

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

**INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA ESTRUTURA DE
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DETECTADOS POR
ESPECTROSCOPIA**

MARCILENE FERRARI BARRIQUELLO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de DOUTOR EM CIÊNCIAS (Área
de Concentração: QUÍMICA).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo F. Almeida Neves

CO-ORIENTADOR: Dr. Ladislau Martin-Neto

São Carlos – SP
2005

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

B276ii

Barriquello, Marcilene Ferrari.

Influência de íons metálicos na estrutura de substâncias
húmicas detectados por espectroscopia / Marcilene Ferrari
Barriquello. -- São Carlos : UFSCar, 2005.
120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2005.

1. Química analítica. 2. Métodos espectroscópicos. 3.
Cromatografia. 4. Íons metálicos. 5. Substâncias húmicas. 6.
Ácido húmico sintético. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

OFEREÇO

A Deus

*Pelas muitas evidências e manifestações
de seu infalível amor
que sempre me consolam e sustentam,
e fazem compreender que nunca estou só.*

*Aos meus pais Geraldo e Olinda
pelo amor e incentivo e pela
minha formação.
Ao meu irmão Marcelo e a Elaine
pelo carinho.
Ao meu sobrinho Rafael,
pedacinho de luz.
A minha tia Adelia
pelo apoio e amizade.*

DEDICO

*O Senhor é meu pastor: nada me falta.
Em verdes pastagens me faz repousar,
conduz-me até as fontes tranquilas
e reanima minha vida,
Ele me guia por bons caminhos
por causa de seu nome.
Ainda que eu caminhe por um vale tenebroso,
não temo mal algum, porque tu estás comigo;
teu bastão e teu cajado me confortam.
Diante de mim preparas a mesa,
bem a vista dos meus inimigos;
tu me unges com óleo a cabeça,
e minha taça transborda.
Sim, prosperidade e graça me seguem,
todos os dias de minha vida;
Habituarei na casa do Senhor,
por dias sem fim.*

Salmo 22

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Eduardo Fausto de Almeida Neves e ao Dr. Ladislau Martin-Neto pela orientação, incentivo, confiança e amizade durante a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos;

A Dra. Débora Milori, Dr. Wilson Tadeu Silva e Dr. Otaciro R. Nascimento, Dr. Rubens e Msc. Fabio Leite pela valiosa colaboração na realização deste trabalho;

Ao Renê por sua valiosa e prestativa ajuda no laboratório de química e principalmente pela amizade;

Aos secretários Emerson e Elita, sempre atenciosos e prestativos;

Aos colegas de trabalho, Valentim, Beth, Valeria, Diego, Juliana, Denise, Marcelo, Garbin, Martha, Lucimara, Andrea, Andrea Couto, Débora, Aline, Lucimar, Helder, meus agradecimentos pela agradável convivência;

Aos meus amigos Rosana (Rô), Silvio, Elisângela (Li), Tatiana (Tati), Thais (Tatá), Francieli (Fran), Priscila (Pri), Milena, Eduarda, Larissa, Larissa Prisco, Luciano, Hato, Nelson, Luciana Coelho, Julio, Clésia, Miriam, Edna e Sandro, pela grande amizade;

A Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infra-estrutura e pelo excelente ambiente de trabalho;

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho;

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.2	OBJETIVOS	16
1.3	AS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	17
1.3.1	Estrutura das Substâncias Húmicas	19
1.3.2	Fracionamento das Substâncias Húmicas	23
1.3.3	Modelos Sintéticos de Ácidos Húmicos	25
1.3.4	Interações com Íons Metálicos	27
1.4	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS NO ESTUDO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	29
1.4.1	Espectroscopia de Absorção de Luz UV-Visível	31
1.4.2	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	35
1.4.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	38
1.4.4	Espectroscopia de Fluorescência de Luz UV-Visível	41
1.5	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO	44
1.6	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	46
1.7	TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA	48
1.8	TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA	49
2	MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.1	AMOSTRA DE SOLO	51
2.2	PREPARO DA AMOSTRA DE SOLO PARA A EXTRAÇÃO	51
2.3	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	51
2.4	PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO HÚMICO	52
2.5	SÍNTESE DO ÁCIDO HÚMICO	52
2.6	ANÁLISE ELEMENTAR	53
2.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS	53
2.8	MEDIDAS CONDUTOMÉTRICAS	53
2.9	MEDIDAS POTENCIOMÉTRICAS	53
2.10	REAGENTES E SOLUÇÕES	54
2.11	PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL DOS ÁCIDOS HÚMICOS SINTÉTICOS POR TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA	54
2.12	PROCEDIMENTO PARA CALIBRAÇÃO DOS ELETRODOS DE VIDRO	54
2.13	PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE pK's DOS ÁCIDOS HÚMICOS SINTÉTICOS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA EM FORÇA IÔNICA AJUSTADA	55
2.14	COMPLEXAÇÃO DE METAIS NAS AMOSTRAS DE ÁCIDOS HÚMICOS SINTÉTICOS	56
2.15	ANÁLISE DE FTIR	56

2.16	ANÁLISE DE RMN	57
2.17	ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA	57
2.18	ANÁLISE USANDO UV-VISÍVEL	58
2.19	ANÁLISE VIA CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO	58
2.20	ANÁLISE UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1	SÍNTESE DO ÁCIDO HÚMICO	61
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS AHS	62
3.2.1	Análise Elementar	62
3.2.2	FTIR	63
3.2.3	RMN	68
3.2.4	Medidas Condutométricas	70
3.2.5	Medidas Potenciométricas	71
3.3	ESTUDO DOS AHS COM METAIS COMPLEXADOS	82
3.3.1	FTIR	82
3.3.2	UV-Visível	86
3.3.3	Cromatografia por Exclusão de Tamanho	90
3.3.4	Fluorescência de Luz no UV-Visível	93
3.3.5	Caracterização por Microscopia de Força Atômica	99
4	CONCLUSÕES	107
5	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	109
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura das substâncias húmicas proposta por Fuchs ¹⁹	20
Figura 1.2 – Modelo de ácido húmico proposto por Schulten ²³	21
Figura 1.3 – Modelo tridimensional de ácidos húmicos proposto por Schulten & Schnitzer ²⁵ , C=cinza claro, O=cinza escuro, N=preto e H=branco. As letras A,B e C indicam os espaços vazios presentes, provavelmente, na estrutura das substâncias húmicas.....	22
Figura 1.4 – Esquema do fracionamento da matéria orgânica e substâncias húmicas	24
Figura 1.5 - Exemplos de complexos organo-metálicos.	28
Figura 1.6 – Níveis de energia eletrônica molecular ⁶²	33
Figura 1.7 – Cromóforos presentes nas substâncias húmicas.	34
Figura 1.8 - Algumas vibrações típicas de átomos. Os sinais + e – significam vibrações perpendiculares ao plano do papel.	36
Figura 1.9 – Vista lateral de um detector ótico de deflexão. Tipicamente, o sistema é sensível até 0,01 mm quando a ponta varre a superfície da amostra ⁶²	47
Figura 1.10 – Projeto típico de um microscópio de força atômica (AFM) ⁶²	47
Figura 3.1 – Possíveis estruturas dos polímeros resultantes da reação de polimerização oxidativa da hidroquinona e p-benzoquinona em meio alcalino.....	61
Figura 3.2 – Espectros de FTIR da hidroquinona e ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona (AHSI).....	64
Figura 3.3 – Espectros de FTIR da p-benzoquinona e ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona (AHSII).....	65
Figura 3.4 – Espectros de FTIR da hidroquinona, ácido 4-aminobenzóico e ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).....	67
Figura 3.5 – Espectros de FTIR de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII), hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).....	68
Figura 3.6 – Espectro de RMN de ¹³ C das amostras sintetizadas a partir da hidroquinona(AHSI), p-benzoquinona (AHSII), de ácido húmico AH) extraídos de solo(AH1), hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).....	69
Figura 3.7 - Titulação condutométrica da amostra de AHSII (p-benzoquinona) titulado com NaOH 0,05260 mol L ⁻¹	70
Figura 3.8 – Titulação condutométrica da amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico) titulado com NaOH 0,102 mol L ⁻¹	71
Figura 3.9 – Curva de calibração do eletrodo de vidro: meio KCl/ eletrólito misto (KOH 0,03 mol L ⁻¹ , KCl ₃ COO 0,06 mol L ⁻¹ e KCl 0,038 mol L ⁻¹), força iônica 0,5 mol L ⁻¹ ... 73	73
Figura 3.10 – Curva Potenciométrica de 0,0505 g amostra de AHSII (p-benzoquinona), em força iônica 0,5 mol L ⁻¹ e titulado com uma solução mista de KOH 0,3 mol L ⁻¹ , KCl ₃ COO 0,06 mol L ⁻¹ e KCl 0,038 mol L ⁻¹	73
Figura 3.11 – Curva Derivativa (ver Figura 3.10) dos dados de potencial da titulação de 0,0505 g amostra de AHSII (p-benzoquinona), em força iônica 0,5 mol L ⁻¹ e titulado com uma solução mista de KOH 0,03 mol L ⁻¹ , KCl ₃ COO 0,06 mol L ⁻¹ e KCl 0,038 mol L ⁻¹ . Dados analisados utilizando o programa computacional Microcal Origin 6.0.. 74	74
Figura 3.12 – Curva Derivativa (ver Figs. 3.10 e 3.11) dos dados de potencial da titulação de 0,0505 g de amostra de AHSII (p-benzoquinona), em força iônica 0,5 mol L ⁻¹ e titulado com uma solução mista de KOH 0,03 mol L ⁻¹ , KCl ₃ COO 0,06 mol L ⁻¹ e KCl 0,038 mol L ⁻¹ . Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) e Microcal Origin 6.0.....	74

- Figura 3.13** – Curva potenciométrica de 50 mg de amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico), em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ 75
- Figura 3.14** – Curva Derivativa (ver Figura 3.13) dos dados de potencial da titulação de 50 mg amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico), em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional Microcal Origin 6.0. 75
- Figura 3.15** – Curva Derivativa (comparar com dados das Figuras 3.13 e 3.14) dos dados de potencial da titulação de 50 mg amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico), em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) com transferência de dados para Microcal Origin 6.0. 76
- Figura 3.16** – Gráfico $\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$ vs $\text{p}[\text{H}^+]_{\text{inter}}$ para a amostra de AHSII, em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) e Microcal Origin. 77
- Figura 3.17** – Gráfico $\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$ vs $\text{p}[\text{H}^+]_{\text{inter}}$ para a amostra de AHSIII, em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) e Microcal Origin. 78
- Figura 3.18** - Gráfico de percentagem de neutralização de cada grupamento ácido para a amostra de AHSII vs $\text{pK}'\text{s}$. Titulante solução mista KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ 80
- Figura 3.19** – Gráfico de percentagem de neutralização de cada grupamento ácido para a amostra de AHSIII vs $\text{pK}'\text{s}$. Titulante solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ 80
- Figura 3.20** – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona(AHSII) e com cobre complexado(AHSII-Cu). 83
- Figura 3.21** - Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona(AHSII) e com ferro complexado(AHSII-Fe). 83
- Figura 3.22** – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona(AHSII) e com manganês complexado(AHSII-Mn). 84
- Figura 3.23** – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico(AHSIII) e com cobre complexado(AHSIII-Cu). 84
- Figura 3.24** – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico(AHSIII) e com ferro complexado(AHSIII-Fe). 85
- Figura 3.25** – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico(AHSIII) e com manganês complexado(AHSIII-Mn). 85
- Figura 3.26** - Espectros de absorção na região de 200 a 800 nm (a) e na região de 400 a 800 nm (b) de ácido húmico (AH) extraído de solo (AH1) das amostras sintetizadas a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII) e hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII). 87
- Figura 3.27** - Espectros de absorção na região de 200 a 800 nm(a) e na região de 400 a 800 nm (b) de ácidos hpumicos sintetizados a partir da p-benzoquinona(AHSII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu), ferro (AHSII-Fe) e manganês (AHSII-Mn)... 87
- Figura 3.28** - Espectros de absorção na região de 200 a 800 nm(a) e na região de 400 a 800 nm(b) de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSIII-Cu), ferro (AHSIII-Fe) e manganês (AHSIII-Mn). 88

- Figura 3.29** – Cromatogramas de amostras de ácido húmico extraído de solo (AH1) e ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII), hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII). 90
- Figura 3.30** – Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu), ferro (AHSII-Fe) e manganês (AHSII-Mn). 91
- Figura 3.31** – Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSIII-Cu), ferro (AHSIII-Fe) e manganês (AHSIII-Mn). 92
- Figura 3.32** – Espectros de excitação com emissão em 500 nm de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) e a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu e AHSIII-Cu), ferro (AHSII-Fe e AHSIII-Fe) e manganês (AHSII-Mn e AHSIII-Mn). 95
- Figura 3.33** – Espectros de emissão com excitação em 330 nm de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) e a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu e AHSIII-Cu), ferro (AHSII-Fe e AHSIII-Fe) e manganês (AHSII-Mn e AHSIII-Mn). 97
- Figura 3.34** – Imagens de microscopia de força atômica de ácido húmico extraído de solo (AH1) sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato (5 x 5 μm) (a); imagem ampliada de uma região mostrando a distribuição de partículas na superfície da mica (1.5 x 1.5 μm) (b); análise de seção da imagem de ácido húmico (AH1) para partículas (c). 100
- Figura 3.35** – Imagem de microscopia de força atômica de ácido húmico sintético AHSII sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato. 102
- Figura 3.36** – Imagem de microscopia de força atômica de ácido húmico sintético AHSIII sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato. 102
- Figura 3.37** – Imagens de microscopia de força atômica de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) com metais complexados: (a) cobre (AHSII-Cu), (b) ferro (AHSII-Fe) e (c) manganês (AHSII-Mn), sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato. 103
- Figura 3.38** - Imagens de microscopia de força atômica de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) com metais complexados: (a) cobre (AHSIII-Cu), (b) ferro (AHSIII-Fe) e (c) manganês (AHSIII-Mn) sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato. 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Vantagens e limitações de alguns procedimentos de separação das substâncias húmicas ³⁶	25
Tabela 3.1 – Características físico-químicas das amostras de ácidos húmicos sintéticos (AHSI, AHSII e AHSIII) e ácido húmico natural extraído de solo (AH1).	63
Tabela 3.2 - Intensidades relativas (% da área total) das bandas nos espectros de RMN de ¹³ C VACP/MAS de amostras sólidas de AH natural (AH1) e AH sintético (AHSI, AHSII e AHSIII) mostrados na Figura 3.6.....	70
Tabela 3.3 – Valores de pK's correspondentes aos grupamentos ácidos da amostra AHSII. 79	
Tabela 3.4 – Valores de pK's correspondentes aos grupamentos ácidos da amostra AHSIII.79	
Tabela 3.5 - Porcentagem de neutralização para cada grupamento ácido da amostra AHSII.81	
Tabela 3.6 - Porcentagem de neutralização para cada grupamento ácido da amostra AHSIII.	81
Tabela 3.7 – Razão E ₄ /E ₆ das amostras de ácido húmico (AH) extraídos de solo (AH1), sintéticos (AHSI, AHSII e AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu e AHSIII-Cu), ferro (AHSII-Fe e AHSIII-Fe) e manganês (AHSII-Mn e AHSIII-Mn)....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

