

A UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA NO ESTUDO DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA NAS ÁGUAS NATURAIS: EVOLUÇÃO E PERSPECTIVAS

M. M. de Souza Sierra e M. Giovanela

Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Universitário - 88040-900 - Florianópolis - SC

O. F. X. Donard e C. Belin

Laboratoire de Photophysique et Photochimie Moléculaire - Université de Bordeaux I, 351 Cours de la Libération - 33400 Talence - França

Recebido em 28/6/95; aceito em 26/10/95

THE UTILISATION OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF DISSOLVED ORGANIC MATTER IN NATURAL WATERS: EVOLUTION AND PERSPECTIVES. Dissolved organic matter (DOM) in natural waters, has a fundamental contribution to the global carbon budget and plays an important role in major biogeochemical process such as complexation of metals and photochemical reactions. Part of this material fluoresces when irradiated with ultraviolet light and this property has been widely used to study biogeochemical cycles involving DOM. More or less 80% of this material are represented by humic substances. These compounds exhibit optical properties and are responsible for most of observed fluorescence. In this review we present the main information published in the last years concerning the utilisation of fluorescence as a tracer for DOM and humic compounds. A brief view of the basic principles of fluorescence is also presented.

Keywords: DOM; fluorescence; humic compounds.

1. INTRODUÇÃO

As águas naturais constituem um dos grandes reservatórios de carbono orgânico e inorgânico do planeta. A matéria orgânica aí presente na forma dissolvida (MOD) e particulada (MOP) tem um papel essencial na química e na biologia destas águas. Este material representa uma fonte de energia para os invertebrados, um substrato energético para algas e alimento para a comunidade bentônica. Ele pode ainda interagir com diferentes metais formando complexos organometálicos, tornando-os mais ou menos solúveis e modificando sua biodisponibilidade.

A MOD nas águas naturais apresenta propriedades óticas. Parte deste material absorve radiação luminosa e a reemite parcialmente sob a forma de fluorescência. Os compostos húmicos representam de 70 a 85% da matéria orgânica dissolvida nos sistemas aquáticos sendo, portanto, os principais responsáveis por este fenômeno¹⁻³. A matéria dissolvida fluorescente representa aproximadamente 70% da matéria orgânica dissolvida nas águas costeiras^{4,5}.

Kalle^{6,7} foi pioneiro na utilização da fluorescência como uma sonda para o estudo do comportamento e destino da fração fluorescente do carbono orgânico dissolvido (COD). Nos primeiros trabalhos, a fluorescência foi quase sempre utilizada como um parâmetro quantitativo. Mais recentemente, a aplicação de técnicas cada vez mais avançadas (*espectros corrigidos de emissão e de excitação*⁸, *espectros de excitação/emissão sincronizados*⁹, *matrizes tridimensionais de excitação/emissão*¹⁰ e *fluorescência induzida por raios laser*¹¹) tem possibilitado a utilização de parâmetros qualitativos (*posição de máxima emissão, bandas dos espectros de excitação e sincronizados e medidas do rendimento quântico*) no estudo e mapeamento da MOD fluorescente nos sistemas aquáticos.

A identificação dos fluoróforos responsáveis pela fluorescência das águas naturais resta, apesar de tudo, difícil. Em todo caso, sabe-se que as propriedades de fluorescência destes compostos são dependentes de um grande número de parâmetros, como sua origem⁸, massa molar¹², concentração¹³, e, ainda do pH^{13,14}, da força iônica¹³, da temperatura e do potencial redox do meio. O estudo das relações entre as propriedades de fluorescência e estes

parâmetros pode, portanto, fornecer informações indiretas sobre as características moleculares e a química geral destes compostos.

Neste trabalho fizemos um levantamento dos principais resultados obtidos nos últimos anos concernentes à aplicação da fluorescência no estudo das propriedades da matéria orgânica dissolvida nos sistemas aquáticos. Uma breve revisão nos princípios básicos da fluorescência também é apresentada.

2. A ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Em condições normais a maior parte das moléculas se encontra no nível energético vibracional mais baixo do estado eletrônico S_0 (estado fundamental). A absorção de um quantum de luz promove a passagem dos elétrons a níveis superiores de energia. Durante o retorno ao estado fundamental, uma parte da energia absorvida é reemitida, sendo este fenômeno conhecido como *luminescência*. Se a energia é reemitida à partir do primeiro estado singlete excitado (S_1), o fenômeno corresponde à *fluorescência*¹⁵. A fluorescência corresponde, em princípio, ao processo inverso do fenômeno da absorção, uma vez que se produz sempre pela emissão de energia à partir do nível mais baixo do primeiro estado singlete excitado.

A fluorescência de um composto depende da sua estrutura molecular e está quase sempre associada ao sistema eletrônico π ¹⁶. Os elétrons envolvidos numa ligação σ estão, geralmente, fortemente ligados à molécula sendo necessário fornecer mais energia para levar estes elétrons a ocuparem um orbital molecular vazio. Assim, os espectros eletrônicos produzidos por transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ se situam nas zonas de comprimentos de ondas mais curtos do espectro eletromagnético. Os elétrons π , ao contrário, estão mais livres que os elétrons σ . O espectro de emissão correspondente se situa na região de comprimentos de onda mais longos¹².

Entre os fatores externos passíveis de influenciar a emissão de fluorescência, estão a *temperatura*, os *efeitos dos substituintes* e o *solvente*. Um aumento da temperatura se traduz por um aumento da probabilidade de colisões no estado excitado aumentando as conversões internas e, em consequência, uma diminuição da eficácia de fluorescência. No que concerne aos

substituintes, os grupos doadores de elétrons aumentam a eficácia de emissão de fluorescência enquanto que os retiradores de elétrons reduzem a intensidade de fluorescência.^{15,17} As interações soluto-solvente podem também afetar de maneira significativa o sinal de fluorescência por processos complexos. O grau de perturbação depende do pH, da solvatação, da possibilidade de formar ligações de hidrogênio, da viscosidade, da força iônica e da polaridade do solvente, entre outros.

Existem ainda perturbações do espectro de emissão de fluorescência que são devidas a fenômenos de difusão da luz: a difusão **Rayleigh**, a difusão **Tyndall** e a difusão **Raman**. As duas primeiras são difusões do tipo “elástico”, isto é, sem mudança do comprimento de onda da luz incidente. A **Raman**, por outro lado, é uma difusão “inelástica” que se acompanha de um deslocamento do comprimento de onda. A difusão **Rayleigh** é provocada pela presença, sobre o trajeto do raio luminoso incidente, de “partículas” de tamanho muito inferior ao comprimento de onda da luz incidente, como as moléculas de água, por exemplo¹⁵. A difusão **Tyndall** é provocada por suspensões de dimensões coloidais. Enfim, a banda **Raman** provém da difusão, pelas moléculas do solvente, de uma parte da luz incidente (menos de 1%) e sua posição relativa depende da natureza das moléculas do solvente utilizado.

2.1. A Instrumentação em Fluorescência

A instrumentação para as medidas de fluorescência (Figura 1) comporta uma **fonte de luz** para excitar a amostra, um **monocromador** para selecionar o comprimento de onda de excitação, um **compartimento para a amostra**, um **segundo monocromador** para isolar e analisar a emissão fluorescente proveniente da amostra, um **fotomultiplicador** e, finalmente, um **registrador** para determinar a intensidade da emissão de fluorescência.

