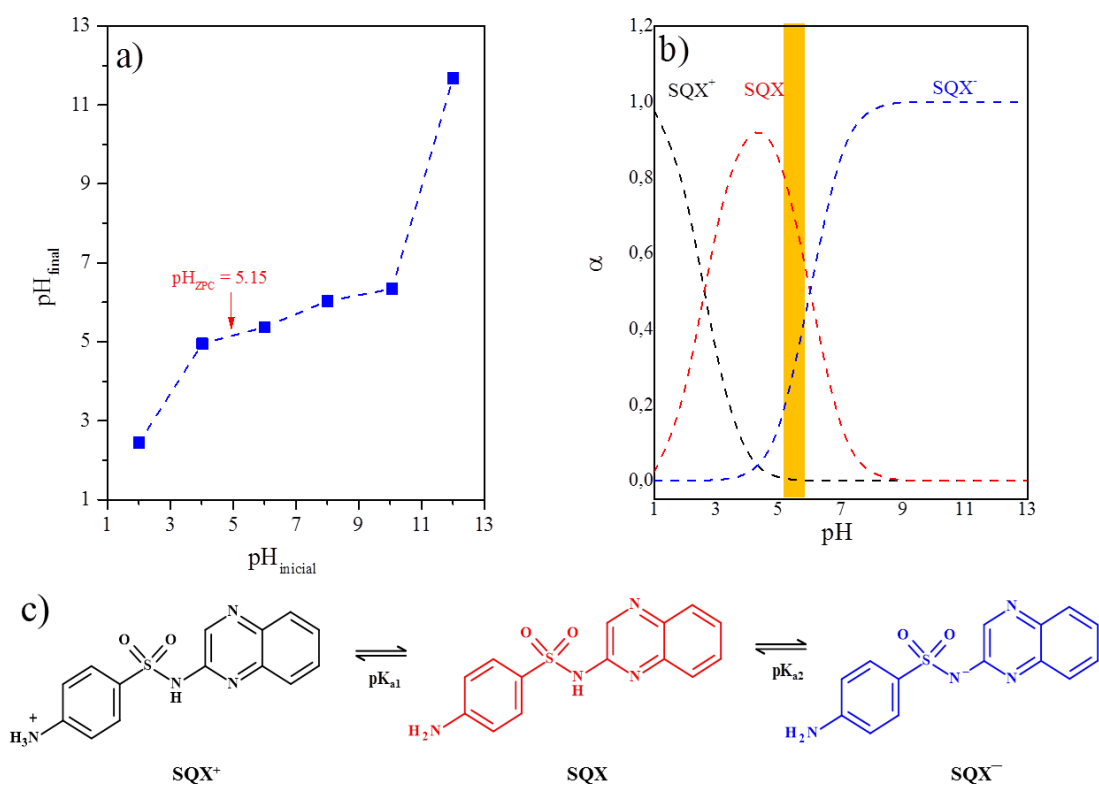
Tabela 2. Avaliação da interação entre SQX e SH em função do pH. Condições: SH (20 mg L⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6.

pH	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação		
	K _{sv} (10 ³ L mol ⁻¹)	r	K _b (10 ³ L mol ⁻¹)	n	r
5	8,60 ± 0,30	0,9936	2,04 ± 0,01	1,10 ± 0,03	0,9961
6	5,95 ± 0,22	0,9931	1,38 ± 0,09	1,09 ± 0,02	0,9980

7 $4,24 \pm 0,09$ 0,9974 $1,25 \pm 0,01$ $1,12 \pm 0,03$ 0,9949

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 5. (a) Avaliação do valor do pH_{PZC} (*point of zero charge*) da SH; (b) Gráfico de distribuição das espécies de SQX em função do pH. A faixa em amarelo indica o pH = 6, no qual as avaliações foram efetuadas e (c) Representação do equilíbrio ácido-base da SQX em meio aquoso.



Fonte: Elaborado por Lyra, 2017.

Neste sentido, visando simular melhor as condições do solo, cuja faixa de pH ideal para o cultivo, de forma geral, varia entre 5,5 a 6,5 (ALVAREZ et al., 2007), empregou-se pH 6 nos experimentos futuros, além do valor da constante de interação nesta condição, possuir uma magnitude intermediária.

4.1.1.4 Avaliação dos parâmetros termodinâmicos

Uma vez que a capacidade calorífica do sistema não se altera em função da variação da temperatura do meio, é possível determinar os parâmetros termodinâmicos aplicando a equação de van't Hoff. Assim, a titulação espectrofluorimétrica foi realizada em diferentes temperaturas e, a partir da utilização das equações 3 e 4 foi possível calcular os valores de ΔH , ΔS e ΔG (Tabela 3).

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{equação (3)}$$

T é a temperatura do sistema em Kelvin (K), e R é a constante universal do gás ideal. A energia livre de Gibbs foi obtida usando a seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{equação (4)}$$

De acordo com a Tabela 3, se observou redução nos valores de K_{SV} com o aumento da temperatura, indicando que o tipo de *quenching* associado ao processo de supressão de fluorescência é estático, ou seja, ocorre formação de complexo supramolecular no estado fundamental com a macromolécula e do ligante (MOREIRA et al., 2015).

Tabela 3. Parâmetros de ligação e termodinâmicos para o sistema SH e SQX. Condições: SH (20 mg L⁻¹), SQX (0 – 250 μM), a 30°C e pH 6.

T(°C)	Parâmetros de ligação					Parâmetros termodinâmicos		
	K_{SV} (10 ³ L mol ⁻¹)	r	K_b (10 ³ L mol ⁻¹)	r	n	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)
22	4,23 ± 0,10	0,9965	2,67 ± 0,01	0,9964	0,95 ± 0,03			- 19,53
30	3,99 ± 0,11	0,9955	2,97 ± 0,01	0,9941	0,97 ± 0,03	+9,32	+97,8	- 20,31
38	3,68 ± 0,11	0,9955	3,26 ± 0,01	0,9931	0,99 ± 0,03			- 21,09

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Além disto, se verificou que o processo de interação foi espontâneo ($\Delta G < 0$), e que o valor do K_b aumenta com a temperatura, sugerindo que a associação SH-SQX torna-se favorável em temperatura mais elevadas. Com base nos valores de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) verificou que a SH e a SQX interagem predominantemente por forças hidrofóbicas ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$) (SILVA et al., 2014). Os parâmetros termodinâmicos ΔH e ΔS fornecem uma maneira de entender quais as forças preferenciais (e não exclusivas) estão presentes na formação de um complexo. A entropia de um sistema indica o grau de organização do mesmo, ou seja, quanto maior o valor de ΔS maior o número de microestados que permitam a dissipação da energia do sistema, característico de interações hidrofóbicas (ARAÚJO et al., 2015). Visto que, quando duas moléculas apolares entram em contato, ocorre uma desordem parcial das moléculas de água (na esfera de solvatação), permitindo assim a interação ligante-receptor por meio do ganho entrópico associado à desorganização do sistema. Enquanto a entalpia indica a quantidade de energia na forma de calor, fornecida ou cedida ao sistema no decorrer das reações. De forma, geral, nos processos de interações hidrofóbicas tem-se uma reação endotérmica, pois o sistema precisa absorver energia para expulsar as moléculas de água do meio, e desta forma, ocorre alocação do ligante (ROSS & SUBRAMANIAN, 1981). Assim, pode-se afirmar que nas condições

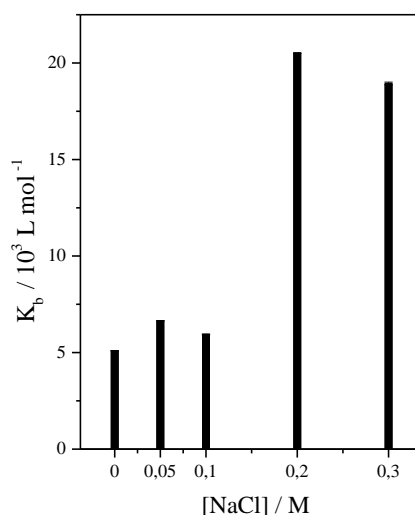
experimentas utilizadas (pH 6), com a SH e SQX com as cargas preferencialmente nulas, contribuíram para que a formação do complexo SH-SQX fosse entropicamente favorável.

4.1.1.5 Avaliação do efeito da força iônica no processo de interação

As espécies iônicas podem interagir com diversas macromoléculas com variado grau de afinidade. Por isso objetivando examinar a influência nas forças de interação existentes, realizou-se a avaliação da força iônica, a fim de avaliar se existem um componente iônico no processo de interação (OTZEN, 2002).

Verificou-se um aumento na constante de ligação de ~69%, após aumento da concentração de NaCl (0,05 a 0,3 mol L⁻¹) no meio (Fig. 6). O perfil obtido, indica que o tipo de interação existente entre a SH e a SQX não sofre interferência negativa com a presença dos íons no meio, e que, a presença destes facilitou o processo de interação.

Figura 6. Avaliação do efeito da força iônica na interação do complexo SH-SQX. Condições: SH (20 mg L⁻¹), SQX (0 – 250 μM), a 30°C e pH 6.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018

Uma vez que, o aumento da força iônica da solução conduziu a uma maior interação da SH com a SQX, é possível que além das interações hidrofóbicas, ocorreram também interações eletrostáticas. Este fato, pode estar associado a fração de ~30% da SQX⁻ (carga negativa) em pH 6 (Fig. 5b), justificando que existência também de interações eletrostáticas.