δ ppm	Deslocamento químico – parte por milhão
AFM	Microscopia de Força Atômica
AH	Ácido húmico
AHS	Ácido húmico sintético
CTC	Capacidade de troca catiônica
CP	Polarização cruzada
CP/MAS	Polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico
DD	Desacoplamento dipolar
E_4/E_6	Razão da absorbância em 465 e 665 nm
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
MO	Matéria Orgânica
Rf	radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SH	Substância Húmica
TFRMN	Ondas pulsadas com transformada de Fourier
UV-Visível	Ultravioleta-Visível
VACP/MAS	Polarização cruzada com amplitude variável e rotação no ângulo mágico

RESUMO

INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA ESTRUTURA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DETECTADOS POR ESPECTROSCOPIA envolveu um estudo em que, a partir de moléculas precursoras de substâncias húmicas (SH), prepararam-se e caracterizaram-se polímeros sintéticos comparáveis com amostras de ácidos húmicos (AH) extraídos de solo. Obteve-se um polímero com características análogas às dos ácidos húmicos através de reações de síntese, por meio de polimerização oxidativa em meio alcalino utilizando como precursores a hidroquinona, p-benzoquinona e o ácido 4-aminobenzóico. Através do polímero obtido estudaram-se as características estruturais comparáveis com os ácidos húmicos nos seguintes aspectos: influência dos íons metálicos Cu, Fe e Mn na estrutura do polímero sintetizado através de caracterização espectroscópica, Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Absorção de luz UV-Visível (UV-Vis), Fluorescência de Luz UV-Visível; experimentos com Cromatografia por Exclusão de Tamanho e Microscopia de Força Atômica com os ácidos húmicos naturais e sintetizados. O estudo das características estruturais das substâncias húmicas baseados em polímeros mostrou que a complexação de íons metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+}) influenciou na estrutura levando a um aumento no tamanho molecular observado através dos cromatogramas obtidos por Cromatografia de Exclusão de Tamanho. Os espectros de FTIR, UV-Vis. e Fluorescência de luz no UV-Visível dos ácidos húmicos sintéticos após a complexação de íons metálicos mostraram alterações nas bandas que estão associadas a mudanças estruturais, indicando a complexação dos íons metálicos principalmente com grupos fenólicos e carboxílicos presentes nos polímeros.

ABSTRACT

INFLUENCE OF METAL CATIONS IN THE STRUCTURE OF HUMIC SUBSTANCES AS DETECTED BY SPECTROSCOPY, involves a study by which starting from precursors of humic substances, some polymers were obtained, characterized and comparable with samples of humic acids. One such polymer with similar characteristics with humic acids was obtained by using as precursors hydroquinone, p-benzoquinone and 4-aminobenzoic acid, subjected to a synthesis under polymeric oxidation at an alkaline medium. The following structural characteristics of such polymers were studied in comparison with humic acids: influence of Cu, Fe and Mn cations in the structure of the synthesized polymers by spectral characteristics of Fourier Transform Infrared Spectroscopic (FTIR), absorbance with UV-Vis light, fluorescence; experiments with Size Exclusion Chromatography (SEC) and Atomic Force Microscopy (AFM) with the polymers and humic acids. It has been found that the complexation with the Cu, Fe and Mn cations has affected the structure by increasing the molecular size as observed by the Size Exclusion Chromatography. After complexation with the metal cations the FTIR, UV-Vis and Fluorescence spectra has shown significant changes due to structural modifications, which indicates complex formation specially with the carboxylic and phenol groups found in the obtained polymers.

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Qual componente do solo que retém água, complexa íons metálicos, reage com compostos orgânicos, fotosintetiza reações do solo, estimula o crescimento das plantas e biotransforma poluentes tóxicos? A resposta é o biomaterial do solo marrom escuro chamado substâncias húmicas, que é um componente essencial produzido pelo solo.

As substâncias húmicas (SH) estão perto de ser o mais abundante dos componentes orgânicos da natureza. Elas estão presentes em todos os solos e águas naturais que contêm matéria orgânica (MO). Os cientistas têm interesse na química das substâncias húmicas e desde instrumentação até procedimentos químicos para estudos da sua composição estão disponíveis, mas existe um interesse maior por causa do reconhecido perigo para a saúde dos produtos de cloração, como os trihalometanos, formados com as substâncias húmicas na água¹. Com relação ao gás carbônico (CO₂) atmosférico a formação de substâncias húmicas é um meio de sequestrar carbono no solo, armazenando-o, e contribuindo para minimizar o aquecimento global. Estimativas da massa total de carbono orgânico do solo² variam de $1,22 \cdot 10^{18}$ g a $2,456 \cdot 10^{18}$ g de carbono³. Este reservatório, que excede a quantidade em todos os demais reservatórios superficiais, interage com a atmosfera e afeta seu conteúdo em CO₂. Logo a estabilidade da matéria orgânica do solo e os efeitos da atividade humana sobre ela devem ser levados em consideração ao pensar-se na elevação da concentração de CO₂ atmosférico⁴.

Cada vez mais as crescentes concentrações de CO₂ na atmosfera se relacionam com mudanças climáticas de dimensões e custos imprevisíveis, expressos nas conseqüências para saúde humana e aspectos sociais e econômicos. Dentro deste contexto, o estudo da estrutura das substâncias

húmicas pode dar contribuição relevante para a proteção do meio ambiente, na medida em que se conseguir aumentar a fixação de C no solo, na forma de matéria orgânica estável^{5,6}. Também PICCOLO *et al.*⁷ mostraram em experiências de laboratório, que a possibilidade de aumentar os teores de matéria húmica hidrofóbica no solo pode diminuir a emissão de CO₂. Substâncias húmicas recalcitrantes, ácidos húmicos e humina em particular, representam a reserva de matéria orgânica do solo, com meia vida de residência de 100 anos⁸.

Recentes avanços⁹ indicam que a razão da existência de polímeros de alta massa molar esta relacionada com associações de moléculas heterogêneas estabilizadas por interações hidrofóbicas, aparentando ter alta massa molar e alto tamanho molecular. Visto que as interações hidrofóbicas nas moléculas húmicas parecem ser a principal causa da bioresistência das substâncias húmicas e seu longo tempo de acumulação no solo, as hipóteses são que um tratamento do solo com matéria húmica adequada pode reduzir a mineralização da matéria orgânica do solo pelo aumento do seqüestro do carbono orgânico em domínios hidrofóbicos.

A habilidade dos solos em reter água e estimular o crescimento das plantas depende da MO e especialmente das substâncias húmicas. Solos aráveis contêm mais de 10% de MO e as substâncias húmicas podem compor mais que 80% da MO de um solo e por essa razão essas substâncias podem ter um profundo papel nos aspectos físicos e químicos do solo. É reconhecido, por exemplo, que substâncias húmicas e possivelmente também polissacarídeos, têm um papel fundamental com relação a formação dos agregados e estabilização do solo.

Substâncias húmicas estão sujeitas a agregação e ao fenômeno de dispersão em meio aquoso, os quais são relevantes para seu comportamento físico e reatividade química. A condição de irregularidade exibida pela superfície das macromoléculas húmicas tem importante influência no número, tipo e disponibilidade de sítios química e fisicamente reativos, em atividades

catalíticas e capacidade de adsorção das substâncias húmicas, e também na interação que pode ocorrer entre as substâncias húmicas e superfícies de minerais, íons metálicos, compostos orgânicos, raízes de plantas e microrganismos no solo¹⁰.

Não é de se admirar que esta classe de substâncias naturais tem sido objeto de estudo há mais de 100 anos. O interesse científico nas substâncias húmicas se expande continuamente apesar dos obstáculos inerentes. Por causa da abundância das SH na natureza e por causa do papel que elas têm nos solos e águas do meio ambiente, estudos da sua composição e estrutura podem ser bem justificados. Em termos práticos, estudos são fundamentais para um entendimento dos mecanismos dos vários papéis que as SH têm no meio ambiente. Por exemplo, é importante saber que componentes das SH são responsáveis por alguns dos principais processos em solos e águas, e a proporção desses componentes em uma fonte húmica. Para estudos estruturais significativos, é desejável se ter substâncias puras. No entanto, SH são grandes misturas cuja separação em discretas substâncias é um desafio constante. Por exemplo, diferentemente de muitas outras classes de compostos orgânicos que ocorrem naturalmente, as SH não são definidas em termos de sua composição química total ou conteúdo de grupos funcionais. Em vez disso, elas são definidas em termos de seu comportamento com relação a solubilidade e insolubilidade em sistemas aquosos. Esta definição, muitas vezes, se torna insatisfatória porque pode incluir uma grande ordem de compostos orgânicos que podem ou não ser SH. Inevitavelmente, isto é uma potencial fonte de confusão e incerteza nos estudos das SH. Essas observações nos mostram a complexidade com relação ao entendimento das SH.

1.2 OBJETIVOS

Na condição de se obter mais informações com respeito à estrutura química de substâncias húmicas, vêm sendo utilizados compostos sintéticos com

cadeias poliméricas que possuem características análogas às das substâncias húmicas, como polímeros fenólicos^{11,12} entre outros^{13,14,15}. Com o propósito de um melhor entendimento da estrutura das substâncias húmicas, foi feito o estudo das mesmas por meio destes modelos.

Os objetivos deste trabalho foram estudar a influência de íons metálicos na estrutura e conformação final de polímeros sintetizados, com características análogas às das substâncias húmicas, por meio de caracterização espectroscópica e microscopia de força atômica; e realizar estudos utilizando cromatografia por exclusão de tamanho, métodos espectroscópicos na tentativa de avançar no entendimento da estrutura das substâncias húmicas e ainda algumas titulações condutométricas e potenciométricas para estimar a reserva ácida titulável e as afinidades protônicas de sítios ativos.

1.3 AS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As substâncias húmicas variam em sua composição, dependendo da fonte, método de extração e outros parâmetros, no entanto, as semelhanças entre elas são mais pronunciadas do que as diferenças. Substâncias húmicas apresentam uma estrutura química complexa, são amorfas, de cor escura, hidrofílicas, parcialmente aromáticas, e sua massa molar varia desde poucas centenas a milhares de unidades de massa atômica¹⁶.

Praticamente todos os solos, sedimentos e águas naturais contêm uma série de compostos orgânicos naturais que tem, há algum tempo, sido chamados de (no solo) matéria orgânica, húmus, substâncias húmicas, ou no caso de águas naturais, carbono orgânico dissolvido. Historicamente, os compostos orgânicos de solos foram isolados e estudados primeiro. KONONOVA¹⁷ publicou o desenvolvimento histórico do estudo da matéria orgânica do solo (húmus). Foi reconhecido facilmente que o húmus é resultado principalmente da degradação de tecidos de plantas mortas. Esses organismos mortos consistem de 50-60% de celulose, 15-20% ligninas e 15-20% lipídeos¹⁸.

Muitos trabalhos consideram que os constituintes do húmus podem ser os produtos finais de reações sintéticas que alteram a estrutura dos produtos da degradação das plantas. Outros autores, porém, suspeitam que o húmus é uma complexa mistura dos produtos da degradação de plantas. Esta controvérsia tem persistido. STEVENSON¹⁹ define substâncias húmicas do solo como “Uma série de substâncias de massa molar relativamente alta, de coloração amarela para preto, formada por reações de sínteses secundárias”. Ele sugere três caminhos para a formação das SH. No primeiro deles, amino compostos formados através de sínteses por microrganismos reagem com ligninas modificadas. No segundo, polifenóis oxidados para quinonas reagem com amino compostos e no terceiro açúcares reduzidos reagem com amino compostos para sintetizar macromoléculas complexas de coloração escura. WERSHAW²⁰ de outra maneira, propõe que o húmus do solo consiste de fragmentos oxidados de plantas. Estes fragmentos são compostos relativamente de segmentos inalterados de plantas que são oxidados para segmentos finais com um ou mais grupos de ácidos carboxílicos. Transformações oxidativas podem fornecer uma variedade de grupos funcionais reativos, especialmente grupos carbonílicos e carboxílicos. No caso da lignina, por exemplo, as partes inalteradas são relativamente não polares (hidrofóbicas) e os segmentos oxidados são polares (hidrofilicos). Então, a lignina transformada é anfifílica (com partes hidrofóbica e hidrofílica separadas) e podem exibir propriedades superficiais ativas. ZECH *et al.*²¹ discutiram modificações em resíduos de plantas durante o processo de humificação, e estas, entre outras mudanças, incluem oxidações e transformações das cadeias laterais da lignina, a demetilação de ligninas, a remoção de material como carboidratos e a conversão de produtos do tipo catecol para quinonas.

Segundo a literatura internacional e a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas, é bem aceita a idéia de classificar as substâncias húmicas com base na sua solubilidade, podendo ser dividida em três frações principais: i)

ácido húmico que é definido como a fração das substâncias húmicas que é solúvel em meio alcalino diluído e precipitado pela acidificação do extrato alcalino e sua cor varia desde marrom escuro até preto; ii) ácido fúlvico que é a fração que permanece em solução quando o extrato alcalino é acidificado e sua cor varia desde amarelo até amarelo-marrom; iii) e a humina que é a fração que não pode ser extraída dos solos e sedimentos por diluição básica ou ácida e tem cor preta¹⁹.