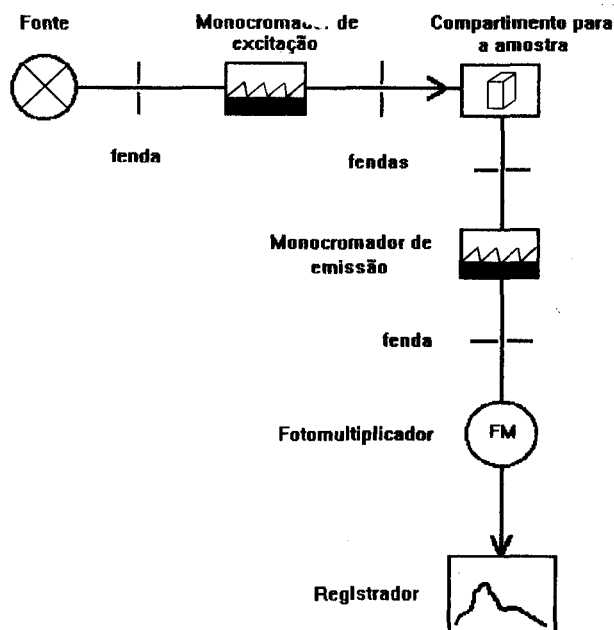


Figura 1. Principais componentes de um espectrofluorímetro.

Existem três tipos de instrumentos para as medidas de fluorescência: aqueles que trabalham com **filtros**, aqueles que trabalham com **prismas** e aqueles que utilizam **redes de difração** (diffraction grating) como monocromadores. Em geral, os filtros absorvem uma faixa de comprimentos de onda definida da luz incidente policromática e selecionam assim, a passagem de comprimentos de onda previamente escolhidos. Os prismas trabalham segundo

o princípio dos índices de refração que são diferentes segundo os comprimentos de onda. As grades de difração decompõem a excitação policromática em seus componentes, pelo princípio das interferências destrutivas e construtivas da luz.

Os monocromadores de rede de difração são os mais eficazes para delimitar a faixa de comprimentos de onda da luz incidente sobre a amostra, o que aumenta a sensibilidade das medidas.

Os instrumentos atuais mais precisos são geralmente equipados com dois monocromadores duplos para excitação e para emissão, o que minimiza os efeitos de difusão parasita.

2.2. Tipos de Espectros de Fluorescência

Três principais tipos de espectros de fluorescência podem ser obtidos para cada amostra, em função do tipo de informação desejada: o **espectro de emissão**, o **espectro de excitação** e o **espectro de excitação/emissão sincronizado**.

2.2.1. O espectro de emissão: Para registrar o *espectro de emissão* de um composto, irradia-se a amostra com um comprimento de onda de excitação fixo e mede-se a intensidade da luz reemitida, numa faixa espectral definida. O comprimento de onda de excitação ideal para registrar o espectro de emissão de um composto fluorescente determinado é, em geral, escolhido em função de seu espectro de absorção. Na maior parte dos casos, este comprimento de onda corresponde ao máximo de absorção.

2.2.2. O espectro de excitação: Para registrar o *espectro de excitação*, faz-se variar o comprimento de onda de excitação, enquanto, o comprimento de onda de observação (ou emissão) é mantido constante. O comprimento de onda de observação ideal é aquele que corresponde à posição do máximo do espectro de emissão do composto considerado. Para um composto puro, a forma do espectro de excitação corrigido deve ser similar, senão idêntica àquela de seu espectro de absorção¹⁵, e independente do comprimento de onda de observação, se todos os estados excitados produzidos pela absorção se transformam por conversão interna até o nível vibracional mais baixo do primeiro estado singlete excitado¹⁷.

2.2.3. O espectro sincronizado: Os *espectros sincronizados* são obtidos pela varredura simultânea de uma faixa espectral de comprimentos de onda de excitação e de emissão apresentando um intervalo ($\Delta\lambda$) constante entre eles¹⁸. Esta técnica tem sido utilizada para estudar misturas de fluoróforos e, em alguns casos, espectros bem estruturados puderam ser obtidos a partir de misturas para as quais, em espectrofluorimetria convencional, obtinha-se espectros com bandas sobrepostas^{18,19}. O intervalo ($\Delta\lambda$) a ser utilizado para um composto determinado é, em geral, escolhido empiricamente. Quando o espectro de excitação e o de emissão são simétricos, o melhor ($\Delta\lambda$) é aquele que representa o intervalo, expresso em comprimentos de onda, entre os máximos de excitação e de emissão¹⁹.

2.3. A Correção dos Espectros

A fluorescência é um método de análise relativamente simples, muito sensível e não destrutivo que se aplica a numerosas moléculas. Apesar destas vantagens, muitos laboratórios hesitam ainda em utilizar este método por falta de intercalibração entre os resultados obtidos com diferentes instrumentos.

Para determinar as características próprias de fluorescência de uma molécula é necessário corrigir o espectro de excitação pela variação, com o comprimento de onda, da intensidade da fonte de excitação e também pela variação da transmissão do monocromador de excitação. Para a emissão, aplica-se uma correção para a variação da resposta do monocromador de emissão e do fotomultiplicador, com o comprimento de onda. Estas correções são fundamentais se os resultados obtidos por diferentes instrumentos devem ser comparados entre si ou ainda, para o estudo das propriedades de fluorescência de um composto determinado,

como por exemplo, o rendimento quântico^{20,21}. Os procedimentos necessários para obter os espectros corrigidos com relação às funções instrumentais^{2,8,15,22,23}, aos efeitos de difusão²³ e aos efeitos de filtro interno²⁴, têm sido discutidos ao longo dos anos por diferentes autores.

A maior parte dos espectrofluorímetros comerciais estão em condições de efetuar as correções pelas funções instrumentais.

3. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DAS ÁGUAS E DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE DIFERENTES ORIGENS

3.1. Espectros de Emissão

A figura 2 representa os espectros de emissão ($\lambda_{ex} = 313$ nm) de uma amostra de água estuariana e de água Milli-Q. A banda fina observada a 350 nm corresponde à banda Raman da água. De um modo geral, os espectros de emissão das amostras de águas naturais e de compostos húmicos de diferentes origens apresentam uma única banda cujo máximo muda em função do comprimento do onda de excitação utilizado.

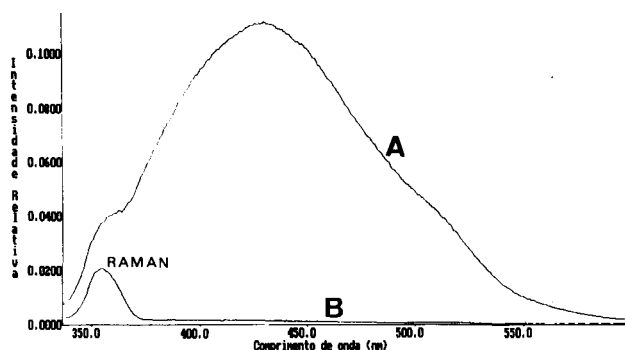


Figura 2. Espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 313$ nm) de (A) uma amostra de água estuariana (Manguezal do Rio Itacorubi, Ilha de Santa Catarina, Salinidade 30‰) e (B) água Milli-Q.