4.1.1.6 Ensaio com Iodeto de potássio (KI)

O íon iodeto é capaz de promover *quenching* dinâmico de moléculas fluorescentes em solução, porém para que isso ocorra os fluoróforos presentes na SH deve estar acessíveis aos íons I⁻ (SILVA, 2016). Desta forma, objetivando avaliar a acessibilidade dos fluoróforos presentes na SH na presença e ausência da SQX, realizou-se esse ensaio. Para tanto, os valores de K_{sv} e K_b foram os parâmetros de avaliação, os quais reduziram em função do aumento da concentração de SQX (Tabela 4).

Tabela 4. Valores das constantes na ausência e presença da SQX. Condições: SH (20 mg L⁻¹), SQX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 6.

[SQX] (µM)	Constante de Stern-Volmer	
	K _{sv} (10 ³ L mol ⁻¹)	r
0	8,21 ± 0,19	0,9980
25	7,95 ± 0,13	0,9990
100	7,16 ± 0,13	0,9989

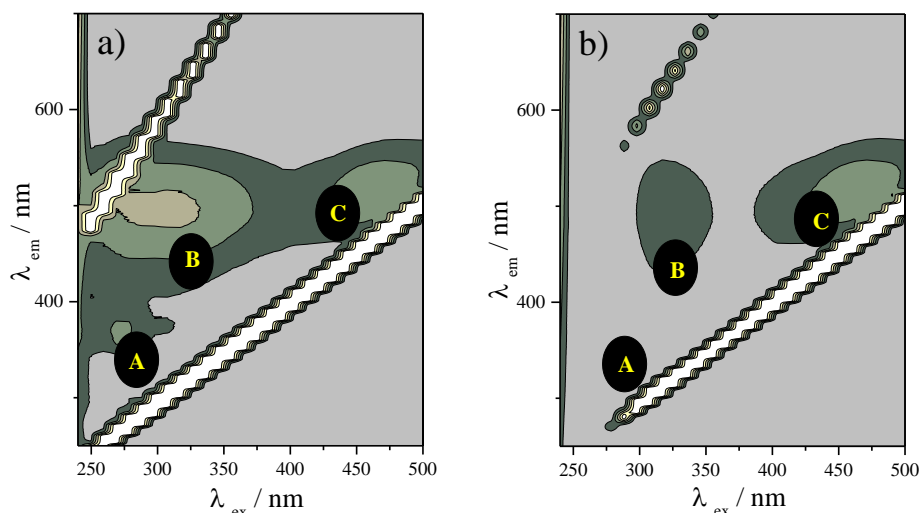
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

O valor de K_{SV} para o sistema SH e íons iodeto foi de 8,21(± 0,19)×10³L mol⁻¹, e com adição de SQX a 25 e 100 µM os valores para K_{SV} variaram de 7,95(± 0,13) a 7,16 (±0,13)×10³ L mol⁻¹ indicando que o fluoróforo da SH está menos acessível ao iodeto, ou seja, o iodeto e a SQX competem pelo mesmo sítio de ligação da SH.

4.1.1.7 Fluorescência 3D

A espectroscopia de fluorescência 3D permite caracterizar a SH quanto a sua estrutura, origem e presença de possíveis grupos funcionais existentes (PAULA et al., 2014). Essa macroestrutura apresenta vários grupos funcionais, com características hidrofílica ou hidrofóbica, o que possibilita a interação com diferentes espécies em solução, podendo sofrer mudanças conformacionais após a interação com espécies ligantes. Observou-se a existência dos picos A, B e C no espectro de fluorescência 3D (Fig. 7), sendo estes, atribuídos à região semelhante a proteínas ($\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 270 / 343$ nm), ácido fúlvico ($\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 340 / 425$ nm) e ácido húmico ($\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 420 / 441$ nm), respectivamente (WEI et al., 2016).

Figura 7. Gráfico de fluorescência 3D, (a) SH (20 mg L^{-1}) e do (b) do complexo SH-SQX a 30°C e pH 6. A [SQX] utilizada foi de $125 \mu\text{M}$.



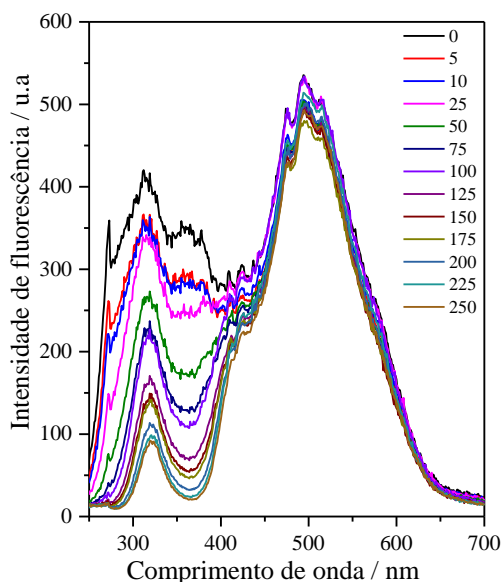
Fonte: Elaborado pela autora, 2018

Mudanças na estrutura da SH nativa foram evidenciadas a partir desse ensaio, devido maior variação ($\sim 40\%$) da banda referente à fração de ácido húmico presente na macroestrutura da substância húmica. Com base nos espectros observa-se também que há grande diferença entre os cromóforos que emitem fluorescência referente aos AF e AH (AZEVEDO & NOZAKI, 2008).

4.1.1.8 Fluorescência sincronizada

Este estudo tem como finalidade identificar os principais grupos funcionais presentes na SH que atuam como fluoróforos. De acordo com a literatura o pico entre $270\text{-}310 \text{ nm}$ é considerado como semelhante a proteínas (triptofano e tirosina) ou proveniente da emissão de fluorescência de compostos monoaromáticos, o de $310\text{-}370 \text{ nm}$ está relacionado a dois anéis aromáticos condensados, de $370\text{-}400 \text{ nm}$ está associado ao ácido fúlvico, enquanto que em 470 nm ou mais, ao ácido húmico (Fig. 8). Neste experimento foi usado $\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$ (FERRARI e MINGAZZINI, 1995; AZEVEDO & NOZAKI, 2008).

Figura 8. Espectro de fluorescência sincronizada da SH (20 mg L^{-1}) na presença de diferentes concentrações de SQX ($0 - 250 \mu\text{M}$) utilizando $\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$, a 30°C e pH 6.



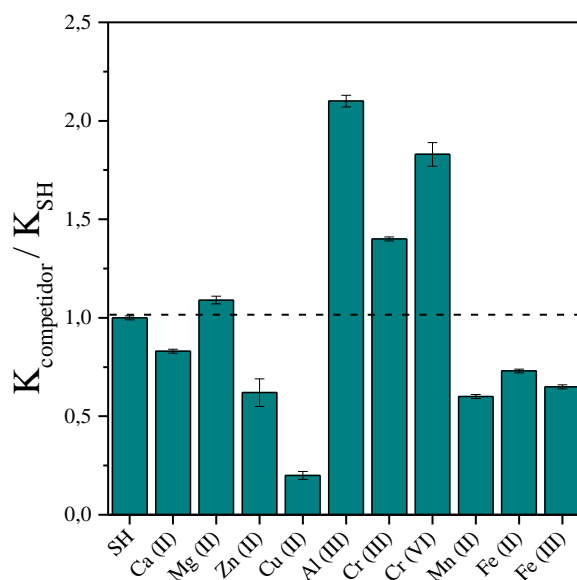
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

No ensaio da fluorescência sincronizada permite obter informações mudanças quanto ao microambiente próximo ao fluoróforo após interação com o ligante. De acordo com o resultado obtido (Fig. 8) pode-se inferir que o processo de interação ocorreu preferencialmente na região semelhante às proteínas. Além disso, se observa que a banda de maior intensidade é atribuída ao ácido húmico, indicando assim, que na composição da SH avaliada é formada em sua maior parte por essa fração da MO.

4.1.1.9 Avaliação do efeito de espécies competidoras

Devido aos grupos funcionais presentes em sua macroestrutura, as SH possuem um caráter polieletrólítico, atuando como agente complexante de diversos íons metálicos (ROCHA & ROSA, 2003). Desta forma foram avaliados os seguintes íons competidores a 10 μM : Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II), Al(III), Cr(III), Cr(VI), Mn(II), Fe(II) e Fe (III) visto que estes cátions e ânions podem ser encontrados em águas e solos. Este estudo foi realizado comparando-se os valores da constante de ligação na ausência (K_{SH}) e presença dos íons competidores ($K_{\text{competidor}}$) (Fig. 9). Assim, quando a razão $K_{\text{competidor}} / K_{\text{SH}} > 1$, então o processo de interação foi favorecido, e o contrário ocorre quando $K_{\text{competidor}} / K_{\text{SH}} < 1$.

Figura 9. Razão entre as constantes de ligação na presença e na ausência de diferentes competidores iônicos.