As substâncias húmicas possuem características importantes como: alta capacidade de retenção de água, com importante papel regulador para evitar processos erosivos no solo; retenção de calor devido a sua coloração escura, beneficiando a germinação de sementes e o desenvolvimento de raízes; aeração do solo devido aos agregados oriundos da combinação das SH com argilas; alta capacidade de troca catiônica (CTC), sendo que na maioria das situações, as SH são a principal reguladora da CTC do solo; complexação ou quelação com pesticidas e metais pesados, diminuindo as concentrações desses materiais e, conseqüentemente, a toxicidade no solo; formação de complexos com íons micronutrientes de plantas (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo e outros) o que permite a migração dos mesmos e os torna biodisponíveis²².

1.3.1 Estrutura das Substâncias Húmicas

No final do século XIX, já se compreendiam as SH como uma mistura complexa de substâncias orgânicas com natureza principalmente coloidal e com propriedades fracamente ácidas. Também já se tinha informações a respeito da sua interação com outros componentes do solo¹⁹.

No início do século XX a proposta de uma estrutura e da natureza química das SH foram temas de inúmeros trabalhos. A origem das SH também foi tema de interesse nesse período. Prevaleciam duas teorias principais, a primeira delas é que as SH teriam a lignina como precursor e a segunda que celulose ou açúcares simples seriam as fontes das SH. De acordo com

MAILLARD¹⁹, as SH encontradas na natureza seriam o resultado de reações puramente químicas no qual os microorganismos não teriam envolvimento direto, exceto na produção de açúcares de carboidratos e aminoácidos de proteínas. Esta reação entre açúcares redutores e aminoácidos ou aminas para formar polímeros nitrogenados escuros mostrou-se de grande importância na desidratação comercial de produtos alimentares e é conhecida como reação de Maillard¹⁹.

A idéia de que a lignina seria precursor dos ácidos húmicos avançou com Fuchs e outros pesquisadores¹⁹. A teoria foi adotada e teve grande influência na química das SH por algumas décadas. Fuchs propôs uma estrutura química das SH (Figura 1.1) muito citada na literatura¹⁹.

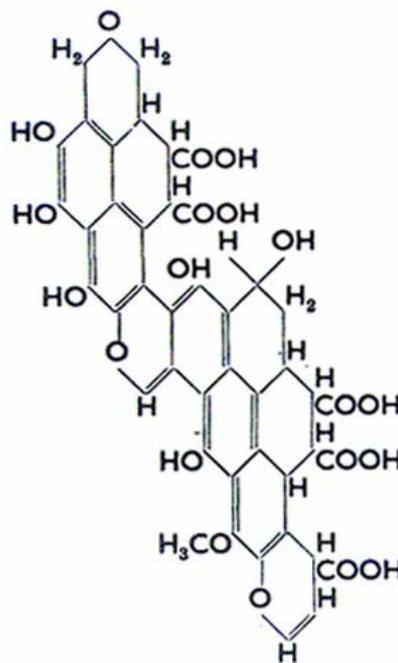


Figura 1.1 – Estrutura das substâncias húmicas proposta por Fuchs¹⁹.

Embora já se conheça a composição elementar e os grupos funcionais que compõem as SH, ainda hoje não existe uma estrutura definitiva. Muitas estruturas foram propostas, cada uma delas foi caracterizada por grupos funcionais similares e a presença de componentes alifáticos e aromáticos.

Baseados em uma variedade de técnicas e análises SCHULTEN e SCHNITZER²³ propuseram uma estrutura para as SH (Figura 1.2).

Neste modelo (Figura 1.2) o oxigênio está presente como grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos, esteres e éteres, nitrogênio está presente como estruturas heterocíclicas e como nitrilas. A composição elementar da estrutura das SH na Figura 1.2 é $C_{308}H_{328}O_{90}N_5$ e tem tamanho molecular de 5540 Da.

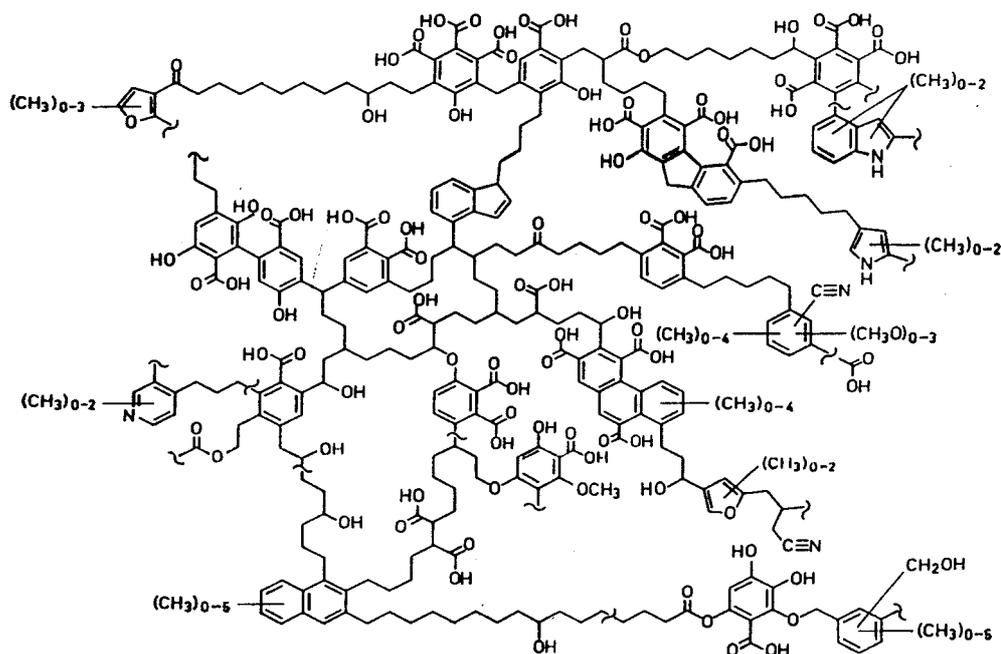


Figura 1.2 – Modelo de ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer²³.

Até há alguns anos, as substâncias húmicas eram consideradas como polímeros macromoleculares^{16,19,23}. As afirmações e citações feitas anteriormente foram baseadas na proposta que substâncias húmicas seriam macromoléculas orgânicas, com características similares às macromoléculas biológicas como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lignina. SCHNITZER E KHAN²⁴ e, mais recentemente, SCHULTEN E SCHNITZER²⁵ e também SEIN *et al.*²⁶ propuseram a existência de espaços vazios (Figura 1.3) de diferentes tamanhos, onde poderiam ser alojados outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, como carboidratos e materiais

proteínáceos, lipídios, agrotóxicos e outros poluentes. Poderiam também estar presentes elementos inorgânicos como argilas e óxidos-hidróxidos.

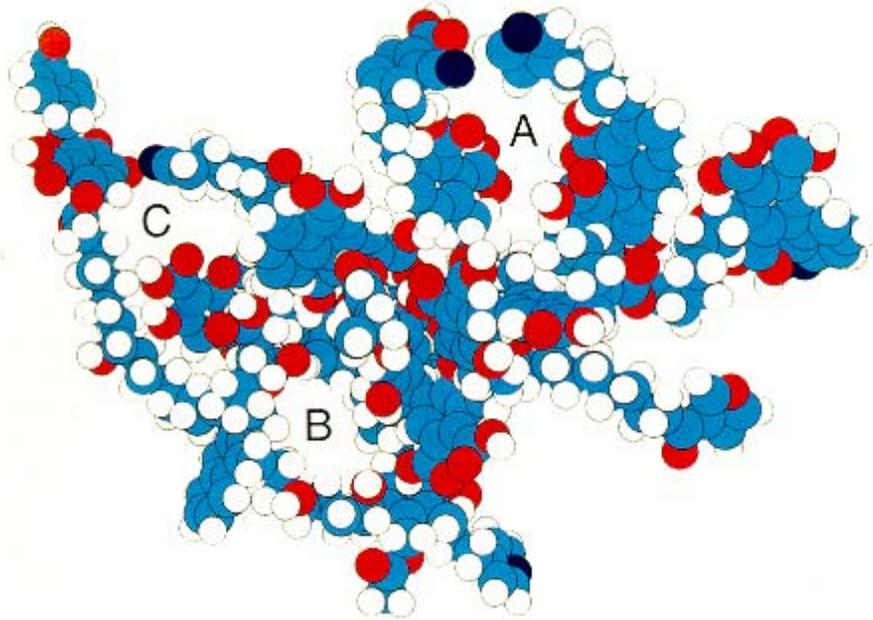


Figura 1.3 – Modelo tridimensional de ácidos húmicos proposto por Schulten & Schnitzer²⁵, C=cinza claro, O=cinza escuro, N=preto e H=branco. As letras A,B e C indicam os espaços vazios presentes, provavelmente, na estrutura das substâncias húmicas.

WERSHAW²⁷ foi o primeiro a postular uma descrição alternativa para a estrutura molecular das substâncias húmicas. Ele propôs²⁸ que as substâncias húmicas, sendo anfifílicas, formam misturas de agregados de moléculas em solução. Em sua opinião, agregados húmicos são mantidos por mecanismos de ligação como as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Por considerar o conceito micelar bem estabelecido^{28,29,30,31}, ele sugere que agregados húmicos são semelhantes às micelas as quais possuem interiores preferencialmente compostos por porções hidrofóbicas e os componentes carregados estão posicionados na superfície externa. ENGBRETSON e WANDRUSKA³² usando fluorescência e pireno em seus estudos, mostraram evidências experimentais em favor do modelo de micelas. PICOLLO *et al.*^{33,34} e HENWORTHY e HAYES³⁵ foram os primeiros a mostrar que a estrutura macromolecular das substâncias húmicas pode não ser inteiramente polimérica. O grande tamanho molecular geralmente observado

pode ser considerado como um resultado de associações de pequenas moléculas influenciadas por forças fracas tais como ligações de hidrogênio, que podem ser facilmente desfeitas⁹.

1.3.2 Fracionamento das Substâncias Húmicas

Para poder estudar as SH adequadamente faz-se necessário separá-las dos componentes inorgânicos presentes no solo. Segundo STEVENSON¹⁹, o método ideal de extração é aquele que: 1) levasse ao isolamento do material inalterado; 2) fornecesse um extrato livre de contaminantes inorgânicos, como areia e cátions polivalentes; 3) obtivesse frações representativas de toda a amplitude de massas molares; 4) fosse um método aplicável a todos os solos.

O esquema de separação clássico da MO (Figura 1.4) envolve a precipitação das SH por ajuste do pH, adição de solventes orgânicos ou adição de íons metálicos. O método sugerido pela IHSS - International Humic Substances Society é o de solubilização da matéria orgânica do solo em solução de hidróxido de sódio (NaOH) e fracionamento desta baseado nas características de solubilidade das SH. Da extração álcali geralmente feita com soluções de NaOH que é baseada no princípio da solubilidade das SH, obtém-se os ácidos fúlvicos solúveis a qualquer pH, os ácidos húmicos solúveis apenas em meio alcalino e as huminas insolúveis a qualquer valor de pH. A solubilização das SH em meio alcalino provavelmente seja devida a conversão dos grupos ácidos em íons com subsequente formação de uma solução física. Sais de cátions polivalentes não são solúveis¹⁹. Segundo STEVENSON¹⁹ as principais desvantagens são: (a) a dissolução da sílica mineral e de tecidos orgânicos frescos que contaminariam o extrato; (b) a autooxidação de alguns constituintes orgânicos no contato do extrato alcalino com o ar; (c) além de outras alterações químicas que poderiam ocorrer em meio alcalino como a condensação entre aminoácidos e os grupos C=O de aldeídos aromáticos ou quinonas levando à formação de compostos semelhantes às SH por reações de escurecimento.

Problemas relacionados a autooxidação podem ser minimizados realizando-se todas as etapas em uma atmosfera de gás inerte, por exemplo N_2 .

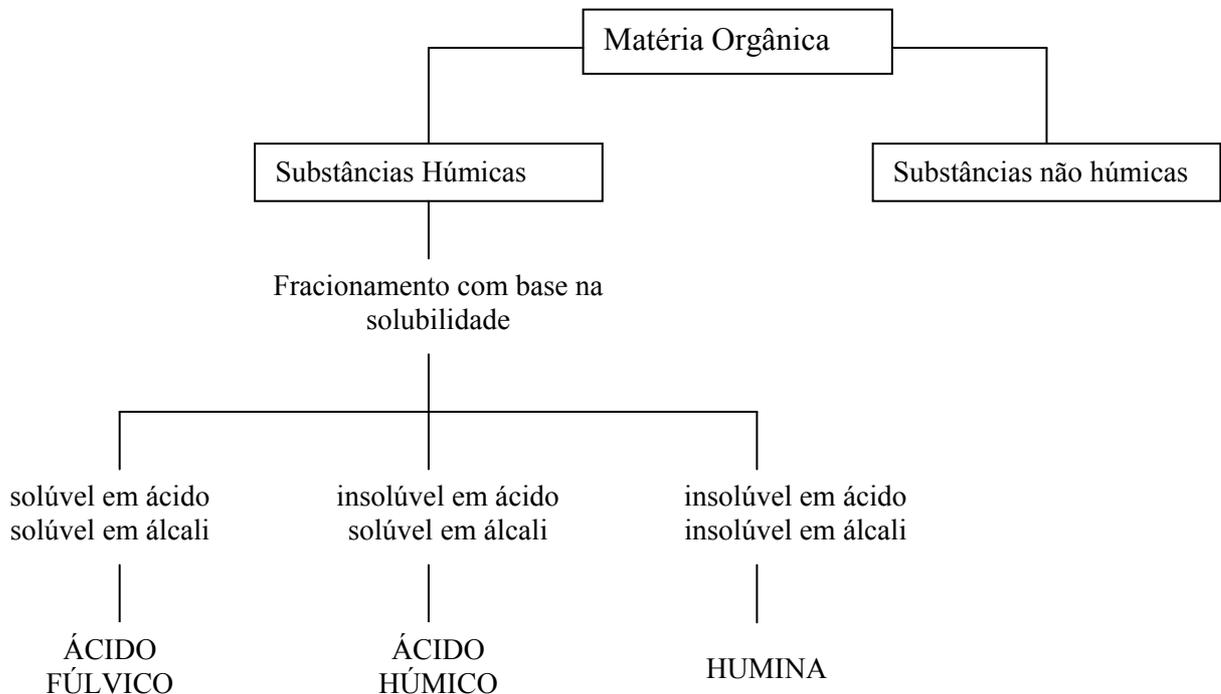


Figura 1.4 – Esquema do fracionamento da matéria orgânica e substâncias húmicas³⁶.