Segundo Senesi¹⁷, e referências aí citadas, em geral, os ácidos fúlvicos de água doce apresentam posições de máximo que variam entre 410 e 490 nm (λ_{ex} : entre 320 e 370 nm). Para estes mesmos λ_{ex} , os ácidos fúlvicos marinhos (estuários, oceanos, águas intersticiais) mostram máximos que variam entre 410 e 455 nm.

No que se refere à intensidade, as amostras oriundas de ambientes terrígenicos são muito mais fluorescentes do que as amostras de mar aberto, certamente por causa da concentração relativa de compostos fluorescentes nas primeiras.

Como já foi dito anteriormente, as correções para as funções instrumentais e para a difusão da luz são importantes para a aquisição de espectros de fluorescência. Estas correções são ainda mais essenciais no caso das águas naturais, por causa da pouca quantidade de material normalmente encontrada nas amostras. De fato, estas correções podem, por exemplo, deslocar a posição do máximo dos espectros de até 40 nm³. Boa parte dos dados publicados provém de espectros não corrigidos. Isto torna difícil eventuais comparações entre os parâmetros obtidos. As comparações tornam-se ainda mais difíceis se levarmos em consideração que os comprimentos de onda de excitação utilizados diferem de um laboratório para outro.

Entretanto, à medida que as condições instrumentais são aprimoradas e que parâmetros qualitativos como a *posição do máximo* e o *rendimento quântico* são criteriosamente examinados, as propriedades de fluorescência observadas para as águas naturais por diferentes autores, tendem a convergir para um senso comum. Por exemplo, a utilização de matrizes de

excitação/emissão tridimensionais permitiu evidenciar a existência de pelo menos três diferentes tipos de fluoróforos em amostras de MOD do Mar Negro²⁵. Dois deles, detectados em águas profundas, emitem em 440 nm ($\lambda_{ex} = 260$ e 340 nm). O terceiro, aparece em amostras de superfície, com um máximo em 345 nm ($\lambda_{ex} = 295$ nm) e tem propriedades de fluorescência similares àquelas do anel indólico do triptofano²⁵. Com esta mesma técnica, dois diferentes tipos de fluoróforos foram identificados em amostras marinhas, sendo que um deles apresenta uma fluorescência típica de proteínas (λ_{ex} entre 220 e 270 nm e λ_{em} entre 300 e 350 nm) e o outro, apresenta uma banda de fluorescência típica dos compostos húmicos (λ_{ex} entre 230 e 310 nm e λ_{em} entre 420 e 450 nm)¹⁰.

Do mesmo modo, a utilização de um espectrofluorímetro de alta sensibilidade permitiu a identificação de diferentes massas de água^{8,11}. Para um comprimento de onda de excitação de 313 nm, amostras marinhas apresentam o espectro de emissão sensivelmente mais deslocado para o azul (390 a 410 nm) do que as amostras de origem continental (420 a 440 nm). Estes últimos dados juntamente com a análise detalhada de espectros sincronizados e de excitação, mostraram que, no que concerne aos compostos húmicos, duas classes de fluoróforos podem ser diferenciadas e que estes estão presentes em todas as amostras analisadas, mas em diferentes proporções, dependendo da origem do material analisado. Quando comprimentos de onda mais curtos são utilizados, a fluorescência tipo proteína também pode ser identificada⁸.

3.2. Espectros de Excitação

Um balanço dos resultados publicados até o presente mostra que, em geral, os espectros de excitação das águas naturais e dos compostos húmicos de origens diversas apresentam uma ou várias bandas em diferentes comprimentos de onda²⁶⁻²⁸. Em geral, os espectros não corrigidos de excitação correspondem à imagem num espelho do espectro de emissão e, eventualmente, podem ser distorcidos tanto por efeitos de filtro interno como pelo espectro da lâmpada de excitação²⁹. Os comprimentos de onda de observação utilizados pelos diferentes autores variam bastante.

Nos trabalhos mais antigos a correção na faixa dos UV foi, freqüentemente omitida e, recentemente, esta região do espectro mostrou ser importante para distinguir entre amostras de diferentes profundidades^{10,25} e de diferentes origens^{8,25}.

Na figura 3 apresentamos um *espectro de excitação corrigido* de uma amostra estuariana. Este espectro apresenta duas regiões de diferentes intensidades: por volta de 250 e 340 nm, respectivamente. Em nossos estudos, a análise sistemática de centenas de amostras de água de diferentes origens mostrou que em todas elas, as duas bandas estão presentes, diferindo somente quanto às suas intensidades relativas. As amostras com

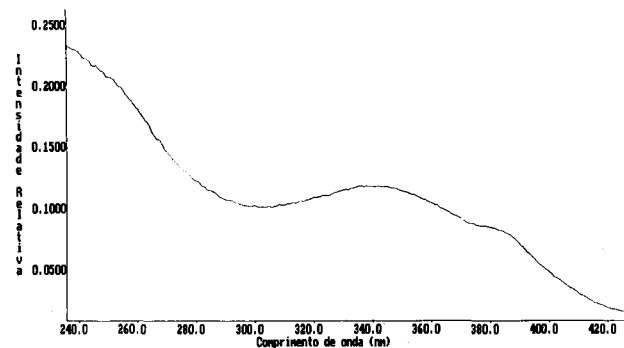


Figura 3. Espectro corrigido de excitação ($\lambda_{em} = 445$ nm) de uma amostra de água estuariana (Manguezal do Rio Itacorubi, Ilha de Santa Catarina, Salinidade 30‰).

influências terrigênicas têm a segunda banda relativamente mais intensa do que as amostras de mar aberto. Este fenômeno tem sido interpretado como decorrente da existência de um balanço quantitativo entre os dois grupos de fluoróforos responsáveis pela fluorescência dos compostos húmicos, nas diferentes amostras⁸.

3.3. Espectros de Excitação/Emissão Sincronizados

Poucos autores se aventuraram neste domínio e as informações encontradas na literatura são ainda escassas. Os dados que pudemos recolher mostram que os espectros sincronizados das águas naturais e dos compostos húmicos extraídos de diferentes fontes são, em geral, mais estruturados que os espectros de emissão e de excitação correspondentes^{9,30-34}.

Uma mistura de amostras de quatro rios foi resolvida com a ajuda dos espectros sincronizados de cada componente⁹ e, com esta mesma técnica, lignina e material húmico puderam ser diferenciados³². Com espectros sincronizados corrigidos, três diferentes tipos de fluoróforos foram detectados em várias amostras de águas naturais, sendo que as intensidades relativas das três bandas identificadas mudam em função da origem da amostra⁸. Mais recentemente, espectros de excitação sincronizada de matéria orgânica natural (marinha e terrestre) fracionada por ordem de polaridade, mostrou diferenças qualitativas entre estes dois tipos de material: alguns fluoróforos são específicos para MOD marinha ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 566/584 nm) e para ácido fúlvico terrestre ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 405/423 nm e $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 317/335 nm), enquanto a maioria dos fluoróforos detectados está presente em ambos os materiais³⁴.