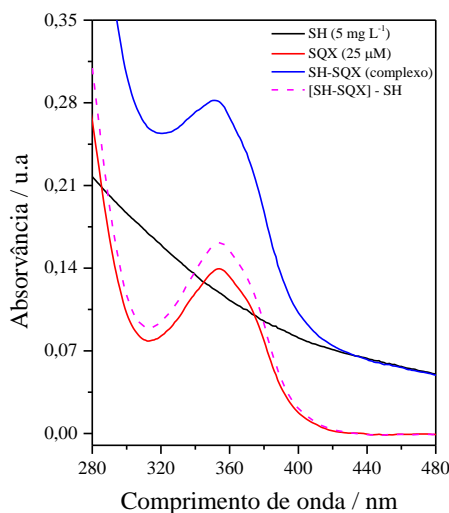
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Desta forma, notou-se que todos, exceto Ca(II) e Mg(II) influenciaram de forma significativa na formação do complexo, possivelmente pela alteração da conformação da SH quando associada a esses íons ou formação de complexos com a SQX, ou seja, um aumento no valor de K_b na presença do íon pode ser um indicativo de que o mesmo ao interagir com a SH altera a sua conformação favorecendo o processo de interação, enquanto a redução do K_b sugere a competição entre o íon e a SQX pelo mesmo sítio de ligação da SH (LYRA, 2017).

4.1.2 Avaliação da interação por espectroscopia de absorção no UV-vis

Este ensaio tem como intuito explorar mudanças estruturais na macromolécula e avaliar a formação de complexo. O espectro de absorção de uma macromolécula é sensível ao microambiente que envolve os cromóforos. Além disto, é possível verificar se houve formação do complexo no estado fundamental (Fig. 10), visando corroborar os resultados do mecanismo de *quenching* obtidos por fluorescência molecular. A SQX apresentou uma banda com máximo de absorção em 354 nm, relativo a transições $n \rightarrow \pi^*$. Devido à formação do complexo SH-SQX ($\lambda_{\text{máx}} = 351 \text{ nm}$) houve um deslocamento hipsocrômico, isto é, deslocamento para uma energia de transição mais alta, e assim, máximo de absorção em comprimento de onda menor (PAVIA et al, 2010).

Figura 10. Espectro de absorção no UV-vis dos sistemas SH, SQX e SH-SQX em 30°C e pH 6.



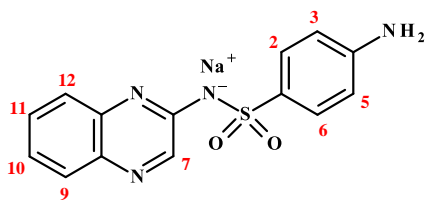
Fonte: Elaborado pela autora 2018.

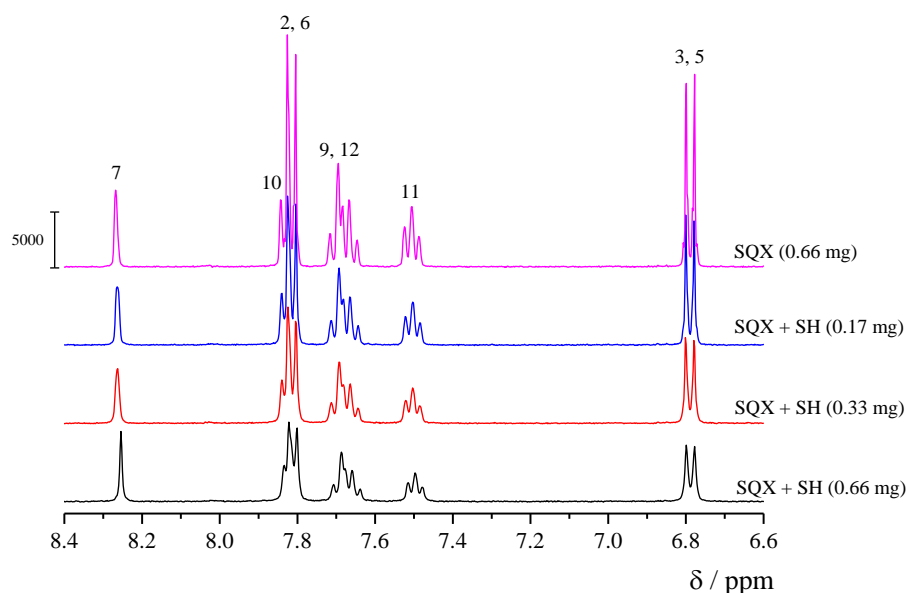
A formação do complexo SH-SQX foi sustentada pelos dados espectrais obtidos devido à alteração da intensidade de absorvância da SQX ($A_{SQX} = 0,139$), resultante da adição de SH à sua solução. O fato de $\Delta A = A_{SH-SQX} - (A_{SQX} + A_{SH}) = 0,022$; ser diferente de zero, indica que a formação do complexo ocorre efetivamente no estado fundamental, isto é, que o processo de *quenching* é estático (MOLINA-BOLÍVAR, 2014). Caso o *quenching* fosse dinâmico não seriam observadas mudanças no espectro de absorvância. Este resultado juntamente com os estudos de variação de temperatura realizados por fluorescência molecular é concordantes com o tipo de *quenching* sugerido.

4.1.3 Ressonância magnética nuclear (RMN 1H)

O estudo por RMN 1H (Fig. 11) possibilita o monitoramento do processo de interação sob a perspectiva do ligante, ou seja, a partir da comparação dos parâmetros dos espectros do SQX livre e ligado à macromolécula. Com a utilização dessa técnica é possível mensurar, em alguns casos, a região de interação do ligante com a SH a partir da variação de deslocamento químico de cada hidrogênio.

Figura 11. Espectro de RMN 1H da SQX na presença de diferentes proporções de SH.





Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

De acordo com os resultados obtidos observou-se maior variação no deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos 2, 6 e 7; e em seguida os hidrogênios de 9-12 (Tabela 5) da SQX após a interação com a SH em pH 6 a 22°C. Logo a região próxima a estes hidrogênios foi mais influenciada no processo de interação.

Tabela 5. Valores de deslocamento químico para SQX na presença de diferentes proporções de SH a 30°C e pH 6.

Hidrogênio	δ / ppm				$\Delta\delta^1$
	SQX	SQX:SH (m/m)			
		1:4	1:2	1:1	
2, 6	7,781	7,812	7,811	7,808	+ 0,027
3, 5	6,789	6,789	6,789	6,789	+ 0,000
7	8,254	8,262	8,264	8,268	+ 0,014
9, 12	7,685	7,681	7,680	7,677	+ 0,008
10	7,843	7,841	7,840	7,836	- 0,007
11	7,507	7,502	7,503	7,497	- 0,010

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Este resultado constitui um indicativo de que as interações ocorrem preferencialmente na região próxima a esses hidrogênios, sendo concordantes com regiões que podem apresentar processos de interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas.

4.2 Estudos de interação do roxarsone (RX) com substâncias húmicas do solo

4.2.1 Estudos empregando fluorescência molecular

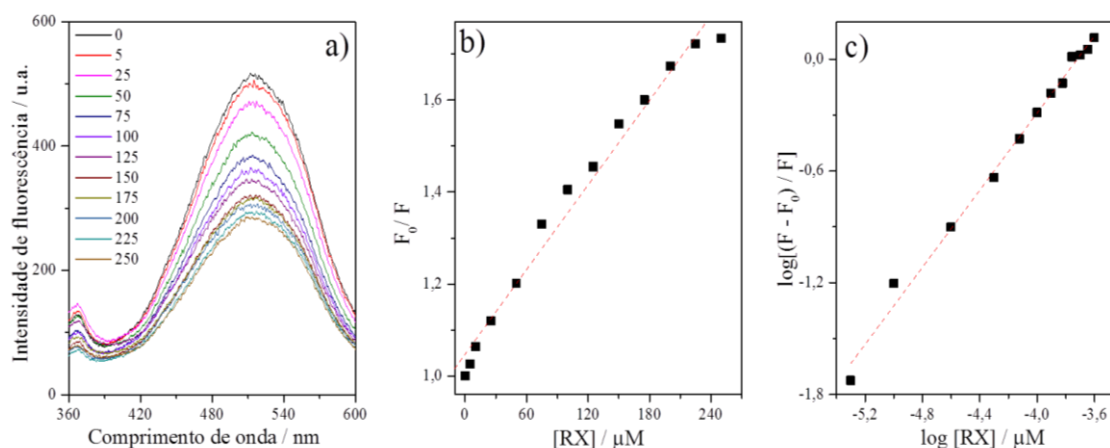
O RX não apresenta banda de emissão próximo a da SH, logo pôde-se avaliar o processo de interação entre essas espécies empregando fluorescência molecular, considerando que a intensidade de emissão e perfil espectral da SH seja alterado na presença do ligante. Para tanto, foram avaliados os mesmos parâmetros descritos anteriormente em relação ao sistema SH e SQX, assim como, empregou-se as mesmas equações para calcular os parâmetros de ligação e termodinâmicos.