O fracionamento das SH também pode ser feito utilizando a polaridade, tamanho molecular e diferenças de densidade de carga. As SH também podem ser extraídas utilizando cromatografia de permeação em gel, membranas de ultrafiltração, adsorção em resinas hidrofóbicas (XAD, polímero metilmetacrilato), adsorção por resinas de troca, adsorção em carvão e Al_2O_3 . Nas diversas técnicas utilizadas para o fracionamento das SH há vantagens e desvantagens. A Tabela 1.1 mostra algumas técnicas de fracionamento das SH, suas vantagens e limitações³⁶.

Tabela 1.1 - Vantagens e limitações de alguns procedimentos de separação das substâncias húmicas³⁶.

Métodos	Vantagens	Limitações
Concentração por resfriamento	Todos COD (carbono orgânico dissolvido) concentrados	Lento, procedimento tedioso, concentra inorgânicos
Extração líquida	Remoção da cor visual	Não é quantitativo para COD, lenta, com grandes volumes
Ultrafiltração	Também separa por peso molecular	Lenta
Forte troca aniônica	Sorção eficiente	Não desorve completamente
Carvão	Sorção eficiente	Não desorve completamente
Fraca troca aniônica	Adsorve e desorve eficientemente	Perda de COD
Resina XAD	Adsorve e desorve eficientemente	Resina deve estar sempre limpa para resultar em baixa “sangria” de COD

1.3.3 . Modelos Sintéticos de Ácidos Húmicos

Com a finalidade de se obter informações com respeito à estrutura química das substâncias húmicas, vêm sendo utilizados compostos sintéticos com cadeias poliméricas que possuam características análogas às das substâncias húmicas, como polímeros fenólicos^{11, 12, 37} entre outros^{13,14,15}.

Muitos modelos do tipo polimérico de substâncias húmicas têm sido preparados artificialmente, produzidos usando enzimas como catalisadores ou por reações de polimerização auto-oxidativa usando compostos altamente reativos como os hidroxifenóis. Compostos fenólicos identificados, como um

derivado de lignina ou sintetizado por microrganismos, têm sido polimerizados em reações com misturas contendo de dez a vinte cinco substâncias diferentes³⁸.

MARTIN *et al.*³⁹ constataram que o procedimento utilizando peroxidase – H₂O₂ usado para preparar ligninas também podia ser usado para sintetizar modelos poliméricos de ácidos húmicos. Testes preliminares mostraram que foi possível e que o rendimento polimérico foi melhor que aqueles obtidos com fungos fenoloxidase.

Com o objetivo de estudar as propriedades, compará-los com ácidos húmicos naturais e estudar a degradação no solo de um carbono específico usando unidades estruturais de ¹⁴C, foram preparados modelos de ácido húmico mais simples e mais complexos utilizando polímeros fenólicos. Alguns desses modelos poliméricos foram preparados por autooxidação de misturas fenólicas a pH elevado, outros foram preparados a pH 6,5 usando fungo fenolase como agente oxidante^{40, 41}.

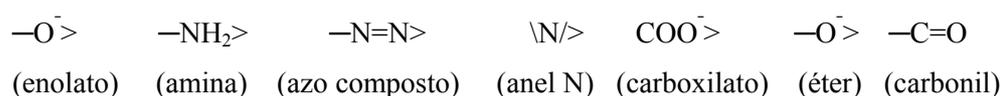
Usando polímeros como modelo, BRANNON e SOMMERS⁴² relataram um caminho para a estabilização de P orgânico no solo. A estabilização envolve a incorporação de compostos orgânicos contendo grupos funcionais amina e ester de fosfato em macromoléculas de ácido húmico via polimerização oxidativa. Eles estimaram que aproximadamente 80% do fósforo orgânico adicionado foi estabilizado e protegido do ataque microbial, a porção residual ficou facilmente acessível e, conseqüentemente, sujeita a rápida biodegradação.

ZUNINO *et al.*⁴³ utilizaram modelos de ácidos húmico e fúlvico do tipo polimérico para estudar o comportamento competitivo de Zn²⁺ e Mg²⁺. Eles sugeriram que grande progresso nos estudos de metais pode ser feito usando polímero como modelos similares as SH, no qual os sítios de ligação são melhores definidos, pois os grupos funcionais e os átomos doadores de elétrons podem ser definidos usando precursores específicos. Polímeros que contém grande número de OH fenólicos ou grupos OH e COOH podem ser preparados,

alguns possuindo somente oxigênio como doadores de elétrons e outros com adição de nitrogênio e enxofre utilizando determinados tipos de precursores.

1.3.4 . Interações com Íons Metálicos

Uma das mais importantes propriedades das substâncias húmicas é a sua capacidade de interagir com íons metálicos do solo, tanto nutrientes quanto tóxicos, para formar complexos organometálicos e quelatos de diferentes estabilidades e características estruturais⁴⁴, podendo até mesmo controlar sua disponibilidade para as plantas. De modo geral, em solos minerais, pode-se esperar que mais de 50% do total dos elementos traços esteja associado a matéria orgânica⁴⁵. A complexação de íons metálicos pelas SH é extremamente importante para a retenção e mobilidade dos contaminantes em solos e águas³⁶. Interações entre SH e metais têm sido descritas como troca de íons, sorção superficial, quelação, coagulação e peptização⁴⁵. Os grupos funcionais das SH possuem diferentes afinidades por íons metálicos na ordem crescente como se mostra abaixo³⁶:



Apesar do conhecimento da existência da interação das substâncias húmicas com íons metálicos²², a natureza e extensão dessas interações não são completamente entendidas. O cátion pode estar ligado a dois ou mais ligantes de diferentes moléculas⁴⁵.

Praticamente todos os aspectos da química e da reatividade de elementos traços no solo estão relacionados à formação de complexos estáveis com substâncias orgânicas¹⁹. Enquanto cátions monovalentes (Na^+ , K^+ , etc.) são mantidos principalmente pela simples formação de sais por reações de troca de cátions envolvendo grupos tais como carboxílicos e fenólicos. Cátions

polivalentes (Cu^{2+} , Fe^{3+} e outros), podem formar ligações coordenadas com moléculas orgânicas.

A Figura 1.5 mostra duas propostas de ligação com o Cu^{2+} , a primeira com ligantes nitrogenados (a), mais estável e portanto menos disponível para as plantas e a segunda (b), com ligantes oxigenados, menos estável⁴⁶.

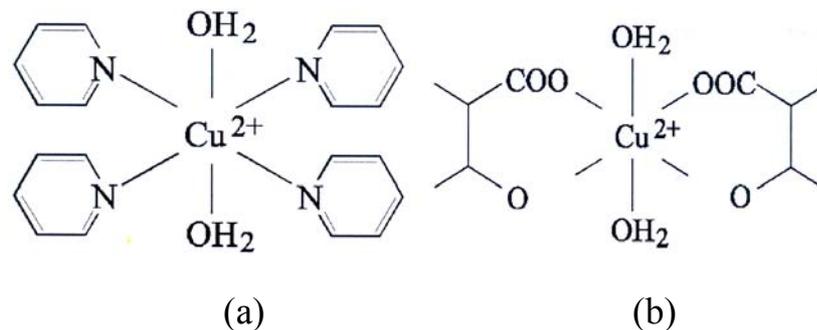


Figura 1.5 - Exemplos de complexos organo-metálicos⁴⁷.

Íons metálicos também causam agregação de matéria orgânica natural em solução⁴⁸. RYAN e WEBER⁴⁹ mostraram que a adição de íons de cobre em ácido fúlvico diluído, aumentou significativamente a quantidade do espalhamento pela solução. Os autores atribuíram o aumento de espalhamento aos agregados. Não foram feitas tentativas de medidas do tamanho dos agregados.

Espectroscopia e outros métodos físico-químicos aplicados às substâncias húmicas mostram que existem quatro principais características estruturais dos ácidos húmicos e fúlvicos influenciando suas reatividades químicas⁵⁰:

Polifuncionalidade: que representa a existência de vários grupos funcionais, com reatividades diferentes, que são representativos de uma mistura heterogênea de polímeros que interagem entre si;

Carga macromolecular: possui caráter aniônico, produzindo efeitos na reatividade dos grupos funcionais e na conformação molecular;

Hidrofilicidade: a tendência que as substâncias húmicas possuem de formarem fortes ligações de hidrogênio com moléculas de água do meio, desta forma, solvatando grupos funcionais como COOH e OH;

Labilidade estrutural: devido à capacidade de associações intermoleculares e de mudanças conformacionais em resposta a mudanças de pH, condições redox, concentração iônica e ligações químicas.

O esclarecimento dos mecanismos de agregação molecular das substâncias húmicas é um importante elemento para o entendimento das interações das substâncias húmicas em solos e águas⁴⁸.

A estrutura de íons metálicos com ácidos húmicos de diferentes tamanhos moleculares têm sido investigados espectroscopicamente e as constantes de ligação mostram um aumento do tamanho molecular, ainda que as frações tenham pouco carboxilato (meq g^{-1})^{51,52}. Estes resultados podem refletir em diferenças na natureza dos sítios de ligações em frações de diferentes tamanhos moleculares e efetuar mudanças na estrutura tridimensional dos ácidos húmicos. Assim, diferenças substanciais associadas com as frações de diferentes tamanhos moleculares dos ácidos húmicos indicam a importância da caracterização das propriedades em ordem de tamanho das frações⁵³ para melhor interpretar as formas de ligações de íons metálicos.

1.4 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS NO ESTUDO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Substâncias húmicas são caracterizadas por técnicas analíticas, tais como composição elementar, caráter de protonação, massa e tamanho molecular, datação por ^{14}C , produtos de degradação oxidativa, capacidade de complexação de metal¹⁹. Porém, também são bastante utilizadas técnicas espectroscópicas para a caracterização da matéria orgânica humificada do solo.

As SH absorvem na região do ultravioleta e a absorbância aumenta com a diminuição do comprimento de onda. As bandas de absorção são relativamente descaracterizadas e fornecem pouca informação composicional de

valor. A espectroscopia de UV-Vis fornece valores de razão que podem ter alguma relevância para comparações entre amostras de SH, e frações de amostras de diferentes fontes e meio ambiente. A razão E_4/E_6 (absorbância em 465/665 nm) é vastamente usada¹⁹.

Espectroscopia de fluorescência tem sido, atualmente, amplamente utilizada para estudar as substâncias húmicas. ZSOLNAY *et al.*⁵⁴ e KALBITS *et al.*⁵⁵ utilizaram a técnica para avaliação do grau de humificação e tamanho molecular das substâncias húmicas. SENESI *et al.*⁵⁶ propuseram utilizar as propriedades fluorescentes das substâncias húmicas para estabelecer critérios para a diferenciação e classificação das mesmas e MILORI *et al.*⁵⁷ avaliaram a utilização da técnica na determinação do grau de humificação de ácidos húmicos.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma poderosa ferramenta que permite interpretações dos aspectos da composição e estrutura da SH. Espectros obtidos para SH geralmente apresentam bandas largas e mal resolvidas, possivelmente causadas por sua extrema complexidade molecular. Avanços foram feitos com relação a técnica como ondas pulsadas com transformada de Fourier (TF RMN), desacoplamento dipolar (DD), polarização cruzada (CP) e polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (CP/MAS). Esses avanços proporcionam a aquisição de espectros mais definidos para os grupos funcionais. Existem várias revisões das aplicações de RMN^{19,58,59}. A CPMAS e RMN de ^{13}C tem sido atualmente muito usada para estudo das SH. O uso de CPMAS e RMN de ^{13}C proporcionam melhores espectros e permite comparações entre as amostras. Por causa da largura das bandas, interações entre os átomos não podem ser detectadas tão efetivamente como para RMN em estado líquido.

A espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) tem contribuído para a identificação de grupos funcionais, como

hidroxílicos, carboxílicos, caboxilatos, polissacarídeos, alifáticos, aminas, entre outros, e seus envoltamentos em interações com metais⁶⁰.

Ácidos húmicos e fúlvicos possuem espectros similares, sendo a principal diferença a intensidade da banda em 1.720 cm^{-1} que é consideravelmente maior no ácido fúlvico por causa da ocorrência de mais grupos COOH. Também a banda em 1.600 cm^{-1} é centrada em frequências mais altas (1.620 cm^{-1}) nos ácidos fúlvicos¹⁹.

STEVENSON e GOH classificaram os espectros de infravermelho das SH em três tipos gerais¹⁹:

Tipo I: Esses espectros são típicos de ácidos húmicos. Bandas intensas são encontradas perto de 3.900 , 2.900 , 1.720 , 1.600 e 1.200 cm^{-1} . A banda em 1.600 cm^{-1} tem intensidade aproximadamente igual a banda em 1.720 cm^{-1} .

Tipo II: Esses espectros mostram ácidos fúlvicos de baixa massa molecular. São caracterizados por grandes absorções próximas de 1.720 cm^{-1} . Outra característica é que a absorção na região de 1.600 cm^{-1} é fraca e deslocada para perto de 1.640 cm^{-1} .

Tipo III: Além das bandas de absorção fortes encontradas nos espectros do Tipo I e II, bandas fortes aparecem perto de 1.540 cm^{-1} . Absorção próxima a 2.900 cm^{-1} (absorção de C-H alifáticos) é também mais pronunciada. Uma única característica desses espectros é a presença de bandas indicativas de proteínas e carboidratos.

1.4.1 Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível

Espectros eletrônicos envolvem transições entre diferentes níveis de energia dos orbitais moleculares. Radiação eletromagnética causa elétrons oscilantes em resposta ao campo elétrico incidente. Se a frequência induzida de oscilação coincide (isto é, entra em ressonância) com a diferença de energia dos

dois estados de energia eletrônicos, a probabilidade de uma transição se torna alta⁶¹.

A absorção de radiação ultravioleta ou visível geralmente resulta da excitação de elétrons de ligação; como conseqüência, os comprimentos de onda dos picos de absorção podem ser correlacionados com os tipos de ligações nas espécies em estudo. A espectroscopia de absorção molecular é, portanto, valiosa para identificar grupos funcionais em uma molécula. Mais importantes, no entanto, são as aplicações da espectroscopia de absorção ultravioleta e visível na determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes⁶².

Existem três tipos de transições eletrônicas que envolvem: elétrons π , σ e η , elétrons d e f e transferência de carga⁶².

Os níveis eletrônicos de energia de moléculas são descritos pelos orbitais moleculares. Quando um elétron sofre uma transição ele é transferido de um orbital para outro. Contudo, há casos em que podemos considerar a excitação localizada em uma ligação particular ou a grupos de átomos.