A interpretação dos espectros sincronizados em termos das propriedades estruturais dos compostos fluorescentes continua, apesar disto, difícil. Na maior parte dos casos, os espectros são utilizados como assinaturas espectrais. A forma destes espectros varia em função da fonte do material e do intervalo ($\Delta\lambda$) utilizado⁸.

4. ASPECTOS ESTRUTURAIS DO MATERIAL FLUORESCENTE

4.1. A Natureza dos Fluoróforos

Muitos esforços têm sido feitos para estabelecer uma ligação entre as características de fluorescências e as propriedades estruturais dos compostos húmicos³⁵⁻³⁷ sem que tenha sido possível até o presente, definir a natureza química dos fluoróforos. De fato, a grande variedade de estruturas que contribuem para a fluorescência das águas naturais^{38,39} e o número de parâmetros (pH, força iônica, grau de conjugação, efeitos de substituintes e de solvente) que devem ser levados em conta nas transições eletrônicas de um sistema tão complexo, tornam difícil a aplicação das regras básicas da absorção e luminescência para caracterizar um grupo fluorofórico particular.

O espectro de fluorescência observado para as águas naturais resulta da contribuição das emissões dos diversos fluoróforos aí presentes. O fenômeno da fluorescência em si, sugere a existência de pelo menos, um grupo aromático substituído por pelo menos, um grupo doador de elétrons ou de um sistema conjugado insaturado capaz de um forte grau de ressonância³⁵. Mesmo assim, a estrutura de cada composto dependerá antes de tudo da sua origem.

As substâncias húmicas resultam de uma sucessão de estruturas químicas ligadas entre si de maneira aleatória. O centro aromático pode ser formado de fenóis, de polifenóis e de outros compostos aromáticos e poliaromáticos⁴⁰. As cadeias laterais podem conter grupos de carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos e ou produtos de sua transformação bioquímica^{41,42}. Em função da fonte do material fluorescente, a presença ou ausência e a proporção relativa entre estas estruturas são diferentes de uma molécula para a outra. Assim, lignina, tanino e

outros polifenóis que estão presentes nas plantas superiores, estão na origem da maior parte da matéria orgânica fluorescente de origem terrigênica^{3,37}. A decomposição do fitoplâncton, por outro lado, parece ser a fonte principal da matéria fluorescente marinha. Tem sido mostrado que a concentração de carbono alifático nos compostos húmicos marinhos é mais ou menos o dobro daquela de carbono aromático⁴². Os fluoróforos formados pelas reações de poli-condensação entre os grupos carbonilas e aminas são provavelmente preponderantes na estrutura dos ácidos fúlvicos marinhos ricos em hidrogênio e nitrogênio^{43,44}.

4.2. A Massa Molar

A síntese dos trabalhos de diferentes autores sugere que a fluorescência das águas naturais é essencialmente devida às moléculas cuja massa molar está compreendida entre 500 e 2000 daltons, mais ou menos⁴⁵⁻⁴⁷. Isto implica que a fluorescência das águas naturais deve-se mais aos ácidos fúlvicos e hidrofílicos do que aos ácidos húmicos^{45,48}. Belin *et al.*⁴⁸ em recente trabalho realizado com extratos de MOD de águas doces, observaram mesmo que o rendimento quântico de fluorescência de ácidos húmicos corresponde aproximadamente à metade daquele dos ácidos fúlvicos e à terça parte daquele dos ácidos hidrofílicos.

Em regra, a intensidade de emissão e de excitação diminui com o aumento da massa molar para os ácidos fúlvicos de origem sedimentar, microbiana ou aquática^{1,49,50}.

Um deslocamento importante do espectro de emissão em direção ao vermelho, seguido de uma diminuição do rendimento de fluorescência tem também sido observado, quando a massa molar aumenta, para os ácidos fúlvicos de origem microbiana¹² assim como para o material fluorescente dissolvido em águas de reservatório⁴⁸. Este efeito tem sido atribuído a uma maior proximidade dos cromóforos aromáticos presentes nas moléculas, o que se traduziria por uma maior probabilidade de desativação dos estados excitados¹².

A forma do espectro de excitação também varia em função da massa molar. A segunda banda do espectro torna-se mais larga em função do aumento da massa molar do material fluorescente⁴⁸.

5. A FLUORESCÊNCIA EM OCEANOGRAFIA

Duas abordagens são possíveis quando se utiliza a espectrofluorimetria para estudar as substâncias orgânicas complexas nas águas naturais. A fluorescência pode ser empregada como uma sonda para detectar a matéria orgânica e seguir seu comportamento nos diversos compartimentos do meio ambiente, ou bem como um meio de melhor conhecer as fontes, a natureza e a estrutura química das macromoléculas responsáveis por sua emissão. Em função do tipo de informação desejada, as propriedades de fluorescência são então medidas e confrontadas à diferentes parâmetros.

5.1. Fluorescência X Salinidade

Este tipo de relação é geralmente empregado para seguir a transferência da MOD durante a passagem continente/oceano. Kalle^{6,7} foi o primeiro a utilizar a fluorescência neste contexto e foi seguido por vários autores^{51,52-56}.

Para ser utilizada como um mapeador, a fluorescência deve se comportar conservativamente durante a mistura estuarina. Um parâmetro pode ser considerado como sendo conservativo se os valores medidos através do estuário variam segundo uma curva de diluição teórica linear⁵⁷. As curvas de diluição são, em geral, traçadas em função da salinidade. Para os estudos das relações fluorescência x salinidade, o parâmetro que tem sido levado em consideração na maior parte dos trabalhos, é a intensidade de fluorescência, medida para um comprimento de

onda de excitação fixo. Obtém-se, assim, boas correlações lineares decrescentes entre intensidade de fluorescência e salinidade. Estes resultados são, aparentemente, independentes do comprimento de onda de excitação utilizado ($\lambda_{ex} = 313$ e 370 nm⁵¹; $\lambda_{ex} = 340$ nm⁵⁵; $\lambda_{ex} = 370$ nm⁵⁶; $\lambda_{ex} = 320$ nm⁵⁸; $\lambda_{ex} = 365$ nm⁵⁹; $\lambda_{ex} = 358$ nm⁶⁰) e parecem confirmar um comportamento conservativo da fluorescência em meio estuarino.

Estes fenômenos podem ser resumidos na figura 4. As diferentes inclinações observadas entre os diferentes estuários são ligadas à diferença da natureza das contribuições terrigênicas^{56,60}. Pode-se igualmente, observar variações da inclinação para um mesmo sistema, em função das estações do ano.