4.2.1.1 Titulação espectrofluorimétrica para avaliar a interação entre a SH e RX

Para avaliar o processo de interação entre a SH e o RX realizou-se uma titulação espectrofluorimétrica, mantendo-se constante a concentração da SH e adicionando-se quantidades crescentes do ligante em estudo (Fig. 12a). No processo de titulação, foi observado que ao se adicionar quantidades crescentes do RX houve diminuição do sinal analítico relativo a intensidade de fluorescência da SH na forma livre. O perfil obtido é indicativo que houve interação (SILVA, 2017), e que o RX funciona como uma molécula *quencher*, isto é, uma espécie capaz de inibir a fluorescência do fluoróforo (nesse caso a SH). A capacidade de supressão de fluorescência do ligante frente ao fluoróforo é medido considerando a constante de Stern Volmer, descrita anteriormente. Assim, a partir da linearização dos dados espectrais (Fig. 12a), calculou-se os valores de K_{sv} (Fig. 12b), K_b e n (Fig. 12c).

O processo de redução da intensidade de fluorescência pode ocorrer de diferentes formas, preferencialmente o *quenching* estático ou dinâmico. Como já descrito, o processo associado ao *quenching* dinâmico está limitado ao fluoróforo no estado excitado, ocorrendo choque com o ligante que o desativa. Em contrapartida o *quenching* estático refere-se à formação de um complexo estável no estado fundamental (SILVA, 2016), o não apresenta as mesmas propriedades espectroscópicas da SH ou do RX livres.

Figura 12. Resultados obtidos para avaliação da interação SH-RX por fluorescência molecular. (a) Curva de titulação da SH (20 mg L⁻¹) com RX (0 - 250 μM) a 30°C e pH 5; (b) Linearização da curva em função da equação 1 (K_{sv}); (c) Linearização da curva em função da equação 2 (K_b e n).



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Os processos descritos, podem ser avaliados e distinguidos pela sua dependência com a temperatura, onde em temperaturas mais altas o *quenching* estático é desfavorecido e o dinâmico é favorecido. Assim, utiliza-se como parâmetro de avaliação os valores da constante de Stern-Volmer em diferentes temperaturas para propor o mecanismo de *quenching* preferencial (MOREIRA et al, 2014).

4.2.1.2 Influência do pH e concentração da SH na formação do complexo SH-RX

O efeito do pH foi avaliado na formação do complexo entre SH e RX simulando as condições ambientais. Assim, a influência do pH no meio foi avaliada no intervalo de de 5 a 7 em escala unitária, utilizando-se o tampão fosfato a 10 mM. Em pH 7, não foi observada variação espectral quanto a intensidade de fluorescência da SH na presença do RX, indicando que o processo de interação nesta condição não era favorecido. Logo, nesta condição os parâmetros de ligação não foram calculados, portanto a Tabela 6 apresenta os valores de K_{SV}, K_b e n apenas para pH 5 e 6.

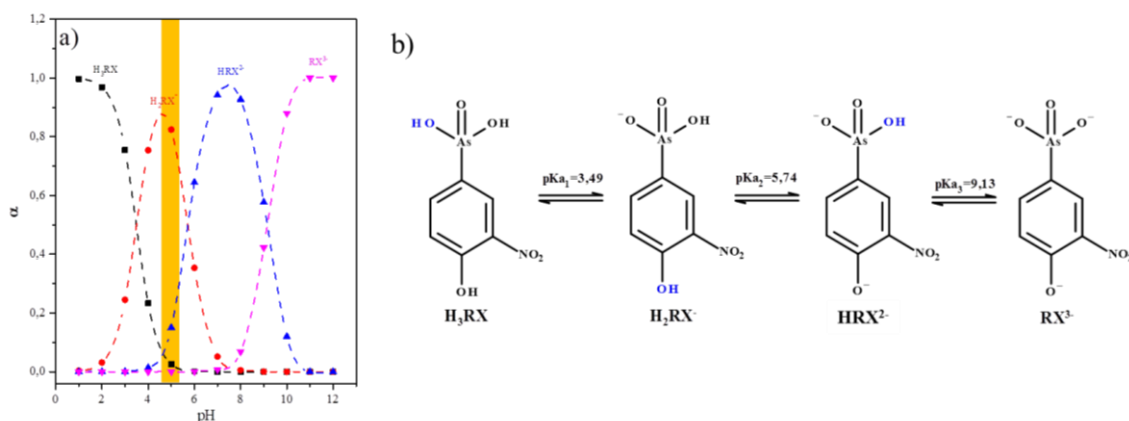
Tabela 6. Avaliação da interação entre RX e SH em função do pH. Condições: SH (20 mg L⁻¹), SQX (0 – 250 μM), a 30°C e pH 6.

pH	Constante de Stern-Volmer		Parâmetros de ligação		
	K _{SV} (10 ³ L mol ⁻¹)	r	K _b (10 ³ L mol ⁻¹)	n	r
5	3,18 ± 0,09	0,9952	1,20 ± 0,01	0,89 ± 0,04	0,9871
6	1,15 ± 0,07	0,9816	0,37 ± 0,02	0,94 ± 0,05	0,9857

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A maior interação ocorreu em pH 5 (Tabela 6). Neste valor de pH a carga global da SH está próximo ao valor do $pH_{PZC} = 5,1$; condição de concentração hidrogeniônica onde a carga global seria nula (Fig. 5a). O ligante RX atua como ácido fraco triprótico (H_3RX , $pK_{a1} = 3,49$; $pK_{a2} = 5,74$ e $pK_{a3} = 9,13$), e de acordo com o gráfico de distribuição de espécies em função do pH (Fig. 13a), em pH 5 o ligante deve estar preferencialmente negativo, sendo uma mistura de H_2RX^- (em maior proporção) e HRX^{2-} , o que deve facilitar a interação entre as espécies. Neste sentido, o pH 5 foi selecionado para os estudos posteriores.

Figura 13. (a) Gráfico de distribuição das espécies de RX em função do pH. A faixa em amarelo indica o pH = 5, no qual as avaliações foram efetuadas e (b) Representação do equilíbrio ácido-base da SQX em meio aquoso.



Fonte: Elaborado por SILVA, 2017

Em seguida, foi realizada a avaliação da concentração da macromolécula, neste caso a SH a 10 e 20 $mg L^{-1}$ em pH 5, onde os valores de K_b foram $3,18(\pm 0,09)$ e $2,66(\pm 0,19)\times 10^3 L mol^{-1}$, respectivamente. O aumento da concentração da SH conduziu a um maior valor da constante de ligação com o RX. Desta maneira, manteve-se a concentração da SH em 20 $mg L^{-1}$ neste estudo. Apesar desse comportamento, concentrações superiores a 20 $mg L^{-1}$ não foram avaliadas devido a um possível efeito de filtro, o que poderia levar a erros nas medidas espectroscópicas realizadas.

4.2.1.3 Parâmetros termodinâmicos associados ao processo de interação SH-RX

A titulação espectrofluorimétrica realizada em diferentes temperaturas do sistema contendo a SH e RX permitiu inferir que o tipo de *quenching* preferencial associado ao processo de supressão de fluorescência da SH na presença do RX é

estático, devido à redução nos valores de K_{SV} com o aumento da temperatura (Tabela 7), indicando que o complexo supramolecular formado foi no estado fundamental.

Tabela 7. Parâmetros de ligação e termodinâmicos para o sistema SH e RX. Condições: SH (20 mg L⁻¹), RX (0 – 250 µM), a 30°C e pH 5.

T(°C)	Parâmetros de ligação					Parâmetros termodinâmicos		
	K_{SV} (10 ³ L mol ⁻¹)	r	K_b (10 ³ L mol ⁻¹)	r	n	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)
22	3,06 ± 0,11	0,9895	0,86 ± 0,08	0,9968	0,84 ± 0,02			- 16,65
30	2,86 ± 0,13	0,9879	0,77 ± 0,18	0,9869	0,83 ± 0,04	- 19,52	- 9,73	- 16,58
38	2,51 ± 0,10	0,9912	0,57 ± 0,12	0,9935	0,81 ± 0,03			- 16,50

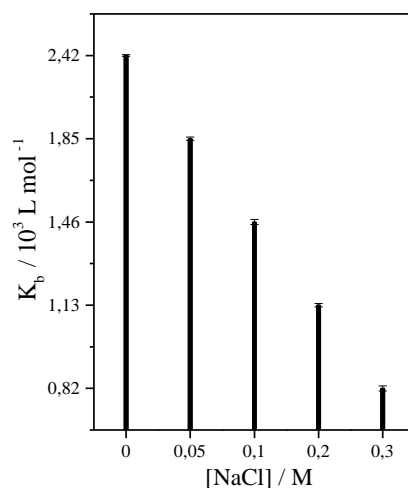
Fonte: Elaborado pela autora, 2018

A partir dos valores obtidos foi possível observar que o processo de interação foi espontâneo ($\Delta G < 0$) e que, o RX interage predominantemente por forças de van der Waals e ligações de hidrogênio ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$) com a SH (MALTAS, 2014), ou seja, as moléculas do ligante estão mais organizadas devido às ligações serem mais estáveis, havendo liberação de energia por causa da estabilidade dessas ligações (processo exotérmico). Baseado nisso, podemos afirmar que a formação do complexo SH-RX foi entalpicamente favorável (DOTTO et al., 2011).

4.2.1.4 Avaliação da força iônica na estabilidade do complexo SH-RX

Uma vez que o RX apresenta carga no pH do estudo, o efeito da força iônica foi avaliado, visto que, as espécies iônicas presentes no meio podem alterar a afinidade do ligante com a macromolécula, e desta forma, este estudo contribui na elucidação do mecanismo de interações existentes (OTZEN, 2002). Os resultados para avaliação da força iônica são mostrados na Fig. 14.