Conforme mostrado na Figura 1.6, as energias dos vários tipos de orbitais moleculares diferem significativamente. Quase sempre o nível de energia de um elétron não-ligante situa-se entre os níveis de energia dos orbitais σ e π ligantes e antiligantes. As transições eletrônicas entre certos níveis de energia podem ocorrer por absorção de radiação. As transições possíveis de serem observadas nos espectros eletrônicos são: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\eta \rightarrow \sigma^*$, $\eta \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Destas transições, a $\sigma \rightarrow \sigma^*$ é o único tipo que pode ocorrer com elétrons envolvidos em ligações simples, por exemplo, o metano, que contém apenas ligações simples C–H e pode, portanto, sofrer apenas transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$, apresenta um máximo de absorção em 125 nm. Em relação a outras transições possíveis, a energia necessária para induzir uma transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ é alta, correspondendo a freqüências na região ultravioleta de vácuo. As transições $\eta \rightarrow \sigma^*$ ocorrem em geral em compostos saturados contendo átomos com pares de elétrons não compartilhados, tais como oxigênio, nitrogênio e enxofre. Em geral

essas transições requerem menos energia que o tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e podem ser produzidas por radiação na região entre 150 e 250 nm, com a maior parte dos picos aparecendo abaixo de 200 nm. As transições $\eta \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ são consideradas intensas, a maioria das aplicações da espectroscopia de absorção a compostos orgânicos esta baseada em transições de elétrons η e π para o estado excitado π^* , porque as energias necessárias para esses processos situam-se em uma região espectral experimentalmente conveniente (200 a 700 nm). Ambas as transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π^{62} .

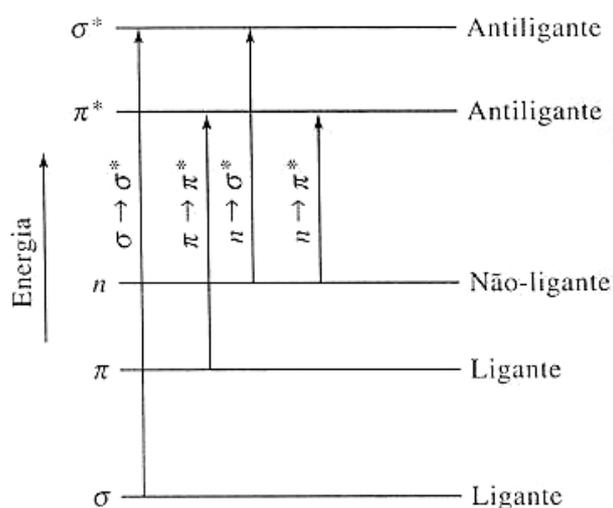


Figura 1.6 – Níveis de energia eletrônica molecular⁶².

A absorção de radiação visível e de ultravioleta de maior comprimento de onda está restrita a um número limitado de grupos funcionais (chamados cromóforos) que contêm elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas. Os elétrons que contribuem para a absorção por uma molécula orgânica são aqueles que participam diretamente na formação de ligação entre átomos e, portanto, estão associados a mais de um átomo e elétrons não-ligantes ou isolados externos que estão comumente localizados em átomos, como oxigênio, halogênios, enxofre e nitrogênio⁶².

Os grupos responsáveis pela cor escura das SH ainda não estão completamente estabelecidos, mas se suspeita de uma combinação de vários tipos de estruturas (Figura 1.7). Alguns dos grupos mais comuns são¹⁹:

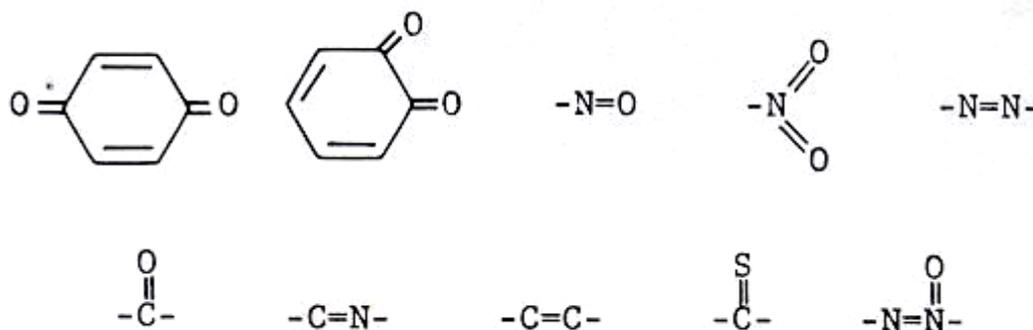


Figura 1.7 – Cromóforos presentes nas substâncias húmicas.

O espectro eletrônico é usualmente representado como um gráfico de absorvância em função do comprimento de onda da irradiação. Dois parâmetros são usados para caracterizar uma ligação: sua energia, dada pelo comprimento de onda λ do máximo da absorção e sua intensidade.

A intensidade da luz cai exponencialmente quando passa através da amostra. Experimentalmente, sua intensidade é medida usando a lei de Beer-Lambert para um certo comprimento de onda

$$\log_{10}(I_0/I) = \epsilon cl \quad (1.1)$$

onde I_0 é a radiação incidente na amostra, I é a radiação transmitida pela amostra. Em outras palavras, $I_0 - I$ é a radiação absorvida, c é a concentração da amostra, l é o caminho ótico que a radiação percorre pela cela e ϵ é o coeficiente de extinção molar.

Baseado em concentrações iguais, observou-se que o coeficiente de extinção de compostos húmicos aumenta com o aumento da massa molecular, percentagem de carbono, grau de condensação e a razão entre carbono de anéis aromáticos e carbono de estruturas alifáticas. Ácidos fúlvicos tem uma capacidade relativamente baixa para absorção de luz e o coeficiente de extinção é similar independente da origem do ácido fúlvico¹⁹.

A razão E_4/E_6 (definida como a razão da absorbância em 465 nm pela absorbância em 665 nm) tem sido utilizada como parâmetro para medida do grau de conjugação e/ou condensação dos anéis aromáticos das substâncias húmicas e, portanto do grau de humificação¹⁹.

Os dados obtidos a partir da razão E_4/E_6 são controversos na literatura e devem ser utilizados e correlacionados com o devido cuidado com outros parâmetros espectroscópicos mais precisos, como nível do tipo semiquinonas por EPR e grau de aromaticidade por RMN de ^{13}C .

1.4.2 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Absorção na região do infravermelho é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas de uma molécula. Essencialmente, existem duas vibrações fundamentais: *estiramento*, onde os átomos permanecem no mesmo eixo da ligação, porém a distância entre os átomos aumenta e diminui, e, *deformação*, onde as posições dos átomos mudam em relação ao eixo de ligação original. Quando luz infravermelha de mesma frequência de vibração de estiramento ou de deformação incide na amostra a energia é absorvida e a amplitude de vibração é aumentada. Devido à energia de absorção na frequência de ressonância, o detector do espectrômetro de infravermelho grava um pico de absorção naquele comprimento de onda¹⁹. Vibrações típicas de um grupo de átomos são ilustradas na Figura 1.8.

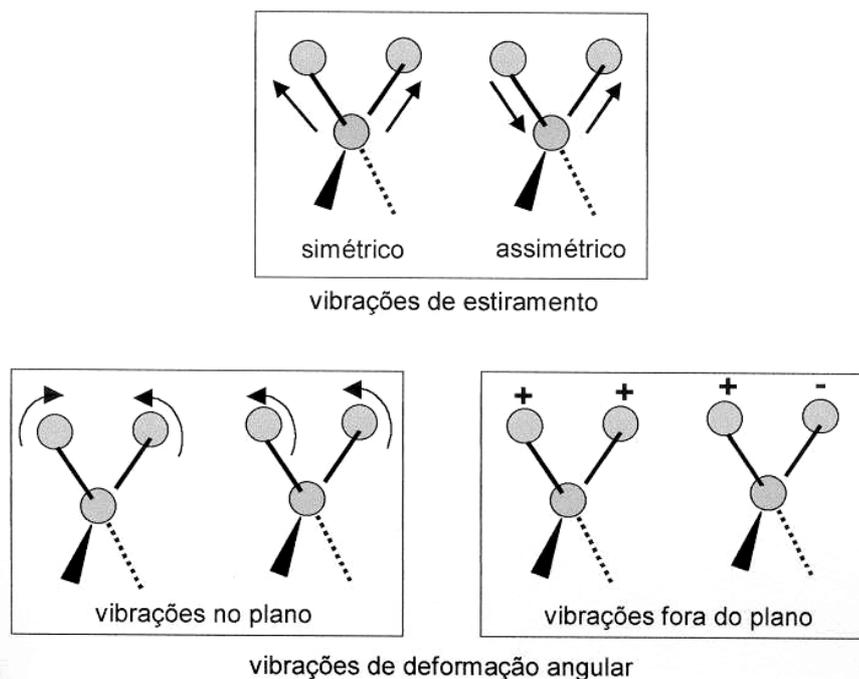


Figura 1.8 - Algumas vibrações típicas de átomos. Os sinais + e - significam vibrações perpendiculares ao plano do papel⁶³.

A espectroscopia de infravermelho tem sido extensivamente usada para a pesquisa de substâncias húmicas^{64,65,66} e tem fornecido considerável entendimento sobre a natureza, reatividade e arranjo estrutural dos grupos funcionais contendo oxigênio nas substâncias húmicas¹⁹. Espectros no infravermelho de substâncias húmicas resultam da absorção da radiação infravermelha por uma mistura complexa de moléculas que são por si próprias multifuncionais. O resultado do espectro infravermelho contém uma variedade de bandas que podem indicar diferentes grupos funcionais presentes nesta mistura complexa¹⁹.

A espectroscopia no infravermelho tem sido usada para estudar as interações das substâncias húmicas com metais⁶⁰. Resultados de estudos de infravermelho confirmam que grupos COOH têm um papel proeminente na complexação de cátions di e trivalentes por substâncias húmicas. A base para esta análise é que C=O da COOH que possui banda de absorção em 1.720 cm^{-1} desaparece após reação com íons metálicos¹⁹. Os espectros de infravermelho também podem indicar que grupos OH, C=O e NH são envolvidos na complexação de íons metálicos por substâncias húmicas⁶⁰.

Em complementação aos dados obtidos por RMN, as análises de FTIR têm sido tradicionalmente usadas para identificar grupos funcionais como: grupos carboxila, amina, hidroxila, carbonila e outros^{16,24,19}. Estas informações são úteis, pois, permitem identificar possíveis processos de oxidação e alteração de grupos funcionais, associados aos efeitos de manejos, devido, por exemplo, ao aumento ou redução de aeração do solo, mudança no pH, complexação com micronutrientes provenientes de fertilizantes ou naturalmente ocorrendo no solo, e ainda com metais pesados.

Vibrações de deformação geralmente requerem menos energia e são encontradas em frequências menores do que as vibrações de estiramento. Estiramento devido à tripla ligação ($2.300 - 2.000 \text{ cm}^{-1}$) é mais forte do que duplas ligações ($1.900 - 1.500 \text{ cm}^{-1}$) e estas são mais fortes do que ligações simples, como C-C, C-O e C-N ($1.300 - 800 \text{ cm}^{-1}$). Vibrações de estiramento envolvendo prótons (ex. C-H, O-H e N-H) ocorrem em frequências entre 3.700 e 2.650 cm^{-1} . O estiramento da ligação O-H ocorre em frequência mais alta ($3.700 - 3.200 \text{ cm}^{-1}$) do que para estiramento C-H ($3.050 - 2.850 \text{ cm}^{-1}$)¹⁹. Os principais grupos de absorção no IV (região $400 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$) nas substâncias húmicas são:

$3.395 - 3.400 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento OH ligado e estiramento N-H);

2.930 cm^{-1} (estiramento CH alifáticos);

$1.705 - 1.716 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento C=O das cetonas e dos ácidos COOH);

$1.630 - 1.650 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento assimétrico C-O dos íons carboxilato COO-
estiramento C=C dos anéis aromáticos, estiramento C=O e deformação N-H das amidas primárias);

1.510 cm^{-1} (deformação N-H de amida II e estiramento C=C dos aminoácidos);

1.450 cm^{-1} (deformação C-H dos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$);

1.420 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O, deformação O-H e deformação C-O-H dos COOH e estiramento simétrico dos íons COO-);

1.230 cm^{-1} (estiramento simétrico C-O e deformação OH dos COOH);

1.125 cm^{-1} (estiramento C-O de álcoois, éteres, esteres e COOH);

1.035 cm^{-1} (estiramento C-O de polissacarídeos).

As impurezas inorgânicas encontradas nesta região são:

3.700 cm^{-1} estiramento axial de OH externo da estrutura da caulinita;

3.620 cm^{-1} estiramento axial de OH interno da estrutura da caulinita;

3.520, 3.445, 3.390 cm^{-1} estiramento OH em gibbsita;

1.100 - 1.090 cm^{-1} estiramento Si-O-Si; quartzo;

800 – 770 cm^{-1} caulinita, glauconita, montmorilonita, quartzo.

1.4.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectrometria de ressonância magnética nuclear é basicamente uma outra forma de espectrometria de absorção, semelhante à espectroscopia de infravermelho ou de ultravioleta. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência (rf) em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra⁶⁷. Essencialmente, um experimento de RMN consiste em posicionar uma amostra entre os polos de um campo eletromagnético e aplicar uma radiofrequência variável. A excitação do núcleo do estado fundamental para um estado de energia mais alto resulta na absorção de radiação a uma frequência própria, dando um espectro o qual consiste de uma ou mais linhas de ressonância. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades. O número e a intensidade dessas linhas estão relacionados com a estrutura da molécula⁶⁸.

Com a técnica de RMN podemos fazer um estudo direcionado para um determinado núcleo, sendo esta uma das grandes vantagens da técnica.

A espectroscopia de RMN de ^{13}C é atualmente a técnica instrumental mais usada para caracterização das SH do solo, sendo possível a utilização de amostras sólidas e líquidas^{69, 70, 71}.

Uma das observações de grande interesse na avaliação da estrutura de compostos húmicos são as possíveis mudanças estruturais destes, que refletem em alteração de suas propriedades nos solos. Tanto a RMN de ^{13}C quanto a de ^1H têm sido aplicadas em estudos relativos a conformações e estruturas moleculares da matéria orgânica com grande sucesso.