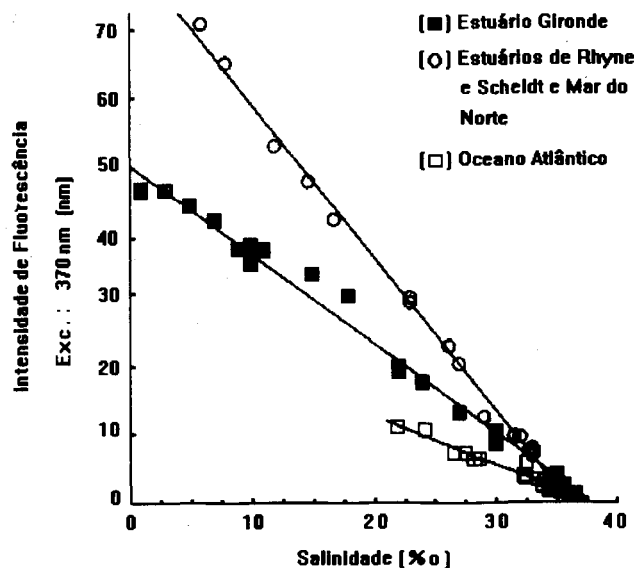


Figura 4. Relação entre a intensidade de fluorescência e a salinidade para amostras de águas de diferentes estuários. As amostras oceânicas são oriundas do Oceano Atlântico, Plataforma Continental, Sudoeste da França.

Alguns trabalhos têm também mostrado a existência de um comportamento não conservativo do material fluorescente. Esta não conservatividade seria ligada à produção e degradação da matéria fluorescente durante seu tempo de residência no estuário⁵⁵ assim como a interações do Mg^{2+} presente na água do mar, com o material fluorescente⁶¹.

Nos raros casos em que o espectro completo de emissão de fluorescência foi considerado, poucas diferenças nas características espectrais puderam ser observadas durante a mistura estuarina, para a maior parte dos λ_{ex} utilizados: $\lambda_{ex} = 370$ nm⁵⁶, $\lambda_{ex} = 358$ nm⁶⁰, $\lambda_{ex} = 367$ nm⁶².

Por outro lado, para um comprimento de onda de excitação de 313 nm, diferenças qualitativas consideráveis foram observadas entre as amostras provenientes dos dois extremos, marinho e terrigênico, do estuário. As amostras mais distantes do mar apresentam posições de máximo sensivelmente deslocadas para o vermelho (40 nm em alguns casos) em relação àquelas que sofrem influências predominantemente marinhas^{8,63}. Estes dados têm sido interpretados como devidos à diferença de natureza entre as substâncias responsáveis pela fluorescência nos dois sistemas⁶³ associada a fenômenos como a floculação de material fluorescente provocada pela alterações nos parâmetros abióticos como pH e força iônica, durante o percurso estuarino¹³. Este comprimento de onda parece não ser o único capaz de detectar este fenômeno como pode ser observado na figura 5. Diferentes comprimentos de onda de emissão serão provavelmente observados entre amostras marinhas e terrigênicas se λ_{ex} entre 300 e 350 nm forem utilizados.

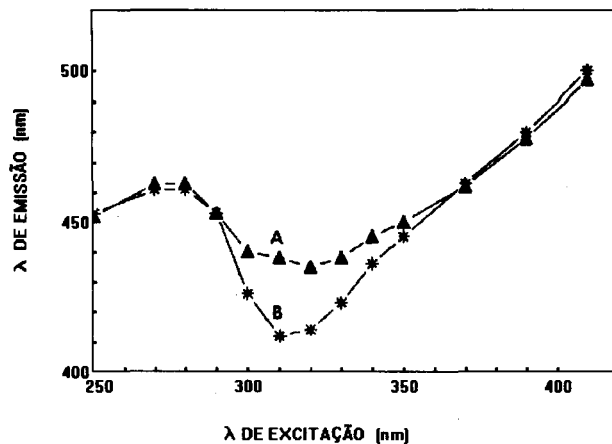


Figura 5. Relação entre λ_{ex} e λ_{em} para (A) uma amostra de água estuarina (Salinidade 3‰) e para (B) uma amostra de água marinha (Salinidade 35‰).

5.2. Fluorescência X Nutrientes

Os dados publicados a este respeito são ainda raros mas muito interessantes. Hayase *et al.*^{58,64} observaram que existem relações quase lineares entre a intensidade de fluorescência e os nutrientes (fosfato, nitrato e silicato) nas baías de Sagami e de Tokio assim como em algumas estações oceânicas do Pacífico Norte. Resultados similares foram encontrados para amostras do Golfo de Gasconha (Oceano Atlântico-França)⁵¹.

Os sais nutritivos são fixados pelo fitoplâncton nas camadas superficiais, e regenerados pela decomposição da matéria orgânica particulada que precipita, ao longo da coluna de água. A correlação observada entre os sais nutritivos e a fluorescência sugere que o material fluorescente poderia igualmente ser consumido nas camadas superiores (por consumo biológico, ou, por exemplo, por efeito fotoquímico) e depois ser regenerado por processos oxidativos na coluna d'água^{58,64}. Estas suposições se fortalecem pelas relações lineares entre fluorescência e consumo de oxigênio, observadas na mesma localização⁶⁵.

5.3. Fluorescência X Carbono Orgânico Dissolvido

A fluorescência das águas naturais é, em princípio, produzida pela matéria orgânica dissolvida aí presente. Vários autores têm, portanto, tentado utilizar as relações fluorescência/carbono orgânico dissolvido para assim obter um método de análise indireto deste parâmetro nos ambientes aquáticos. Para as amostras provenientes de certos ambientes, existe, de fato, uma boa correlação entre a concentração de matéria orgânica dissolvida e a fluorescência: águas intersticiais (figura 6)^{51,66}, águas doces⁶⁷, águas estuarinas^{54,68,69}.

Esta relação não é sempre verificada. Black e Christman⁷⁰, por exemplo, observaram que a relação entre fluorescência e carbono orgânico não era constante para diferentes tipos de águas examinadas. Outros autores têm sugerido que a fluorescência das águas oceânicas não depende do carbono orgânico total, mas poderia estar associada às concentrações em proteínas, carboidratos e lipídios dissolvidos nas diferentes camadas da coluna de água⁷¹. Stewart e Wetzel⁷² sugeriram mesmo que não se utilize a fluorescência, em nenhum caso, para estimar o carbono orgânico dissolvido.

As razões desta falta de correlação não são claras e vários poderiam ser os motivos de tais divergências. Primeiro, diferentemente das águas de origem terrigênica e intersticiais, pode haver, nos oceanos, uma parte importante da MOD que é contabilizada nas medidas de COD mas que não fluoresce. Outra causa poderiam ser as modificações sofridas pela MOD durante seu longo tempo de residência nos oceanos. Nas águas

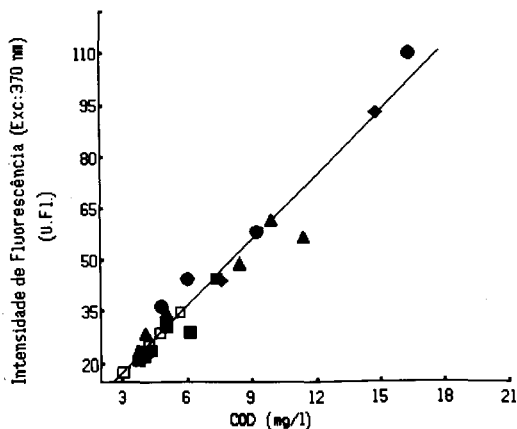


Figura 6. Relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração de COD para águas intersticiais (3000 m de profundidade) do Golfo de Gasconha (Oceano Atlântico, Sudoeste da França). Os diferentes símbolos representam amostras de diferentes pontos de coleta.

profundas do Pacífico, a idade das substâncias húmicas é estimada em 6000 anos⁷³. Enfim, o conteúdo de COD poderia ser sub-estimado pelas técnicas clássicas de medida⁷⁴. Existe atualmente uma importante controvérsia sobre este tema desde que Suzuki e colaboradores^{75,76} divulgaram que as medidas de COD feitas com técnicas a altas temperaturas seriam de 50 a 400% mais altas do que aquelas feitas anteriormente. Finalmente, deve ser levado em consideração o fato de que a precisão das medidas nos níveis de concentração de água do mar (mais ou menos 1 mg/l) é muito menor do que aquela de amostras mais concentradas e a contaminação eventual é muito mais frequente.