Figura 14. Avaliação do efeito da força iônica na interação do complexo SH-RX. Condições: SH (20 mg L⁻¹), RX (0 – 250 μM), a 30°C e pH 5.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018

Neste estudo, observou-se uma redução na constante de ligação (K_b) significativa, após a adição de quantidades crescentes de NaCl (0,05 a 0,3 mol L⁻¹) no meio (Fig. 14). Apesar do estudo anterior indicar que as forças de van der Waals e ligações de hidrogênio serem majoritárias, há uma parcela de forças eletrostáticas existentes nessas interações, ou seja, a presença dos íons dificulta a interação, observando-se assim uma redução na constante de ligação (LIANG et al., 2008).

4.2.1.5 Ensaio com iodeto de potássio

O íon iodeto é capaz de promover supressão da fluorescência de fluoróforos em solução, na condicional deste estar acessível (ROCHA & CAETANO, 2014). Desta forma, se avaliou a acessibilidade do sítio do fluoróforo da SH ao íon iodeto na presença e ausência do RX. De acordo com a Tabela 8, pôde-se observar que o valor de K_{SV} reduziu na presença do RX para concentração de 25 μM, contudo, aumentou para concentração de 100 μM, sendo similar ao valor na ausência do ligante. Este perfil indica que a presença do RX não altera a acessibilidade do fluoróforo na estrutura da SH.

Tabela 8. Valores das constantes na ausência e presença da RX. Condições: SH (20 mg L⁻¹), RX (0 – 250 μM), a 30°C e pH 5.

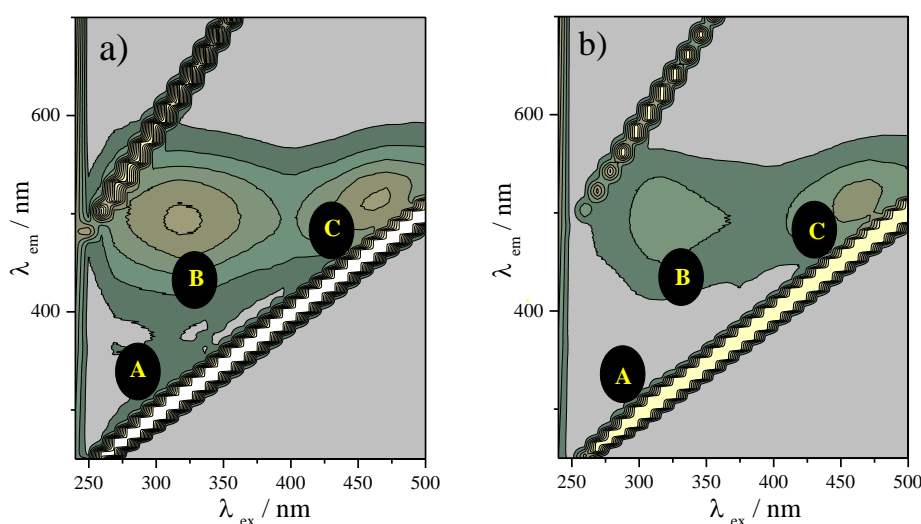
[RX] (μM)	Constante de Stern-Volmer	
	K _{sv} (10 ³ L mol ⁻¹)	r
0	6,28 ± 0,14	0,9981
25	5,99 ± 0,09	0,9991
100	6,31 ± 0,10	0,9990

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

4.2.1.6 Estudos por fluorescência 3D

A espectroscopia de fluorescência 3D foi utilizada para obter informações quanto à estrutura, origem e presença de possíveis grupos funcionais existentes na SH (PAULA et al., 2014). Essa macromolécula apresenta vários grupos funcionais, com características hidrofílica ou hidrofóbica, o que permite a interação com diferentes espécies em solução. Dessa forma, os resultados obtidos por fluorescência 3D (Fig. 15) podem ser utilizados para avaliar possíveis mudanças estruturais nas bandas referentes composição similar a proteínas, ácido húmico e ácido fúlvico (regiões A, B e C, respectivamente).

Figura 15. Gráfico de fluorescência 3D, (a) SH (20 mg L⁻¹) e do (b) do complexo SH-RX a 30°C e pH 5. A [RX] utilizada foi de 125 μM.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

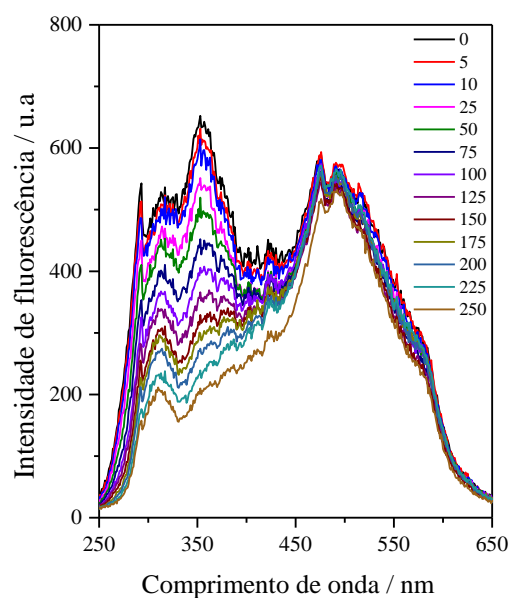
Nos espectros apresentados na Fig. 15 são observadas a existência dos picos A, B e C, atribuídos à região semelhante a proteínas ($\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 270 / 343$ nm), ácido

húmico ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 340 / 425 \text{ nm}$) e ácido fúlvico ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 420 / 441 \text{ nm}$), respectivamente (WEI et al., 2016). Foram verificadas mudanças na estrutura da SH nativa por meio deste desse ensaio em decorrência do processo de interação, devido a redução (~30%) na banda referente à fração de ácido húmico presente na macroestrutura da substância húmica. O resultado da variação desses picos serve para identificar a região da SH onde mais ocorrem as alterações conformacionais devido ao processo de interação.

4.2.1.7 Fluorescência sincronizada

A aplicação de fluorescência sincronizada tem como intuito identificar os grupos ou frações presentes na SH com base nos picos obtidos nos espectros de varredura sincronizada (Fig. 16). Como já mencionado, os picos entre 270-310 nm são associados sistemas similares a proteínas ou compostos monoaromáticos, o pico de 310-370 nm está relacionado a anéis aromáticos condensados, de 370-400 nm ao ácido fúlvico enquanto que partir de 470 nm ao ácido húmico (SANTOS, 2009). Neste estudo, foi aplicado $\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$ para avaliação dos diferentes sistemas descritos acima (AZEVEDO & NOZAKI, 2008).

Figura 16. Espectro de fluorescência sincronizada da SH (20 mg L^{-1}) na presença de diferentes concentrações de RX ($0 - 250 \mu\text{M}$) utilizando $\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$, a 30°C e pH 5.



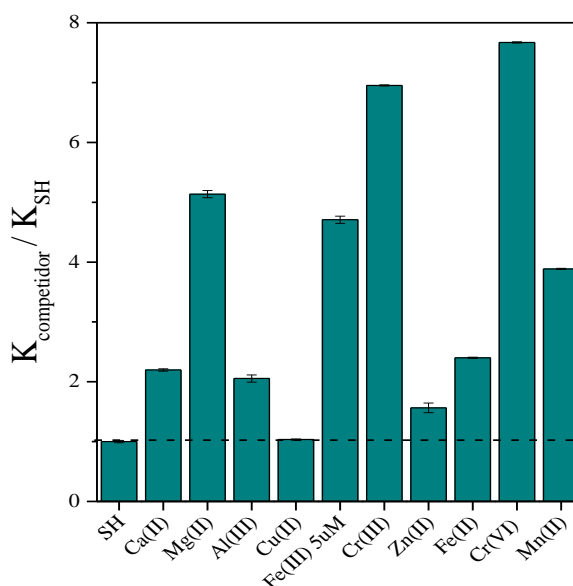
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Com base na análise dos espectros ocorreu maior deslocamento espectral na região semelhante às proteínas, sinalizando que a SH apresenta grupos similares a esta macromolécula em sua composição (FERRARI e MINGAZZINI, 1995).

4.2.1.8 Avaliação do efeito de espécies competidoras

As SH possuem diferentes grupos funcionais e desta forma, atuam como agente complexante de diversos íons metálicos, devido aos distintos grupos funcionais presentes em sua macroestrutura. Desta forma foram avaliados os seguintes íons competidores: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II), Al(III), Cr(III), Cr(VI), Mn(II), Fe(II) e Fe(III) visto que estes podem estar presentes em águas e solos. Neste estudo, todas as espécies foram avaliadas a 10 μ M, com exceção do Fe(III), onde se utilizou a metade desta concentração (Fig. 17). De forma similar ao estudo da SH com SQX, aqui também empregou como parâmetro de avaliação a razão entre as constantes na presença e ausência dos competidores.