A utilização da espectroscopia de RMN de ^{13}C de estado sólido é cada vez maior porque possibilita o estudo de substâncias que são pouco solúveis ou mesmo insolúveis. A técnica não é destrutiva, preservando a amostra para outras análises, economizando solventes e permitindo a avaliação *in situ* da matéria orgânica do solo. NOVOTNY *et al*⁷², usando a técnica de RMN de ^{13}C em amostras sólidas, avaliaram os ácidos húmicos extraídos das camadas de 0-5 e 5-10 cm de um solo Latossolo Roxo distrófico, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Segundo PRESTON⁵⁹, a ênfase inicial em estudos com RMN de ^{13}C em ácidos húmicos e ácidos fúlvicos deve-se à necessidade de isolar a matéria orgânica do solo em frações solúveis e com alta concentração de carbono, a fim de sobrepor algumas limitações das técnicas espectrocópicas disponíveis. Com o desenvolvimento da RMN de ^{13}C e a disponibilidade de equipamentos de maior potência, a técnica de RMN de ^{13}C tem sido aplicada, no estudo da matéria orgânica, em amostras de solo intactas.

No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações tais como baixa sensibilidade devido a pequena abundância natural da maioria dos núcleos, entre eles o ^{13}C (~1,1%), chamado de núcleo raro, e os tempos de relaxação muito longos que exigem experimentos com longa duração.

No caso de medidas de estado sólido, para obter espectros de alta resolução, devem ser resolvidos os três problemas seguintes⁷³:

- 1 – alargamento devido as interações dipolares heteronucleares (^{13}C , ^1H);
- 2- alargamento devido a anisotropia do desvio químico;

3- baixa sensibilidade devida aos longos tempos de relaxação spin-rede dos núcleos raros (^{13}C).

Estas três interações anisotrópicas estão presentes também nos líquidos, mas, felizmente, são eliminadas pelo rápido movimento isotrópico browniano das moléculas.

Estas limitações da espectroscopia de RMN de ^{13}C de estado sólido têm sido melhoradas recentemente com o desenvolvimento de técnicas novas e sofisticadas tais como: desacoplamento de alta potência, técnica de rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP)¹⁹.

A técnica de desacoplamento é utilizada para o estudo de núcleos raros, a eliminação do alargamento de linha dipolar internuclear. O campo local que surge sobre os núcleos raros é devido à presença de núcleos abundantes, como exemplo, prótons em sólidos orgânicos. Desde que exista uma interação dipolar heteronuclear, é possível desacoplar os núcleos raros que estão sendo observados pelos abundantes. O desacoplamento é feito via redução do momento magnético efetivo do núcleo abundante, pela aplicação de um campo de radiofrequência que mantém o momento de dipolo magnético do mesmo em alta rotação⁷⁴.

A técnica de rotação em torno do ângulo mágico é usada para eliminar a interação dipolar (homo e heteronuclear), fazendo a amostra rotacionar em torno de um certo ângulo denominado ângulo mágico, que é de $54^{\circ} 44'$. Além de eliminar as interações dipolares esta técnica elimina também anisotropias do deslocamento químico e de interações quadrupolares⁷⁴.

Para superar os problemas relativos à baixa sensibilidade dos núcleos raros e seus longos tempos de relaxação spin-rede foi proposto o método de dupla ressonância denominado polarização cruzada⁷⁴. A idéia básica deste método é usar a relativamente intensa polarização de spins abundantes para aumentar, por transferência de polarização a pequena polarização dos núcleos

raros. Desta técnica resulta um sinal de maior intensidade para núcleos raros e grande redução em seus tempos de relaxação spin-rede⁷⁴.

SACHS *et al.*⁷⁵ utilizaram a técnica de RMN de ¹³C com rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP) para estudar o processo de modificação química de ácidos húmicos utilizando diazometano. Foram investigados diferentes ácidos húmicos naturais modificados e não modificados e ácidos húmicos sintéticos. Através dos resultados encontrados nos estudos de RMN com ¹³C ligado ao ácido húmico modificado foi possível identificar que grupos são afetados pelas modificações químicas.

Através da RMN podemos identificar grupos funcionais que possibilitam caracterizar a estrutura das substâncias húmicas. O espectro de RMN de ¹³C de um ácido húmico ou fúlvico, fornece um inventário de diferentes componentes dos quais o material é composto.

Os principais grupos funcionais detectados por RMN de ¹³C em estado sólido em substâncias húmicas são⁷⁶: de grupos alifáticos (0-46 ppm), N-alifáticos e metoxílicos (46-67 ppm), *o*-alifáticos (67-94 ppm), di *o*-alifáticos (94-110 ppm), aromáticos (110-144 ppm), *o*-aromáticos (144-164 ppm), carboxílicos (164-188 ppm) e carbonílicos (188-230 ppm).

1.4.4 - Espectroscopia de Fluorescência de Luz UV-Visível

Na espectroscopia de fluorescência ocorre um processo de emissão o qual os átomos ou moléculas são excitados por absorção de um feixe de radiação eletromagnética. A espécie excitada relaxa, retornando ao estado inicial, emitindo o seu excesso de energia como fótons⁷⁷. Isto presume que elétrons na molécula de interesse são excitados e transferidos de orbitais moleculares do estado fundamental para orbitais moleculares ligante e anti-ligante do estado excitado. Transições desse tipo envolvem a promoção de elétrons disponíveis η ou π para orbitais π^* .

Normalmente uma molécula excitada eletronicamente volta ao seu estado excitado mais baixo por uma série de relaxações vibracionais rápidas e conversões internas que não produzem emissão de radiação. Assim, a fluorescência comumente se origina de uma transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado eletrônico fundamental. Para a maior parte dos compostos fluorescentes, então, a radiação é produzida por uma transição $n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$, dependendo de qual das duas é a menos energética⁶². A fluorescência mais intensa e mais útil é encontrada em compostos contendo grupos funcionais aromáticos com níveis de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de baixa energia. Compostos contendo estruturas alifáticas, alicíclicas carbonílicas ou estruturas de ligações duplas altamente conjugadas também podem apresentar fluorescência, mas em menor número se comparado ao dos sistemas aromáticos⁶². Esses processos são altamente prováveis em sistemas moleculares contendo átomos com pares de elétrons desemparelhados como oxigênio e nitrogênio ou sistemas aromáticos e ou alifáticos insaturados capaz de um elevado grau de ressonância, como, delocalização de elétrons, este é o caso das substâncias húmicas⁷⁸.

O aumento da extensão do sistema eletrônico π e a presença de átomos de oxigênio e nitrogênio na estrutura das substâncias húmicas tem o efeito de diminuir a separação energética entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental. Logo a energia do fóton emitido será menor deslocando o comprimento de onda da emissão fluorescente para valores maiores, o mesmo ocorrendo com substituintes contendo grupos carbonila, hidroxila e amino⁷⁸.

O espectro de fluorescência pode ser obtido em três modos, emissão, excitação e varredura de excitação sincronizada⁷⁸. O espectro de emissão é obtido medindo-se a intensidade relativa da radiação emitida como uma função do comprimento de onda, a um comprimento de onda de excitação constante. O espectro de excitação é obtido medindo-se a intensidade de luminescência em um comprimento de onda fixo, enquanto o comprimento de

onda de excitação é variado. O espectro de varredura sincronizada de excitação é obtido pela medida da intensidade de fluorescência durante uma varredura simultaneamente de ambos os comprimentos de onda, excitação e emissão, e mantendo constante entre eles, uma diferença de comprimento de onda otimizada $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$.

A fluorescência de um composto aromático com substituintes ácidos ou básicos no anel é normalmente dependente do pH. Tanto o comprimento de onda como a intensidade de emissão possivelmente serão diferentes para as formas ionizada ou não-ionizada do composto. As mudanças na emissão de compostos destes tipos surgem do número diferente de espécies ressonantes associadas às formas básica e ácida das moléculas. Essas observações sugerem que procedimentos analíticos baseados na fluorescência freqüentemente requerem controle do pH⁶². As propriedades fluorescentes das SH variam marcadamente com o pH de acordo com sua natureza e origem⁷⁸. Como a fluorescência depende do grau de conjugação da molécula, e a ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares pode aumentar ou diminuir a conjugação de grupos vizinhos, a intensidade da fluorescência pode variar com a ocorrência deste tipo de ligação em função de variações da concentração de eletrólitos e do pH do meio⁷⁹.

A espectroscopia de fluorescência aplicada nos estudos de substâncias húmicas pode fornecer informações muito importantes, tais como: a diferenciação e classificação das substâncias húmicas baseadas nas características estruturais típicas responsáveis pela fluorescência nas moléculas de substâncias húmicas^{57,80} e de parâmetros, incluindo massa molar, concentração, pH, força iônica, temperatura e potencial redox, que afetam o comportamento da fluorescência das substâncias húmicas e o estudo de aspectos qualitativos a nível molecular das interações das substâncias húmicas com moléculas orgânicas e íons metálicos^{1,78}.

A espectroscopia de fluorescência também tem sido utilizada para investigar modelos de ácidos húmicos^{81,82}. MIANO *et al.*⁸³ utilizaram a espectroscopia de fluorescência para estudar nove modelos poliméricos de ácidos húmicos sintetizados por polimerização enzimática utilizando ácidos hidroxifenol, hidroxitolueno e hidroxibenzóico. Os espectros de emissão dos modelos de ácidos húmicos apresentaram bandas largas e intensas em torno de 440 a 465 nm, e indicou um arranjo molecular menos complicado do que os ácidos húmicos naturais.

1.5 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

A cromatografia de exclusão por tamanho é uma técnica poderosa aplicável particularmente a espécies de alto peso molecular. Os empacotamentos para a cromatografia de exclusão por tamanho consistem de partículas pequenas ($\approx 10 \mu\text{m}$) de sílica ou de polímero contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Enquanto estão nos poros, as moléculas estão efetivamente retidas e ausentes do fluxo da fase móvel. O tempo médio de residências nos poros depende do tamanho efetivo das moléculas do analito. Moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são excluídas e essencialmente não sofrem retenção. Essas espécies são as primeiras a serem eluídas. Moléculas com diâmetros significativamente menores do que os poros podem penetrar ou permear através do emaranhado de poros e ficar retidas por tempos maiores. Estas são as últimas a serem eluídas. Entre esses dois extremos, estão as moléculas de tamanho intermediário cuja penetração média nos poros da fase estacionária depende de seus diâmetros. Dentro desse grupo, ocorre fracionamento, que está diretamente relacionado com o tamanho da molécula e, em alguma extensão, também com a sua forma. As separações de exclusão por tamanho não envolvem interação física ou química entre o analito e a fase estacionária. Tenta-se evitar essas interações porque pioram a eficiência da coluna⁶².

Diversas propriedades da matéria orgânica do solo dependem do seu tamanho molecular, como por exemplo a ligação com íons metálicos⁸⁴. Logo, o conhecimento da distribuição do tamanho molecular da matéria orgânica do solo é essencial para a compreensão do seu papel em importantes processos de pedogênese e absorção de metais pelas plantas.

Este tipo de fracionamento por tamanho molecular é importante porque a capacidade das substâncias húmicas de complexar metais está relacionada ao tamanho molecular⁸⁴.

NOVOTNY *et al.*⁸⁵ utilizando esta técnica, isolaram duas frações, com diferentes características de absorção de luz na região do visível, contidas nos AH de solos submetidos a diferentes manejos e mostraram que o cultivo aumentou a proporção de substâncias húmicas com menor tamanho molecular, sendo que a fração de maior tamanho molecular mostrou maior razão E_4/E_6 .

A cromatografia de permeação em gel é muito utilizada para a determinação dos valores de massas molares da matéria orgânica do solo ou sua distribuição, porém esta técnica apresenta certas limitações como por exemplo: a interação do gel com o material sendo analisado/fracionado e a impossibilidade de trabalhar-se com fluxos maiores durante a cromatografia tornando tal procedimento demorado.

A cromatografia de exclusão em vidro de porosidade controlada utiliza como leito cromatográfico o vidro de porosidade controlada que são grânulos de vidro permeados por uma vasta rede interconectada de poros com tamanho controlado.

O uso da cromatografia de exclusão em vidro de porosidade controlada, para a análise e fracionamento de misturas de substâncias orgânicas, apresenta algumas vantagens em relação aos clássicos géis orgânicos: ela é relativamente inerte à maioria das substâncias e permite fluxos 5 a 10 vezes maiores reduzindo significativamente o tempo de análises. Outras vantagens do vidro de porosidade controlada são: sua alta resistência mecânica o que

possibilita a manutenção do fluxo mesmo com variações na pressão interna; termoestabilidade e portanto pode ser autoclavada; pequena variação na distribuição do tamanho de poros; e imunidade à degradação microbiana⁴⁷.

1.6 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O microscópio de força atômica (AFM), permite resolução de átomos individuais tanto em superfícies condutoras como isolantes. Nesse método, uma alavanca flexível e sensível à força é deslocada com um padrão de rastreamento sobre a superfície da amostra. A força que age entre a alavanca e a superfície da amostra causa flexões diminutas da alavanca, que são detectadas por meios ópticos. A movimentação da ponta, ou às vezes a amostra é conseguida com um tubo piezoelétrico. Durante uma varredura, a força na ponta é mantida constante pela movimentação para cima e para baixo da ponta, o que fornece a informação topográfica. A vantagem do microscópio de força atômica é que ele é aplicável a amostras não-condutoras⁶².

A Figura 1.9 mostra esquematicamente o método mais comum de se detectar a flexão da alavanca que segura a ponta. Um feixe de laser é refletido de um ponto na alavanca para um fotodiodo segmentado que detecta o movimento da sonda. A saída do fotodiodo então controla a forma aplicada à ponta, de modo que ela fica contante⁶².

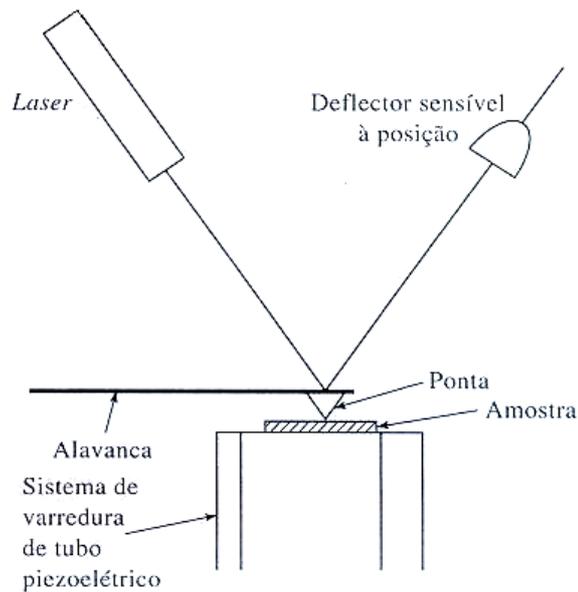


Figura 1.9 – Vista lateral de um detector óptico de deflexão. Tipicamente, o sistema é sensível até 0,01 mm quando a ponta varre a superfície da amostra⁶².