5.4. Fluorescência x Poluição

A maioria dos estudos relativos à poluição no meio ambiente são baseados em métodos analíticos que determinam as concentrações dos poluentes tais como íons metálicos. Os resultados são geralmente relativos às concentrações totais sem levar em conta a especificação (forma química) do constituinte considerado. Numa outra abordagem, a espectrofluorimetria permite avaliar os efeitos da poluição na matéria orgânica dissolvida em ambientes aquáticos, desde que estes efeitos provoquem mudanças nas características de fluorescência deste material. As características da fluorescência comumente incluem intensidade, comprimento de onda de emissão, eficiência de fluorescência, e ou, polarização⁷⁷. A fluorescência pode igualmente ser usada para estudar os processos químicos envolvendo poluentes fluorescentes tais como os hidrocarbonetos poliaromáticos⁷⁸ a ainda, como um método para determinar a concentração de organoestânicos em amostras ambientais e biológicas⁷⁹. Os métodos de fluorescência oferecem várias vantagens sobre outros porque são sensíveis e podem ser aplicados em concentrações tão baixas como aquelas tipicamente encontradas na natureza.

6. A REATIVIDADE DA MATÉRIA FLUORESCENTE

6.1. A Fotoquímica

Inúmeros trabalhos têm tratado dos processos fotodinâmicos que resultam da interação entre a luz solar e a matéria orgânica dissolvida nas águas naturais e, principalmente, as substâncias húmicas. Na presença de irradiação ultravioleta, as substâncias húmicas podem sofrer fotodecomposição e gerar espécies de forte poder oxidante como o oxigênio singlete, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila⁸⁰⁻⁸³. Estas espécies são altamente reativas e estão na origem dos processos considerados como sendo dos mais importantes nos oceanos.

A degradação fotoquímica e a produção de compostos químicos de baixo peso molecular resultante, poderia ser uma das etapas determinantes na cinética dos processos de transformação do carbono orgânico biológico refratário (as substâncias húmicas) no oceano⁸⁴.

Até o presente, não se sabe a que ponto as substâncias húmicas podem ser modificadas pelas reações fotoquímicas e, em alguns casos, os métodos espectroscópicos têm sido utilizados para avaliar estes fenômenos⁸⁵⁻⁸⁷. Uma exposição prolongada das substâncias húmicas a uma fonte de irradiação monocromática provoca uma diminuição geral da intensidade e um deslocamento dos espectros de fluorescência⁸⁵. Efeitos similares têm sido observados na irradiação de amostras de águas estuarinas e de exsudatos fitoplanctônicos, com luz policromática de espectro semelhante à luz solar⁵¹. A fotoprodução de formas químicas como o formaldeído, o acetaldeído, o glioxal, o glioxalato e o CO a partir da matéria orgânica dissolvida marinha está estreitamente ligada com a fluorescência⁸⁸.

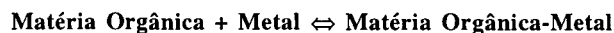
6.2. A Complexação com os Metais

Diferentes métodos têm sido empregados para estudar as interações entre a matéria orgânica e os metais. O estudo da evolução das propriedades espectrais em função da concentração em metais presentes nos meios representa um dos métodos mais comumente utilizados. De fato, vários íons metálicos têm a propriedade de suprimir a fluorescência por diferentes tipos de mecanismos fotofísicos. Os metais pesados podem acelerar a velocidade das transferências intersistemas das transições eletrônicas, mecanismo este que entra em competição com o processo da fluorescência. Os íons paramagnéticos aceleram a evolução dos processos não radiativos o que se traduz por uma redução da intensidade de emissão⁷⁷.

Dois diferentes tipos de interações entre a molécula fluorescente e o metal poderiam estar na origem da supressão da fluorescência das substâncias húmicas na presença destes íons. O primeiro, consiste na complexação do metal com os sítios fluorescentes da molécula. Pode-se, então, falar de modo de *supressão estático*. O segundo, consiste de uma *supressão dinâmica*, que seria devida a colisão da molécula fluorescente com os íons metálicos¹⁷.

Ryan *et al.*⁸⁹ mostraram que, para ácidos fúlvicos, o íon Cu^{2+} é um inibidor de fluorescência mais eficaz que os íons Co^{2+} e Ni^{2+} . Eles mostraram, igualmente que o íon metálico deve estar efetivamente ligado a molécula para poder suprimir a fluorescência e que cada íon contribui para a supressão da fluorescência de mais ou menos um fluoróforo. Estes resultados estão de acordo com um modo de supressão estático, da fluorescência.

As curvas de titulação da matéria fluorescente em função da concentração do metal adicionado podem ser utilizadas para obter informações sobre o equilíbrio,



se considerarmos que a percentagem de supressão é proporcional à quantidade de matéria orgânica associada ao metal. Pode-se obter uma relação entre intensidade medida de fluorescência e a quantidade de metal adicionado a partir das curvas assim obtidas⁹⁰. Desta maneira, as capacidades de complexação (C_L) e as constantes de equilíbrio aparente (K) podem ser calculadas por regressão não linear. Os resultados obtidos, são em geral, comparáveis àqueles medidos por outros métodos como o dos Eletrodos Seletivos, a Espectrometria de Absorção Atômica associada à diálise⁹⁰ e a Voltametria de Redissolução Anódica⁹¹.

Vários trabalhos têm sido publicados sobre este tema^{34,89-93}. As conclusões não são unânimes e têm gerado importantes controvérsias sobre a validade e aplicação dos resultados⁹⁴⁻⁹⁶. Muitos autores têm encontrado valores de C_L negativos e,

muitas vezes, esta metodologia tem-se mostrado eficiente somente em amostras onde a concentração de material fluorescente seja elevada. Num trabalho recente, foi realizada uma adaptação deste modelo para uma situação de multiligantes, o que solucionou o problema do valor de C_L e ainda mostrou que frações cromatográficas de maior polaridade (tanto para MOD marinha como terrestre) apresentam uma concentração de ligantes mais importante³⁴.