Figura 17. Razão entre as constantes de ligação na presença e na ausência de diferentes competidores iônicos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

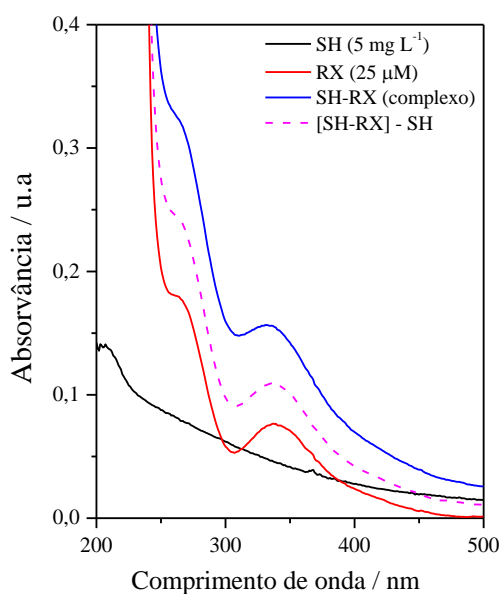
Notou-se que todos, exceto o cobre, influenciaram de forma significativa na formação do complexo, levando ao aumento da interação, possivelmente devido à alteração da conformação da macromolécula ou reações de complexação entre esses íons e o ligante, o que favorece a interação da SH com o RX. Como houve um aumento

no K_b pode-se dizer que o RX e os íons avaliados não competem pelo mesmo sítio de ligação da SH.

4.2.2 Avaliação da interação por espectroscopia de absorção no UV-vis

No estudo por UV-vis se avaliou a formação do complexo entre a SH e RX. O espectro de absorção de uma macromolécula é sensível ao microambiente que envolve os grupos cromóforos. Além disto, este ensaio auxilia na classificação do mecanismo de *quenching* de fluorescência molecular, considerando que ocorra formação do complexo no estado fundamental. Como base na Fig. 18 observou-se que o RX apresentou uma banda com máximo de absorção em 337 nm, referente a transições $n \rightarrow \pi^*$ (PAVIA et al, 2010). O complexo SH-RX por sua vez apresentou banda com máximo de absorção em 331 nm, havendo um deslocamento hipsocrômico, assim como, no sistema SH-SQX.

Figura 18. Espectro de absorção no UV-vis dos sistemas SH, RX e SH-RX em 30°C e pH 5.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

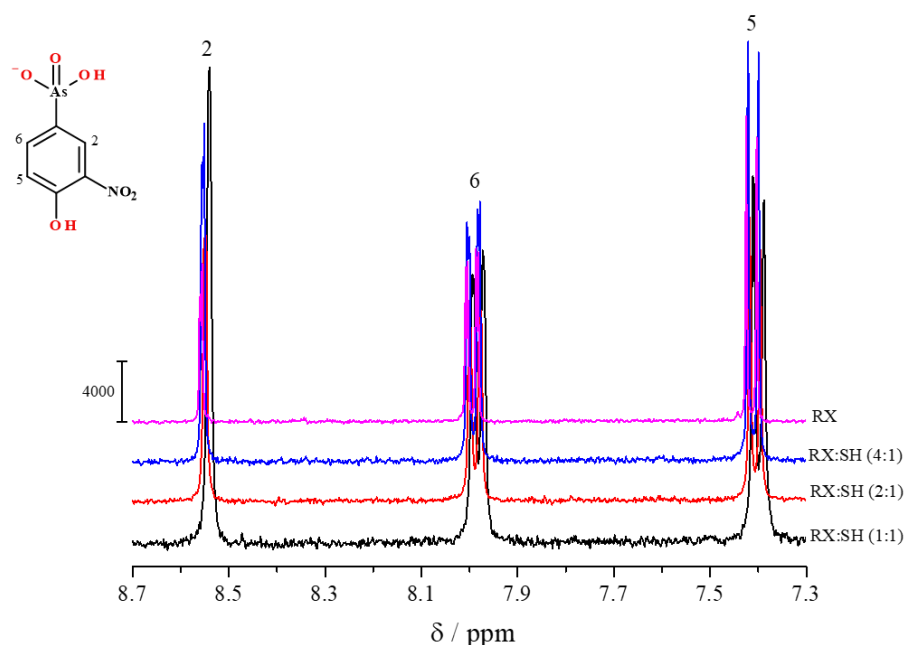
Os dados espectrais obtidos são utilizados para verificar se houve ou não formação do complexo com base nos valores de deslocamento. A formação do complexo SH-RX foi confirmada pela não sobreposição dos espectros de absorção do RX ($A_{RX} = 0,077$) com o espectro obtido pela diferença ($A = A_{SH-RX} - A_{SH} = 0,110$) indicando que o tipo de *quenching* associado ao processo é estático, pois, $\Delta A = A_{SH-RX} -$

$(A_{RX} + A_{SH}) = 0,034$ foi diferente de zero (WU et al, 2011). Baseado nisso pode-se afirmar que o complexo formado apresenta absorvidade molar maior que as espécies isoladas. Caso mudanças espectrais não fossem observadas no espectro de absorvância, seria um indicativo de *quenching* dinâmico. Este resultado juntamente com o dos parâmetros termodinâmicos corroborou para a elucidação do mecanismo de *quenching*.

4.2.3 Ressonância magnética nuclear (RMN ^1H)

Diferente dos estudos anteriores por fluorescência molecular e UV-vis onde se avaliou a SH ou SH e RX, na RMN se avalia o efeito que a macromolécula pode produzir no ligante. E desta forma, monitorar, quando possível, a partir da variação de deslocamento químico de cada hidrogênio a região do ligante (epítipo) que preferencialmente interage. A Fig. 19 e Tabela 10 apresentam os dados referente a este estudo.

Figura 19. Espectro de RMN ^1H do RX na presença de diferentes proporções de SH.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

De acordo com os resultados que todos os hidrogênios aromáticos do RX apresentaram variação de deslocamento químico similar. Este fato deve estar associado a uma interação com a molécula de forma geral, sem uma região específica e desta forma, os hidrogênios 2, 5 e 6 foram afetados no processo de interação. Logo, a região

que ocorre a interação com o RX na SH deve ser suficientemente grande para acomodar a molécula de forma organizada, e desta forma, justificando o valor negativo da entropia.

Tabela 9. Valores de deslocamento químico para RX na presença de diferentes proporções de SH a 30°C e pH 5.

Hidrogênio	δ / ppm				$\Delta\delta^1$
	RX	RX:SH / proporção em massa			
		4:1	2:1	1:1	
2	8,555	8,551	8,546	8,540	- 0.015
5	7,413	7,409	7,406	7,399	- 0.014
6	7,996	7,992	7,989	7,982	- 0.014

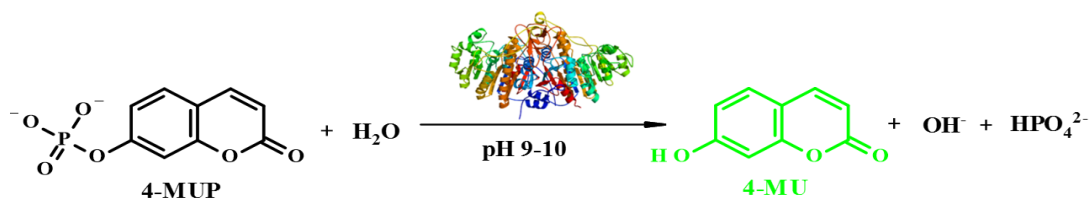
¹O valor de $\Delta\delta$ foi calculado com base na diferença entre $\delta(\text{RX:SH} = 1)$ e $\delta(\text{RX})$.

Fonte: Elaborado pela autora 2018

4.2.4 Inibição da fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma hidrolase também presente nos solos que remove grupos fosfato de moléculas orgânicas, além de nucleotídeos, proteínas e alcaloides (PERTILE, 2011). O arsênio(V) inorgânico é um inibidor competitivo desta enzima (SHIRAZI et al., 1981). Assim, com intuito de avaliar a influência do RX, um composto orgânico de arsênio(V) e do complexo SH-RX, avaliou-se a atividade enzimática utilizando a fosfatase alcalina como modelo biológico. Desta forma, realizou-se o ensaio de inibição na presença dos possíveis inibidores, monitorando a formação de uma espécie fluorescente (sonda, 4-MU) após a ação a enzima em um derivado fosfatado (4-MUP) (Fig. 20).

Figura 20. Reação que ocorre durante a fosfatase alcalina

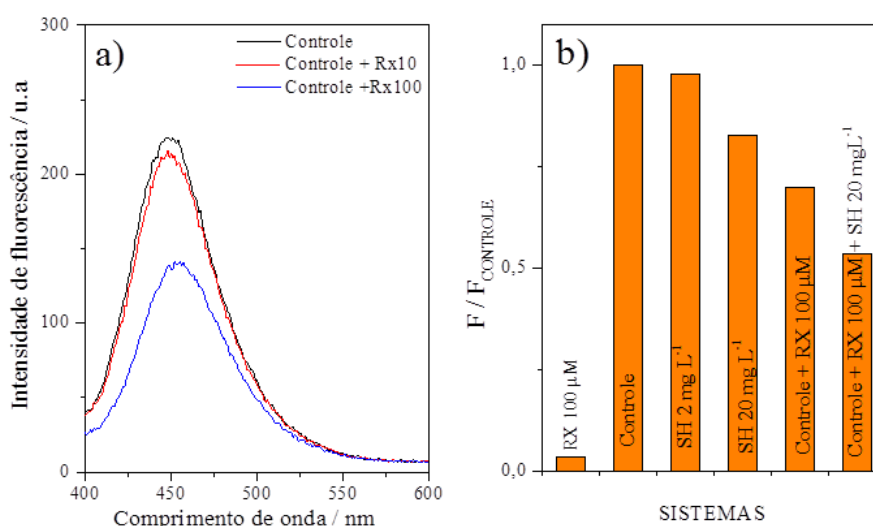


Fonte: Elaborado por SILVA, 2017.