A Figura 1.10 mostra o projeto comum de um microscópio de força atômica (AFM). O sistema de movimento é um dispositivo piezoelétrico tubular que move a amostras nas direções x, y e z sob a ponta. O sinal do detector de feixe de *laser* é então realimentado ao transdutor piezoelétrico da amostra, o que faz a amostra se movem para cima e para baixo para manter uma força contante entre a ponta e a amostra⁶².

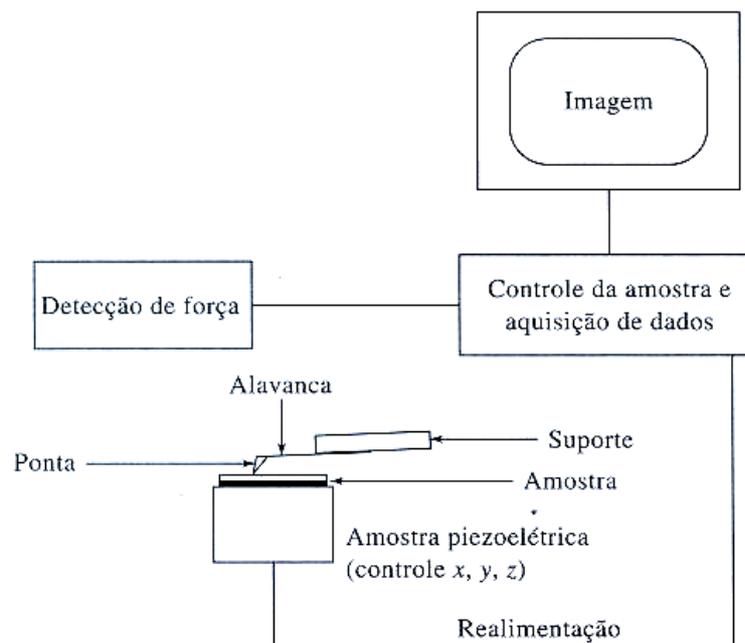


Figura 1.10 – Projeto típico de um microscópio de força atômica (AFM)⁶².

Essa técnica, que permite resolução em nível atômico, tem sido atualmente aplicada a estudos estruturais dos constituintes do solo⁸⁶. A microscopia de força atômica tem fornecido valiosas contribuições no campo de pesquisa em solos e dos materiais ambientais^{87,88}.

A microscopia de força atômica pode fornecer informações estruturais e morfológicas das substâncias húmicas que não são possíveis por outras técnicas. Em resultado recente foram utilizados dados de microscopia de tunelamento e de programas de simulação em computador para amostras de ácido cítrico na busca de um modelo estrutural para as substâncias húmicas⁸⁹. Em outro trabalho recente com microscopia de força atômica de ácidos fúlvico adsorvidos em mica⁹⁰, identificaram estruturas na forma de esponja com anéis lembrando hexágonos alongados com a maior dimensão de cerca de 15 nm e pequenas esferas de 10 a 50 nm. Este tipo de informação é relevante, pois muita controvérsia existe com relação à estrutura das substâncias húmicas e sua dependência com parâmetros como origem, pH, força iônica, concentração e outros.

1.7 - TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA

Condutância eletrolítica G em Siemens (Ohms^{-1}), é uma medida da habilidade de uma solução para conduzir eletricidade. Se um íon é colocado entre dois eletrodos de cargas opostas em um campo elétrico, eles migrarão para o eletrodo de carga oposta, conduzindo eletricidade. Como os íons em solução conduzem eletricidade, a natureza dos íons e o movimento desses íons em um solvente particular determinam a magnitude da condutividade eletrolítica. A natureza dos íons pode ser descrita por propriedades como o tamanho, carga, mobilidade e concentração. O movimento dos íons pode estar relacionado com a temperatura da solução e a viscosidade do solvente. Com aumentos na temperatura os íons movimentam-se mais rapidamente e conduzem maior eletricidade. Um aumento na viscosidade reduz a velocidade de movimento dos

íons. A constante dielétrica de um solvente também afeta a condutividade eletrolítica⁹¹.

Todos os íons em solução contribuem para a condutividade eletrolítica, e, não podem ser distinguidas as contribuições individuais de cada íon, não podendo diferenciar os íons. Assim, condutividade eletrolítica não é específica. Medidas de soluções de um eletrólito simples são usadas para determinar propriedades daquele eletrólito⁹¹.

Em titulações condutométricas um íon é substituído por outro de diferente condutância equivalente. A solução inicial titulada freqüentemente é um ácido ou uma base. Íons de hidrogênio ou hidróxido tem a máxima condutividade equivalente. Em ordem decrescente de condutividade, um ácido é usado como o titulante para titular uma base e vice-versa. Como os íons hidrogênio ou hidróxidos começam a serem consumidos na formação de água e são substituídos em solução por cátions ou ânions de menor condutividade, a condutividade decresce. Depois de ter alcançado o ponto final a condutividade aumenta com o excesso de ácido ou base adicionado. O ponto final é obtido por extrapolação da medida próxima do ponto final⁹¹.

Resultados variáveis foram obtidos usando titulação condutométrica para estudarem-se ácidos húmicos. A revisão de FLAIG *et al.*⁹² mostra que nas curvas de titulação condutométricas das substancias húmicas ocorrem tanto poucas quebras como apenas uma, ou mais quebras como quatro. Por exemplo, curvas de titulação condutométrica obtidas por SCHNITZER e SKINNER⁹³ para a matéria orgânica do horizonte B_h de um solo Spodosol mostrou um mínimo utilizando titulação condutométrica com NaOH, mas um total de quatro com Ca(OH)₂.

1.8 - TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Potenciometria pode ser simplesmente descrita como a medida de um potencial em uma cela eletrolítica. Ela é a única técnica eletroquímica que

mede diretamente o potencial em um equilíbrio termodinâmico. Uma das características exclusiva da potenciometria é a possibilidade de monitorar a atividade de um íon em uma amostra, independente da concentração. Uma das mais comum e antiga aplicação da potenciometria é a determinação do pH. Através da potenciometria podemos determinar íons em estado de oxidação específico, constantes de estabilidade, velocidade e mecanismos de reação, etc. Porém uma das limitações desta técnica é o efeito de matriz (diferenças na força iônica, a influência no potencial de junção por eletrólitos presentes na amostra e a presença de espécies que podem sujar a superfície ativa do eletrodo)⁹¹.

Segundo ABATE e MASINI⁹⁴ técnica potenciométrica possui uma grande vantagem sobre as demais, pois determina a atividade dos íons sem influenciar o equilíbrio químico da solução. Eles utilizaram eletrodos potenciométricos de amálgama para o estudo da complexação em substâncias húmicas. A capacidade de complexação e as médias das constantes de estabilidades condicionais foram determinadas em $\text{pH} = 6,00 \pm 0,05$ em meio de $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de sódio, usando o método de *Scatchard*. SOUZA⁹⁵ utilizou curvas potenciométricas de titulação, feitas com hidróxidos de sódio e de bário, em condições de força iônica constante, para estudar o caráter ácido das substâncias húmicas, constantes de troca com cátions metálicos, constantes de ionização e afinidades com cátions metálicos. Em seu estudo das constantes de troca de cátions para as substâncias húmicas SOUZA⁹⁵ observou grande interação de cátions divalentes com as substâncias húmicas em relação aos cátions monovalentes. A porcentagem de troca para os divalentes foi bem superior aos monovalentes.

POSNER⁹⁶ observou variações nas curvas de titulação de ácidos húmicos com a força iônica e concluiu que os ácidos húmicos não são eletrólitos típicos no qual a ionização foi influenciada pela carga na molécula da forma como ela foi neutralizada. Curvas de titulação na presença de LiCl, KCl e NaCl foram idênticas, indicando a ausência de formação específica de complexo.

2.1 AMOSTRA DE SOLO

A amostra utilizada para extração do ácido húmico foi originária de área sob 9 anos de manejo, em argissolo vermelho, com o seguinte tratamento: plantio direto com as culturas aveia com ervilhaça/ milho com caupi (AH1).

2.2 PREPARO DA AMOSTRA DE SOLO PARA A EXTRAÇÃO

Realizou-se na amostra de solo uma limpeza manual para retirada de raízes e restos de plantas, em seguida foi destorroadas em moinho para solo e passada por peneira de 2 mm de abertura de malha.

2.3 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A extração do ácido húmico foi realizada segundo a metodologia da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Inicialmente fez-se uma extração com ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção de 1g solo: 10 mL de solução durante uma hora sob agitação. O sobrenadante é a primeira fração do ácido fúlvico (AF), que foi reservada para posterior recuperação do mesmo. Em seguida adicionou-se ao precipitado hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção de 1 g solo: 10 mL de solução e deixou-se 24 horas sob agitação. Centrifugou-se o sobrenadante alcalino durante 25 min a 9160 rpm para eliminação de argila, acidificou-se com ácido clorídrico 6 mol L^{-1} até pH 2 e deixou-se em repouso por 24 h. A fração do ácido húmico (AH) é o precipitado e o sobrenadante é a segunda fração do ácido fúlvico (AF) que foi reservada.

2.4 PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO HÚMICO

Realizou-se a purificação do ácido húmico redissolvendo o precipitado em solução diluída de hidróxido de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e adicionou-se cloreto de potássio sólido para completar uma concentração de íons K^+ equivalente a $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Centrifugou-se a solução para eliminação dos sólidos suspensos e filtrou-se com papel de filtro. Posteriormente, reprecipitou-se o ácido húmico acidificando ácido clorídrico 6 mol L^{-1} até pH 1 e deixou-se em repouso durante 16 h. Submeteu-se o ácido húmico precipitado a diálise durante quatro dias em água MiliQ até eliminação de íons cloreto. Finalmente o ácido húmico foi liofilizado e armazenado em dessecador.

Para a diálise utilizaram-se membranas Spectra/Por 6-8 000D que foram preparadas para o uso de acordo com a metodologia de MC PHIE⁹⁷ limpando-as das substâncias preservadoras.

2.5 SÍNTESE DO ÁCIDO HÚMICO⁹⁸

Em três dos nossos experimentos, dissolveu-se em 60 mL de água contendo 2,8g de hidróxido de potássio (0,05 mol), as seguintes substâncias precursoras: a) 5,5g (0,05 mol) de hidroquinona(AHSI); b) 5,4g (0,05 mol) de p-benzoquinona(AHSII); c) 5,5 g (0,05 mol) de hidroquinona com 2,74 g (0,02 mol) de ácido 4-aminobenzóico(AHSIII).

Colocou-se cada uma destas soluções em um frasco o qual foi borbulhada com ar purificado em uma razão de 1 L min^{-1} . Purificou-se o ar passando-o por um frasco de 40 cm carregado com hidróxido de sódio sólido, e borbulhado em outro frasco contendo solução de hidróxido de sódio $0,83 \text{ mol L}^{-1}$. Depois de vinte e duas horas de reação, a mistura torna-se viscosa e marrom. Tratou-se esta mistura com 6 mL de ácido clorídrico concentrado com agitação. Coletou-se o precipitado marrom-escuro por filtração, e lavou-se repetidamente com água destilada e secou-se por um dia em ar e depois em estufa a (60°C).

2.6 ANÁLISE ELEMENTAR

As análises químicas elementares foram feitas utilizando o aparelho CHNS-O da marca CE-Instruments EAGER 200, do Departamento de Química da UFSCar.

2.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

Fizeram-se as determinações do teor de cinzas pesando-se e calcinando-se aproximadamente 10 mg de amostra (AH1, AH2, AHSI, AHSII e AHSIII), em cadinho de platina a uma temperatura de 600 °C durante 2 horas. Calculou-se o teor de cinzas por diferença de massas.

2.8 MEDIDAS CONDUTOMÉTRICAS

As medidas de condutância foram obtidas utilizando-se uma célula condutométrica marca Digimed modelo DMC – 010 de $K= 0,934 \text{ cm}^{-1}$ (padronizada com ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹) conectada a um condutivímetro Micronal, modelo B 330. Para temperatura a 25°C utilizou-se um banho termostatizador, marca Ética.

2.9 MEDIDAS POTENCIOMÉTRICAS

As medidas potenciométricas foram realizadas utilizando-se um eletrodo de vidro combinado da Analyser com solução interna de cloreto de potássio 0,50 mol L⁻¹ saturado com AgCl. O eletrodo de vidro estava conectado a um pHmetro da Orion, Expandable Ion Analyser, modelo EA 940. Para manter a temperatura constante a 25°C, utilizou-se um banho termostatizador, marca Ética.

2.10 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes comerciais empregados foram de pureza analítica (PA) e a água utilizada no preparo das soluções foi destilada e passou um fluxo de nitrogênio sobre esta, afim de remover dióxido de carbono presente.

2.11 PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL DOS ÁCIDOS HÚMICOS SINTÉTICOS POR TITULAÇÃO CONDUTOMÉTRICA

Pesou-se 0,0912g de amostra ácido húmico sintético (AHSIII) obtido a partir dos precursores hidroquinona e ácido 4-aminobenzóico e cerca de 0,1028 g de amostra de ácido húmico sintético (AHSII) obtido a partir do precursor p-benzoquinona. Adicionou-se à massa de cada amostra 5,1 mL de dimetil sulfóxido concentrado e 50,08 mL de solução de água, medida em uma pipeta aferida. Borbulhou-se nitrogênio para remoção de CO₂. Deixou-se sob agitação por 30 minutos na célula potenciométrica termostaticada a 25°C, e titulou-se condutometricamente cada amostra separadamente com adições de hidróxido de sódio, hidróxido de sódio 0,102 mol L⁻¹ à amostra de AHSIII e hidróxido de sódio 0,052 mol L⁻¹ à amostra de AHSII. Calcularam-se os valores de neutralização (neutralizando grupos carboxílicos) e de grupos ácidos fenólicos, muito fracos.