Num outro tipo de tratamento, fazendo variar a concentração de Cu^{2+} e utilizando espectros sincronizados, Machado *et al.*³³, detectaram dois sítios principais de complexação em ácidos fúlvicos extraídos de solos.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Todas as contribuições no sentido de melhorar os conhecimentos relativos à distribuição e reatividade do carbono orgânico nas águas naturais são sempre bem vindas. A espectroscopia de fluorescência parece particularmente interessante na medida em que permite uma avaliação direta das amostras sem tratamento químico ou pré-concentração. As limitações por enquanto, estão por conta da falta de intercalibração. Apesar disso, os trabalhos mais recentes, com técnicas aprimoradas, mostram que a fluorescência pode ser usada como um mapeador da MOD tanto quantitativa como qualitativamente.

Do ponto de vista quantitativo, a fluorescência parece estar perfeitamente correlacionada com a MOD total em ambientes onde a concentração de carbono orgânico é significativa, tais como águas intersticiais e estuarinas. No oceano este não é o caso. Aí, a fluorescência parece relacionar-se quantitativamente com grupos individuais de componentes bioquímicos dissolvidos tais como *proteínas, lipídios, fósforo orgânico e outros nutrientes*. Este fato deve estar relacionado com um balanço entre as quantidades relativas destes componentes e os compostos húmicos nestes ambientes, assim como com as eventuais modificações sofridas pela MOD durante seu tempo de residência nos oceanos.

No que se refere aos aspectos qualitativos, os resultados têm apontado para a existência de três principais grupos de fluoróforos responsáveis pela fluorescência nas águas naturais. Um destes grupos emite em comprimentos de onda mais curtos ($\lambda_{ex} < 300 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} < 350 \text{ nm}$) e pode resultar da emissão de fluorescência por aminoácidos e proteínas cuja presença estaria relacionada com a matéria orgânica mais lábil e recente. Os dois outros, com λ_{em} variando entre 390 e 450 nm (λ_{ex} de 300 a 340 nm) seriam relativos aos compostos húmicos.

No papel de sonda para o estudo da reatividade da MOD nos sistemas aquáticos a fluorescência tem, é claro, suas limitações principalmente se considerarmos que nem toda a MOD fluoresce. Apesar disso, no que se refere aos estudos de complexação, o interesse que esta metodologia tem despertado entre os pesquisadores tem levado a uma importante evolução da aplicação do método da extinção da fluorescência por íons paramagnéticos. Graças ao esforço conjunto de pesquisadores de diferentes áreas (biologia, química, matemática, oceanografia, etc), e ao avanço de recursos informáticos tem-se produzido modelos para o tratamento dos dados que, de mais em mais se aproximam da realidade, e, por isso, tendem a convergir para um senso comum. Estes avanços tem permitindo cada vez mais, a comparação entre os parâmetros de complexação obtidos para a MOD de diferentes ambientes.

8. REFERÊNCIAS

1. Visser, S. A., "Aquatic and Terrestrial Humic Materials", Ann Arbor Science, Michigan, 1983, p.183.
2. Ewald, M.; Belin, C.; Berger, P.; Etcheber, H., CNEOX, 1982, nº 14, p.139.
3. Ewald, M.; Belin, C.; Berger, P.; Weber, J. H.; *Environ. Sci. Technol.* **1983**, 17, 501.
4. Daumas, R. A., "Les substances organiques naturelles dissoutes dans l'eau de mer". *Actualités de Biochimie Marine*, Ed. CNRS, Paris, 1978, p.19.
5. Laane, R. W. P. M.; Koole, L.; *Neth. J. Sea. Res.* **1982**, 15, 217.
6. Kalle, K.; *Deutsch. Hydrogr. Z.* **1949**, 2, 9.
7. Kalle, K.; *Deutsch. Hydrogr. Z.* **1963**, 1, 153.
8. de Souza Sierra, M. M.; Donard, O. F. X.; Belin, C.; Lamotte, M.; Ewald, M.; *Mar. Chem.* **1994**, 47, 127.
9. Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S.; *Mar. Chem.* **1987**, 21, 37.
10. Mopper, K.; Schultz, C. A.; *Mar. Chem.* **1993**, 41, 229.
11. Donard, O. F. X.; Lamotte, M.; Belin, C.; Ewald, M.; *Mar. Chem.* **1989**, 27, 117.
12. Ewald, M.; Berger, P.; Visser, S. A.; *Geoderma* **1988**, 43, 11.
13. de Souza Sierra, M. M.; Donard, O. F. X.; *Oceanologica Acta* **1991**, v.sp.nº, 11, 275.
14. Laane, R. W. P. M.; *Mar. Chem.* **1982**, 11, 395.
15. Parker, C. A., "Photoluminescence of solutions", Elsevier, Amsterdam, p.544.
16. Schulman, S. G., "Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: physicochemical principles and practice", Pergamon Press, Exeter.
17. Senesi, N.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, 232, 77.
18. Lloyd, J. B. F.; *Nature Physical Science* **1977**, 231, 64.
19. Vo-Dinh, T.; *Anal. Chem.* **1978**, 50, 396.
20. UV Spectrometry Group, "Standards in Fluorescence Spectrometry", Chapman and Hall, New York, p.115.
21. Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds, Kluwer Academic Publishers, p.1157.
22. Hofstraat, J. W.; Latuhihin, M. J.; *Applied Spectroscopy* **1994**, 48, 436.
23. Ewald, M.; Berger, P.; Belin, C.; *Environ. Technol. Letters* **1984**, 5, 31.
24. Kubista, M.; Sjöback, R.; Eriksson, S.; Albinsson, B.; *Analyst* **1994**, 119, 417.
25. Coble, P. G.; Green, S. A.; Blough, N. V.; Gagosian, R. B.; *Nature* **1990**, 348, 432.
26. Traganza, E. D.; *Bull. Mar. Sci.* **1969**, 19, 897.
27. Hayase, K.; Tsubota, H.; *Geochim. Cosmochim. Acta* **1985**, 49, 159.
28. Donard, O. F. X.; Belin, C.; Ewald, M.; *Sci. Total Environ.* **1987**, 62, 157.
29. Puzyna, W., "Fluorescence spectra of humic substances", 2nd Inter. Conf. IHSS, 1984, p.87.
30. Frimmel, F. H.; Bauer, H.; *Sci. Total Environ.* **1987**, 62, 139.
31. Miano, T. M.; Sposito, G.; Martin, J. P.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1988**, 52, 1016.
32. Poutanen, E. L.; Maniken, I., "Analysis of humic and lignin compounds in brackish water by fluorescence spectroscopy", Proceedings of the 16th CBO, p.1.
33. Machado, A. A. S. C.; Esteves da Silva, J. C. G.; Maia, J. A. C.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, 292, 121.
34. Lombardi, A. T., Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica de origem natural e sua complexação com íons cobre. Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, SP, 1995, p. 133.
35. Seal, B. K.; Roy, K. B.; Mukherjee, S. K.; *J. Indian Chem. Soc.* **1964**, 41, 212.
36. Lundquist, K.; Josefsson, B.; Nyquist, G.; *Holzforchung* **1978**, 32, 27.
37. Larson, R. A.; Rockwell, A. L.; *Arch. Hydrobiol.* **1980**, 4, 416.
38. Underfriend, S., "Fluorescence Assay in Biology and Medicine", Academic Press, New York, 1962, p.505.
39. Harvey, G. R.; *Mar. Chem.* **1984**, 15, 89.