Visto que essa a atuação desta da fosfatase ocorre naturalmente em solos, e que, o arseniato, é um inibidor competitivo desta enzima, faz-se necessário avaliar a influência do composto em estudo nesse processo na ausência e na presença da SH (Fig. 21). Com base na análise da Fig. 21a, observa-se que uma pequena redução da atividade

enzimática com a adição de RX a 10 μM , porém com o aumento da concentração para 100 μM , houve uma redução de $\sim 40\%$ da atividade da enzima. Pela Fig. 21b comportamento similar foi observado, onde apenas a SH com maior concentração apresentou redução significativa da atividade ($\sim 17\%$). O sistema ao qual foi adicionado RX e SH foi apresentou maior redução cerca de 46%.

Figura 21. Resultados da inibição da fosfatase alcalina. a) Avaliação da inibição frente o RX (10 e 100 μM); b) Avaliação da atividade enzimática em diferentes sistemas SH (2 e 20 mg L^{-1}) em 30°C e pH 9,5. F_{controle} é a fluorescência na ausência e F na presença dos possíveis inibidores RX, SH e RX-SH.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Com base nos resultados obtidos foi possível observar que tanto RX (100 μM) inibe mais efetivamente a enzima, contudo, a SH (20 mg L^{-1}) e o complexo SH-RX também reduzem a atividade da enzima. Com base nesse resultado, a possível contaminação de RX no solo, a capacidade enzimática da fosfatase seria afetada, tanto do composto livre, quanto complexado com MO.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou os principais parâmetros associados ao processo de interação SQX, RX e SH simulando as condições ambientais. A força de interação entre a SH e os compostos analisados é intermediária (10^3). Constatou-se que o processo ocorreu por *quenching* estático. Resultado confirmado em função da formação de complexo no estado fundamental que foi obtido empregando-se UV-vis. Pelos parâmetros termodinâmicos, observou-se que os processos foram espontâneos ($\Delta G < 0$), que, as forças de interação envolvidas no processo de interação SH-SQX são hidrofóbicas ($\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$), enquanto na interação SH-RX as forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio são predominantes ($\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$), sendo verificado em ambos a existência de uma pequena parcela de interações eletrostáticas.

Os resultados adquiridos no teste com KI comprovaram que no processo de interação SH-SQX o iodeto compete pelo mesmo sítio de ligação da SH devido à redução no K_{SV} com a adição de SQX, porém foi inconclusivo para saber a disponibilidade do fluoróforo na presença da SH para o sistema SH-RX. A avaliação dos íons metálicos indicou que os mesmos quando associados ao complexo interferem no processo de interação, podendo-se conjecturar a partir desse resultado um possível comportamento de um solo contaminado na absorção de micronutrientes. E baseando-se no comportamento da fosfatase alcalina na presença das espécies avaliadas pode-se fazer uma correspondência entre a quantidade de matéria orgânica, contaminante e atividade enzimática em determinados solos. Portanto, tendo em vista o entendimento do comportamento desses contaminantes no meio onde estão inseridos, pode-se empregar os resultados deste estudo para o entendimento dos processos que ocorrem no solo, e quando possível, auxiliar na recuperação de ambientes contaminados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, C.; REBHUN, M. Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effects on adsorption and transport in the aquatic environment. **Water research**, Israel, v. 26, n. 12, p. 1645-1654, dez. 1992.

AGUIAR, E. P. C. A importância da matéria orgânica do solo. Web Artigos. 24 mai. 2011. Disponível em: <<https://www.webartigos.com/artigos/a-importancia-da-materia-organica-do-solo/66938>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

AIKEN, G.; COSTARIS, E., Soil and hydrology: their effect on NOM. **J Am Water Works Assoc.** 87, 36-45, 1995.

ALMEIDA, J.M.C. Distribuição de contaminantes orgânicos em solos calcários – influência dos minerais de argila. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Geotécnica e Geoambiente) – Curso e Pós-graduação em Engenharia Geotécnica, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto.

ALVAREZ V. V. H.; ROSCOE, R.; KURIHARA, C. H.; PEREIRA, N. F. Enxofre. In: Fertilidade do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 596-644.

ARAÚJO, U. P.; JÚNIOR, P. F. S.; GOMES, A. F. Desafiando a interdisciplinaridade na ciência administrativa: o caso da entropia. **Caderno EBAPE.BR**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 664-686, out./dez. 2015.

AREND, K. Substâncias húmicas e formas de cobre em solos de áreas de videira. 2010. Tese (Mestrado em Ciência do Solo) – Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

AZEVEDO, J. C.; NOZAKI, J., Análise de fluorescência de substâncias húmicas extraídas da água, solo e sedimento da lagoa dos patos - MS. **Química Nova**, 31(6), 1324-1329, 2008.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista ceres**, Viçosa, v. 61, p. 856-881, dez. 2014.

BAYSE, G. S. et al.. Permeation of roxarsone and its metabolites increases caco-2 cell proliferation. **Advances in Biological Chemistry**, v.3, p. 389-396, jul.,2013.

BEDARD, M. et al. Characterization of binding between 17 β -estradiol and estriol with humic acid via NMR and biochemical analysis. **Biophysical chemistry**, Estados Unidos, v. 189, n. 1, p. 1-7, fev. 2014.

- BERTONCINI, E. I. Tratamento de efluentes e reúso da água no meio agrícola. **Revista tecnologia & inovação agropecuária**, São paulo, v.01, n.01, p.152-169, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br>>. Acesso em: 26 jan. 2018.
- BEZERRA, P. S. S.; TAKIYAMA, L. R.; BEZERRA, C. W. B.. Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: modelagem e aplicação em sistemas reais. **Acta amazonica**, Maranhão, v. 39, n. 3, p. 639-648, 2003.
- BOTERO, W. G. et al. Caracterização de lodo gerado em estações de tratamento de água: perspectivas de aplicação agrícola. **Química nova**, São paulo, v. 32, n. 8, p. 2018-2022, Set. 2014.
- BOTERO, W. G. et al. Influência das substâncias húmicas de sedimentos na biodisponibilidade de metais para o sistema aquático. **Química nova**, Pará, v. 37, n. 6, p. 943-949, Jun. 2014.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA nº 420, de 28 de Dezembro de 2009 – In: Resoluções 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 06 Jun. 2018.
- CASTRO, L. H. et al. Estudo dos componentes químicos da turfa. In: VII Encontro Latino Americano de Pós Graduação, 2007, São José dos Campos. Revista Univap - Edição especial. São José dos Campos: Univap, 2007. p. 198-200.
- DICKI, D. P. et al.. Estudo comparativo da matéria orgânica de diferentes classes de solos de altitude do sul do brasil por técnicas convencionais e espectroscópicas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, n.6, Dez. 2008.
- DOTTO, G. L. et al. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Química nova**, Rio grande, v. 32, n. 7, p. 1193-1199, mai. 2011.
- DONGMEI, C. et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of four organoarsenic compounds in the feeds of swine and chicken. **Journal of Chromatography B**, 879, 2011.
- FERRARI, G.; MINGAZZINI, M. (1995). Synchronous fluorescence spectra of dissolved organic matter of algalorigin in marine coastal waters. Marine Ecology Progress Series, 125, p.305–315.
- FRANCHI, J. G.; SÍGOLO, J. B.; LIMA, J. R. B. Turfa utilizada na recuperação ambiental de áreas mineradas: metodologia para avaliação laboratorial. **Revista brasileira de geociências**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 255-262, set. 2003.

- GARBARINO, J. R. et al. Environmental fate of roxarsone in poultry litter. i. degradation of roxarsone during composting. **Environmental science & technology**, Manhattan, v. 37, n. 8, p. 1509-1514, mar. 2003.
- GUO, X. et al. Detection of dissolved organic matter in saline-alkali soils using synchronous fluorescence spectroscopy and principal component analysis. **Spectrochimica acta part a: molecular and biomolecular spectroscopy**, China, v. 104, n. 35, p. 280-286, mar. 2013.
- HAYES, M. H. B.; CLAPP, C. E. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structures and environmental influences. **Soil Sci.**, v. 166, n. 11, p. 723-737, 2001.
- HOFF, R.; KIST, T.B.L. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis, **J. Sep. Sci.**, Brasil, v. 32. p. 854-866, Dez., 2009.
- HU, X.; LI, H. Force spectroscopy studies on protein-ligand interactions: a single protein mechanics perspective. **FEBS letters**, Holanda, v. 588, p. 3613-3620. Out., 2014.
- KLAVINS, M.; PURMALIS, O.; RODINOV, V. Peat humic acid properties and factors influencing their variability in a temperate bog ecosystem. **Estonian journal of ecology**, Letônia, v. 62, n. 1, p. 35-52, nov. 2012.
- KULIKOWSKA, D. et al.. Humic substances from sewage sludge compost as washing agent effectively remove Cu and Cd from soil. **Chemosphere**, Poland, 136, 42-49, 2015.
- LACOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3 ed. Baltimore: Springer, 2006.
- LAMIM, A. P. B.; JORDÃO, C. P.; PEREIRA, J. L.; BELLATO, C. R. Caracterização química e física de turfa litorânea e avaliação da adsorção competitiva por cobre e zinco. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 18-23, 2001.
- LANDONI, M.F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The veterinary journal**, Argentina, v. 205, p. 21-27, jun./set. 2015.
- LEI, G. et al.. Effect of basicity on coagulation performance of polyferric chloride applied in eutrophicated raw water. **Desalination**, 247, 518-529, 2008.
- LI, J. et al. Spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of jatrorrhizine with human serum albumin (hsa). **Spectrochimica acta part a: molecular and biomolecular spectroscopy**, China, v. 118, n. 8, p. 48-54, jan. 2014.
- LIANG, J.; CHENG, Y.; HAN, H. Study on the interaction between bovine serum albumin and CdTe quantum dots with spectroscopic techniques. **Journal of molecular structure**, China, v. 892, n. 3, p. 116-120, mai. 2008.