40. Ruggiero, P.; Interesse, F. S.; Sciacovelli, O.; *Geochim. Cosmochim. Acta* **1979**, *43*, 1771.
41. Schnitzer, M.; Khan, S. U., "Humic Substances in the Environment", Marcel Dekker Inc., New York, 1972.
42. Rashid, M. A., "Geochemistry of Marine Compounds", Springer-Verlag, New York, 1985, p.300.
43. Senesi, N.; Miano, T. M.; Provenzano, M. R.; Brunetti, G.; *Sci. Total Environ.* **1989**, *143*, 81.
44. Laane, R. W. P. M.; *Mar. Chem.* **1984**, *15*, 85.
45. Berger, P., Etude de la matière organique complexe fluorescente dissoute dans les estuaires de la zone tempérée. Thèse de doctorat ès Sciences n° 805, Université de Bordeaux I, França, 1984, p.163.
46. Buffle, J.; Deladdey, P.; Haerdi, W.; *Anal. Chem. Acta* **1978**, *101*, 339.
47. Thurman, E. M.; Wershaw, R. L.; Malcolm, R. L.; Pinckney, D. J.; *Org. Chem.* **1982**, *4*, 27.
48. Belin, C.; Quéllec, C.; Lamotte, M.; Ewald, M.; Simon, Ph.; *Environm. Technol.* **1993**, *14*, 1131.
49. Levèsque, M.; *Soil Sci.* **1972**, *113*, 346.
50. Stewart, A. J.; Wetzel, R. G.; *Limnol. Oceanogr.* **1980**, *25*, 559.
51. de Souza Sierra, M. M., Caractérisation et reactivité de la matière organique fluorescente dissoute dans les milieux cotiers et marins. Thèse PhD, Université de Bordeaux I, França, 1992.
52. Duursma, E. K.; *Neth. J. Sea Res.* **1961**, *1*, 1.
53. Postma, H.; Manuels, M. W.; Rommets, J. W.; *Neth. J. Sea Res.* **1976**, *10*, 499.
54. Laane, R. W. P. M.; *Neth. J. Sea Res.* **1981**, *15*, 88.
55. Dorsch, J. E.; Bidleman, T. F.; *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **1982**, *15*, 701.
56. Berger, P.; Laane, R. W. P. M.; Ilhaude, A. G.; Ewald, M.; Courtot, P.; *Oceanologica Acta* **1984**, *7*, 309.
57. Burton, J. D.; Liss, P. S., "Estuarine Chemistry", Academic Press, Londres, 1976.
58. Hayase, K.; Yamamoto, M.; Nakazawa, I.; Tsubota, H.; *Mar. Chem.* **1987**, *20*, 256.
59. Willey, J. D.; Atkinson, L. P.; *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **1982**, *14*, 49.
60. Laane, R. W. P. M.; Kramer, K. J. M.; *Neth. J. Sea Res.* **1990**, *26*, 1.
61. Willey, J. D.; *Mar. Chem.* **1984**, *15*, 19.
62. Gienapp, H.; *Deutsch. Hydrogr. Z.* **1979**, *32*, 204.
63. de Souza Sierra, M. M.; Donard, O. X. F.; *Mar. Chem.* submitted, 1995.
64. Hayase, K.; Tsubota, H.; Sunada, I.; Goda, S.; Yamazaki, H.; *Mar. Chem.* **1988**, *25*, 373.
65. Hayase, K.; Tsubota, H.; Sunada, I.; *Sci. Total Environ.* **1989**, *81*, 315.
66. Starikova, N. D.; *Oceanology* **1970**, *10*, 796.
67. Smart, P. L.; Finlayson, B. L.; Rylands, W. D.; Ball, C. M.; *Water Res.* **1976**, *10*, 805.
68. Laane, R. W. P. M.; *Neth. J. Sea Res.* **1980**, *14*, 192.
69. Cadée, G. C.; Laane, R. W. P. M.; *Mitt. Geol. Palaont. Inst. Univ. Hamburg* **1983**, *55*, 331.
70. Black, A. P.; Christman, R. F.; *J. Am. Water Works Assoc.* **1963**, *55*, 897.
71. Karabashev, G. S.; Agatova, A. I.; *Oceanology* **1984**, *24*, 680.
72. Stewart, A. J.; Wetzel, R. G.; *Limnol. Oceanogr.* **1981**, *26*, 590.
73. Williams, P. M.; Druffel, E. R. M.; *Nature* **1987**, *330*, 246.
74. Williams, P. M.; Druffel, E. R. M.; *Oceanography Magazine* **1988**, *1*, 14.
75. Suzuky, Y.; Sugimura, T.; Itoh, T.; *Mar. Chem.* **1985**, *16*, 83.
76. Sugimura, T.; Suzuky, Y.; *Mar. Chem.* **1988**, *24*, 105.
77. Seitz, R. W.; *Trends in Analytical Chem.* **1981**, *1*, 79.
78. Kumke, M.U.; Löhmannsröben, H.G.; Roch, Th.; *Analyst* **1994**, *119*, 997.
79. Arakawa, Y.; Wada, O.; Manabe, M.; *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1901.
80. Zafiriou, O. C.; Jousset-Dubien, J.; Zepp, R. G.; Zika, R. G.; *Environ. Sci. Technol.* **1984**, *18*, 358A.
81. Zika, R. G.; *Rev. Geophys.* **1987**, *25*, 1390.
82. Zepp, R.G., "Humic Substances and their Role in the Environment", Wiley, Chichester, 1988.
83. Haag, W. R.; Mill, T. "Survey of sunlight-produced transient reactants in surface waters", palestra apresentada durante o Workshop on Effects of Solar Ultraviolet Radiation on Geochemical Dynamics, Woods Hole, Massachusetts, 1989.
84. Mopper, K.; Zhou, X.; Kieber, R. J.; Kieber, D. J.; Sikorski, R. J.; Jones, R. D.; *Nature* **1991**, *353*, 60.
85. Kramer, C. J. M.; *Neth. J. Sea Res.* **1979**, *13*, 325.
86. Kouassi, M.; Zika, R. G. "Light induced alteration of the photophysical properties of dissolved organic matter in seawater", palestra apresentada à Division of Environmental Chemistry, A. C. S., Miami, Flórida, 1985.
87. Frimmel, F. H.; Bauer, H.; *Sci. Total Environ.* **1987**, *62*, 139.
88. Milne, P. J.; Zika, R. G.; *Mar. Chem.* **1989**, *27*, 147.
89. Ryan, D. K.; Thompson, C. P.; Weber, J. H.; *Can. J. Chem.* **1982**, *61*, 1505.
90. Ryan, D. K.; Weber, J. H.; *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 986.
91. Boussemart, M.; Benamou, C.; Richou, M.; Benaim, J. Y.; *Mar. Chem.* **1989**, *28*, 27.
92. Saar, R. A.; Weber, J. H.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2095.
93. Berger, P.; Ewald, M.; Liu, D.; Weber, J. H.; *Mar. Chem.* **1984**, *14*, 289.
94. Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2418.
95. Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1526.
96. Ryan, D. K.; Ventry, L. S.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1523.