- LYRA, A.C.F. Avaliação da interação da ovalbulmina, principal alérgeno natural da clara do ovo, com sulfonamidas através de estudos espectroscópicos e de atividade biológica. 2017. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Curso e Pós-graduação em Química e biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- MALTAS, E. Binding interactions of niclosamide with serum proteins. **Journal of food and drug analysis**, Turquia, v. 22, n. 4, p. 549-555, dez. 2014.
- MOCZ, G.; ROSS, J.A. Fluorescence Techniques in Analysis of Protein-Ligand Interactions. In: WILLIAMS, M.A. & DAVITER, T. (Ed). Protein-ligands interactions- Methods and applications. 2 ed. London: Humana Press, 2013.
- MOLINA-BOLÍVAR, J. A., et al. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine sérum albumin. *Jornal of luminescence*, Espanha, v.156, p.141-149, Ago. 2014.
- MOORE, P. D. The ecology of peat-forming processes: a review. **Int. J. Coal Geol.**, v. 12, p. 89-103, 1989.
- MOREIRA, F. M. S. et al., **O ecossistema solo: Solos: tipos, suas funções no ambiente, como se formam e sua relação com o crescimento das plantas.** 1 ed. Minas Gerais: Ufla, 2013. 47-62 p.
- MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química nova**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 227-232, fev. 2015.
- OTZEN, D. E. Protein Unfolding in Detergents: Effect of Micelle Structure, Ionic Strength, pH, and Temperature. **Biophysical journal**. v. 83, p. 2219-2230, 2002.
- PAULA, B. S. et al. Espectroscopia de fluorescência em matriz excitação-emissão aplicada a ácidos húmicos extraídos de horizontes espódicos da floresta amazônica. In: Simpósio Nacional de instrumentação Agropecuária, 3., 2016, São Carlos. *Anais...* São Carlos: Embrapa, 2016.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução a espectroscopia:** Tradução da 4ª edição norte americana. 4 ed. São Paulo: Cengage learning, 2010. 365-398 p.
- PERTILE, T. Estudo do crescimento do carcinossarcoma de Walker 256 em ratos jovens e adultos , suplementados com ácido eicosapentanóico (EPA). 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia funcional e molecular) – Curso de Pós-graduação em Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- PRIMO, D. C.; MENEZES, R. S. C ; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste

brasileiro. **Scientia plena**, Pernambuco, v. 7, n. 5, p. 1-7, mai. 2011. Disponível em: <<http://www.if.ufrj.br>>. Acesso em: 06 mar. 2018.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista brasileira de ciência do solo**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 601-616, 2010.

RESNATI, G. et al.. Supramolecular interactions in the solid state. **IUCrJ**, Dinamarca, v. 2, n. 6, p. 675-690, set. 2015.

ROCHA, N. L.; CAETANO, W. Desenvolvimento e caracterização de formulações contendo Eritrosina B e seus derivados ésteres em sistemas nanoestruturados visando aplicações em Terapia Fotodinâmica. In: Encontro Anual de Iniciação Científica, 21., 2016, Londrina. *Anais...* Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2016.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas**: interação com espécies metálicas. São Paulo: Ed. UNESP, 2003. 138 p.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, p. 3096-3102, 1981.

RUTHERFORD, D. W. et al.. Environmental fate of roxarsone in poultry litter. part ii. mobility of arsenic in soils amended with poultry litter. **Environmental science & technology**, Maryland, v. 37, n. 8, p. 1515-1520, mar. 2003.

SALDANHA, T. C. B.; ARAÚJO, M. C. U.; NETO, B. B. Análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular UV-vis. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.6, dez. 1999.

SANTIAGO, J. C. C. et al. Compostos orgânicos versus inorgânicos: um estudo sobre as propriedades físico-químicas entre essas duas classes de compostos . **Enciclopédia biosfera, centro científico conhecer**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 2636, jul. 2015.

SANTOS, A.C. Caracterização de interações entre matéria orgânica natural e íons metálicos por ultrafiltração em fluxo tangencial com múltiplos estágios. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso e Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

SANTOS, T. et al.. Dissemination of antibiotic resistant enterococcus spp. and escherichia coli from wild birds of azores archipelago. **Anaerobe**, Portugal, v. 24, p. 25–31, set. 2013.

SENESI, Nicola. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions part ii. the and organic chemicals fluorescence

- spectroscopy approach . **Analytica chimica acta**, Amsterdam, v. 232, n.11, p. 77-, jan. 1990.
- SENESI, Nicola. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. **The science of the total environment**, Italy, v. 123, n. 124, p. 63-76, 1992.
- SHEKHTMAN, A.; BURZ, D. S. **Protein NMR Techniques**. 3 ed. Nova York: Humana press, 2012.
- SHIRAZI, S P; BEECHEY, R B; BUTTERWORTH, P J. The use of potent inhibitors of alkaline phosphatase to investigate the role of the enzyme in intestinal transport of inorganic phosphate.. **Biochemical journal**, Cidade, v. 194, n. 3, p. 803–809., mar. 1981.
- SILVA, J. C. E. et al.. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO_2^{2+} . **Talanta**, Portugal, v. 45, p. 1155–1165, jul. 1997.
- SILVA, M. M. Interação entre compostos biologicamente ativos e ctDNA (Calf Thymus): Uma abordagem espectroscópicas. 2016. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Curso e Pós-graduação em Química e biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- SILVA, I. M. Interação in vitro entre compostos orgânicos de arsênio(V) e proteína carreadora empregando técnicas espectroscópicas. 2017. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Curso e Pós-graduação em Química e biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- SILVA, R. E. et al. Interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascórbico. **Química nova**, Maringá, v. 37, n. 10, p. 1633-1638, ago. 2014.
- SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug–dna interactions and their study by uv–visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of photochemistry and photobiology b: biology**, Pakistan, v. 124, n. 1, p. 1-19, jul. 2013.
- SOARES, D. Estudo da interação entre porfirinase e melanina sintética. 2005. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso e Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo, São paulo.
- SOUZA, S. O. et al., Evaluation of different fractions of the organic matter of peat on tetracycline retention in environmental conditions: in vitro studies. **J soils sediments**, Brazil, 16, 1764-1775, 2016.
- STEHLICKOVA, J.; SVAB, M.; WIMMEROVA, L.; KOZLER, J. Intensification of phenol biodegradation by humic substances. **Int. Biodet. Biodegr.**, v. 63, p. 923-927, 2009.

- STEVENSON, F. J. Cycles of soil. Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients. New York: John Wiley, 1985. 380 p.
- SUSZCZYNSKI, E. F. Turfa – o novo combustível nacional. **Energia – Fontes Alternativas**, v. 20, n. 4, p. 6-61, 1982.
- VARSHEY, D. B. et al.. Supramolecular interactions. In: STEED, W & GALE, P. A (Ed). Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomateriais. 1 ed. Hoboken: Wiley, 2012.
- VIANA, D. B. Avaliação de riscos ambientais em áreas contaminadas: uma proposta metodológica. 2010. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) – Curso e Programa de Pós-graduação em Engenharia em Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- WANG, Q.; ZHANG, S.; XIAOHUI, J. Investigation of interaction of antibacterial drug sulfamethoxazole with human serum albumin by molecular modeling and multi-spectroscopic method. **Spectrochimica acta part a: molecular and biomolecular spectroscopy**, China, v. 124, n. 24, p. 84-90, abr. 2014.
- WEI, D. et al. A fluorescence approach to assess the production of soluble microbial products from aerobic granular sludge under the stress of 2,4-dichlorophenol. Scientific reports, China, v. 11, n. 624444, p. 1-7, abr. 2016.
- WU, X., et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to human serum albumin at subdomain IIA. **Spectrochimica Acta Parte A**, China, v.79, p. 1202-1209, Abr., 2011.
- YEL, E.; AHMETLI, G. Enviromental dilemma of humic substances: being absorbents and being carcinogens. **International Journal of Evironmental Science and Developments**, v. 6, n. 1, p. 73- 76, 2015
- ZANDONADI, D. B. et al.. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 14-20, jan./mar. 2014.
- ZHAO, T., et al.. In vitro studies on the bahavior of salmeterol xinafoate and its interaction with calf thymus DNA by multi-spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomoecular Spectroscopy**, China, v. 132, p. 198-204, Mai., 2014.