2.12 PROCEDIMENTO PARA CALIBRAÇÃO DOS ELETRODOS DE VIDRO

O eletrodo foi utilizado em condições de força iônica constante 0,5 mol L⁻¹, mantida com cloreto de potássio. Nestas condições as medidas se referem a um p[H⁺] ou p[OH⁻] expressando concentrações iônicas e não as atividades iônicas convencionais

Lavou-se o eletrodo de vidro com uma solução de cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹ e deixou-se em repouso por alguns minutos em um béquer contendo cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹, na mesma concentração do eletrólito

contido no eletrodo de referência, em condições de eliminar o potencial de junção. Em seguida o eletrodo permaneceu em repouso em solução cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Realizou-se a calibração do eletrodo de vidro para a região ácida e para a região alcalina.

Para a calibração do eletrodo de vidro na região ácida colocou-se em uma cela termostatizada a 25°C $50,07 \text{ mL}$ de solução cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulou-se com uma solução mista de ácido clorídrico $0,020 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de lítio $0,016 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,464 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução com eletrólito misto contendo Li^+ compensa a alta mobilidade iônica dos íons H^+ , controlando potenciais de junção em meio ácido.

Para a calibração do eletrodo de vidro na região alcalina colocou-se em uma cela termostatizada a 25°C $50,07 \text{ mL}$ de solução cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulou-se com uma solução mista de hidróxido de potássio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,42 \text{ mol L}^{-1}$. O íon tricloroacetato compensa a alta mobilidade iônica dos íons OH^- , praticamente eliminando potenciais de junção.

2.13 PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE pK's DOS ÁCIDOS HÚMICOS SINTÉTICOS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA EM FORÇA IÔNICA AJUSTADA

Realizaram-se titulações potenciométricas em força iônica $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ ajustada com cloreto de potássio.

Calibrou-se o eletrodo de vidro na região ácida, com uma solução mista de ácido clorídrico $0,020 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de lítio $0,016 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,464 \text{ mol L}^{-1}$. Nestas condições $\text{p}[\text{H}^+] = -\log[\text{H}^+] = 1,689$.

Em seguida, calibrou-se o eletrodo de vidro na região alcalina, com uma solução de hidróxido de potássio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,42 \text{ mol L}^{-1}$. Nestas condições $\text{p}[\text{H}^+] = 13,756 - \text{p}[\text{OH}^-]$, sendo este $13,756$ o valor de K_w nestas condições de força iônica⁹⁹. O valor de $\text{p}[\text{OH}^-]$ provêm de cálculo pela diluição do hidróxido de potássio durante a

titulação. As medidas potenciométricas da célula com o eletrodo de vidro eram feitas em potenciais, Volts, os quais eram convertidos em valores de $p[H^+]$ em programa escrito em linguagem QUICKBASIC, de uso regular neste grupo de pesquisa⁹⁵.

Pesou-se separadamente cerca de 0,05 g de amostra de AHSIII e 0,05 g de amostra de AHSII e adicionou-se à massa pesada de cada amostra 0,5 mL de dimetil sulfóxido concentrado e 50,07 mL de solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, e então mediu-se o potencial de cada solução.

Deixou-se a solução sob agitação por 10 minutos, na célula potenciométrica termostaticada a 25°C , e titulou-se potenciometricamente com adições de solução de hidróxido de potássio $0,0300 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,038 \text{ mol L}^{-1}$.

2.14 COMPLEXAÇÃO DE METAIS NAS AMOSTRAS DE ÁCIDOS HÚMICOS SINTÉTICOS

Em 0,1 g de AH sintético (AHSII e AHSIII) adicionou-se 40 mL de solução de metal $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Sulfato de Cobre, Ferro e ou Manganês) e agitou-se por 16 horas. Após o tempo de agitação centrifugaram-se as amostras a 2.200 rpm por 20 min e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se água deionizada (10 mL) às amostras e agitou-se por 10 min e centrifugou-se novamente, repetindo-se este procedimento de lavagem por mais duas vezes. A seguir o precipitado foi coletado e liofilizado.

As amostras de ácidos húmicos sintéticos AHSII e AHSIII foram denominadas: AHSII-Cu e AHSIII-Cu (com cobre complexado), AHSII-Fe e AHSIII-Fe (com ferro complexado) e AHSII-Mn e AHSIII-Mn (com manganês complexado).

2.15 ANÁLISE DE FTIR

Para realizar as medidas foram preparadas pastilhas na proporção de 1mg de amostra (ácidos húmicos sintetizados e compostos de partida

hidroquinona, p-benzoquinona e ácido 4-aminobenzóico) para cada 100mg de KBr. Os espectros foram obtidos a partir de 64 varreduras no intervalo de 4000 a 400cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

O espectrômetro de FTIR utilizado foi o Perkin-Elmer modelo Paragon 1000, da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP.

2.16 ANÁLISE POR RMN

Os espectros de RMN de estado sólido, foram obtidos em um espectrômetro Varian (Unity 400), que opera em 400 MHz para o ^1H da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. Os espectros foram obtidos utilizando a seqüência de RMN de ^{13}C polarização cruzada com amplitude variável e rotação no ângulo mágico (VACP/MAS), empregando uma sonda para amostras sólidas com marca Doty. A frequência de ressonância foi 100,58 MHz (^{13}C), a banda espectral utilizada para a polarização cruzada foi de 50 KHz, tempo de contato de 1 ms, tempo de repetição de 500 ms, tempo de aquisição (AT) de 0.0128 ms e número de transientes (NT) = 9600 e os espectros foram filtrados com função de decaimento exponencial (LB) = 100 Hz. A amostra de ácido húmico purificado (AH1) e ácidos húmicos sintéticos (AHSI, AHSII, AHSIII) foram medidas em rotores de zircônia de 5 mm, com rotação em torno do ângulo mágico de 8 KHz.

2.17 ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA

Para a obtenção dos espectros de fluorescência foram utilizadas amostras dos ácidos húmicos sintéticos (AHSII, AHSIII) e sintéticos com metais complexados (AHSII-Cu, AHSII-Fe, AHSII-Mn, AHSIII-Cu, AHSIII-Fe, AHSIII-Mn) ambos obtidos de acordo com as metodologias descritas nos itens 2.5 e 2.14, respectivamente. Os espectros de fluorescência foram realizados num espectrômetro de luminescência Perkin Elmer LS50B pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, utilizando soluções de 10 mg kg⁻¹

¹ preparadas por diluição a partir de soluções de 2 mg de amostra em 10 mL de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹. O pH dessas soluções foi ajustado para 8 com adição de NaOH ou HCl diluído. Os espectros de fluorescência foram adquiridos em 2 modos: excitação com emissão em $\lambda = 500$ nm e emissão com excitação em $\lambda = 330$ nm. A abertura das fendas de entrada e saída foi 10 nm e a velocidade de aquisição foi de 120 nm min⁻¹.

2.18 ANÁLISES USANDO UV-VÍSEL

Para a obtenção dos espectros de UV-Vível foram utilizadas amostras de ácido húmico natural (AH1), extraída de solo de acordo com as metodologias descritas nos itens 2.3 e 2.4, sintéticos (AHSI, AHSII e AHSIII) e sintéticos com metais complexados (AHSII-Cu, AHSII-Fe, AHSII-Mn, AHSIII-Cu, AHSIII-Fe, AHSIII-Mn) ambos obtidos de acordo com as metodologias descritas nos itens 2.5 e 2.14, respectivamente.

Os espectros de ultravioleta foram realizados num espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, utilizando soluções de 10 mg kg⁻¹ preparadas por diluição a partir de soluções de 2mg de amostra em 10 mL de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹, ajustadas para pH 8. As medidas foram realizadas na região de 200 a 800 nm.

2.19 ANÁLISE VIA CROMATOGRRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO

Utilizou-se para o fracionamento o sistema cromatográfico Biologic LP System (Biorad) constituído de uma bomba peristáltica, sistemas de válvulas e misturador de eluentes, detectores de condutividade e de UV-Vis (254 e 280 nm) equipado com uma célula de fluxo e um coletor de frações. Realizou-se as medidas de absorbância em 254 nm. O sistema estava conectado a um microcomputador que registrava os cromatogramas. Utilizou-se uma coluna cromatográfica com 1 cm de diâmetro interno (Biorad) e 5 cm de comprimento

que foi preenchida com vidro de porosidade controlada com tamanho de 120-200 mesh e diâmetro de poros de 16,5 nm. Utilizou-se como eluente NaHCO_3 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Este eluente foi previamente evacuado a fim de minimizar-se o problema com gases dissolvidos. Realizou-se a calibração da coluna utilizando Blue Dextran, um polissacarídeo com peso molecular de 2.000.000 Daltons.

As amostras utilizadas foram as de ácido húmico natural (AH1), extraída de solo de acordo com as metodologias descritas nos itens 2.3 e 2.4, sintéticos (AHSI, AHSII e ASHIII) e sintéticos com metais complexados (AHSII-Cu, AHSII-Fe, AHSII-Mn, AHSIII-Cu, AHSIII-Fe, AHSIII-Mn) ambos obtidos de acordo com as metodologias descritas nos itens 2.5 e 2.14, respectivamente. Para o fracionamento foram dissolvidos 5 mg das amostras em 10 mL da solução eluente NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, e ajustadas para pH 8. O fluxo do eluente utilizado foi de 5 mL min^{-1} .

2.20 ANÁLISE UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As suspensões dos AHs foram preparadas em solução aquosa e agitadas durante três dias, protegidas da luz. As suspensões foram preparadas na concentração de 100 mg L^{-1} e o pH das suspensões foi ajustado para 3,5. Prepararam-se suspensões do ácido húmico natural (AH1), extraído de solo de acordo com as metodologias descritas nos itens 2.3 e 2.4, sintéticos (AHSI, AHSII e ASHIII) e sintéticos com metais complexados (AHSII-Cu, AHSII-Fe, AHSII-Mn, AHSIII-Cu, AHSIII-Fe, AHSIII-Mn) ambos obtidos de acordo com as metodologias descritas nos itens 2.5 e 2.14, respectivamente.

Para a fixação das amostras foram utilizadas lâminas de mica (sem tratamento prévio) como substrato. A fixação das amostras de AH foi feita colocando-se lâminas recém clivadas em uma suspensão aquosa diluída de AH (100 mg L^{-1}) sob agitação constante, durante um dia. O pH da solução de AH foi ajustado para 3,5 com HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Após agitação as lâminas foram

lavadas com água Milli-Q, e colocadas para secar em uma placa de Petri em um dessecador por aproximadamente 12 horas e analisadas por AFM.

As imagens foram obtidas usando um microscópio de força atômica (AFM) da linha Topometrix, Discoverer, modelo TMX 2010, da Empresa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, equipado com scanner $7 \times 7 \mu\text{m}^2$ de área de varredura. Utilizou-se a técnica de contato para obtenção das imagens. O conjunto haste-agulha utilizado foram de nitreto de silício (de formato em “V”) e a constante elástica, k , de nitreto de silício é em torno de $(0,13 \pm 0,01) \text{ N m}^{-1}$. Os valores de comprimento das hastes e do raio da ponta, R , foram obtidos através da Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). O valor do raio de curvatura das pontas, R , foi de (80 ± 10) . O software utilizado para tratamento de imagens foi o WSxM 4.0 develop 4.4, Nanotec Electronica S. L. (Copyright © November 2003). As imagens foram obtidas em velocidade de varredura menor que 2 H e durante a obtenção de imagens alguns cuidados importantes foram tomados, como por exemplo o ajuste do *set point* para valores mais baixos possíveis, resultando em pequenas forças aplicada à superfície.

As imagens foram obtidas em temperatura ambiente $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ e umidade relativa em torno de 50%.

3.1 SÍNTESE DO ÁCIDO HÚMICO

Sabe-se que polihidroxifenóis como as hidroquinonas e também quinonas como a p-benzoquinona, são muito sensíveis a ação de soluções alcalinas e levam a produtos poliméricos conhecidos como ácidos húmicos sintéticos (AHS). Uma das reações paralelas que podem ocorrer simultaneamente com a reação de polimerização é a degradação do polihidroxifenol e quinona formando produtos alifáticos oxidados⁹⁸. A Figura 3.1 mostra os possíveis polímeros resultantes da reação de polimerização oxidativa da hidroquinona e p-benzoquinona em meio alcalino.

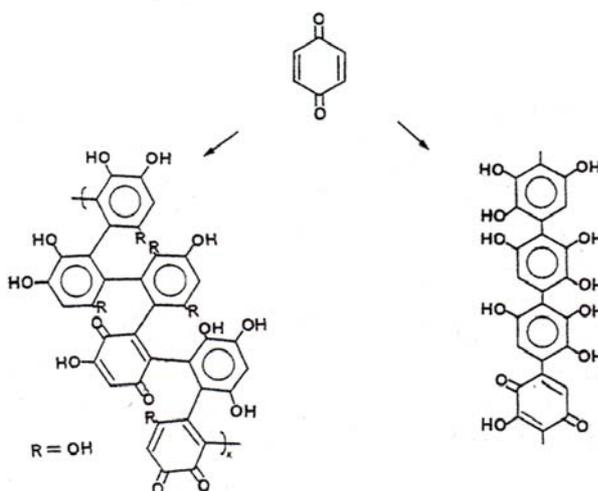


Figura 3.1 – Possíveis estruturas dos polímeros resultantes da reação de polimerização oxidativa da hidroquinona e p-benzoquinona em meio alcalino.

O propósito de sintetizarem-se esses polímeros foi de que as informações sobre a estrutura obtidas a partir desses precursores sintéticos possam ser usadas para um melhor entendimento da complexa estrutura dos ácidos húmicos naturais. Desse modo, para a utilização desses polímeros chamados de ácidos húmicos sintéticos, fizeram-se alguns estudos relacionados a estrutura química dos mesmos visando encontrar similaridades entre os ácidos

húmicos sintéticos e o natural. Os resultados desses estudos demonstraram que existem similaridades entre os ácidos húmicos sintético e o natural. A polimerização em presença de moléculas contendo nitrogênio poderia introduzir no polímero este elemento em níveis de concentração que se aproximam daquele normalmente observado em substâncias húmicas, 0,8-4,3%, tornando mais convenientes ou mais realísticos os estudos comparativos. Os rendimentos das reações de polimerização oxidativa em meio alcalino da hidroquinona, p-benzoquinona e hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico foram de 0,71 g (12,90 % em peso) de ácido húmico sintético (AHSI), 4,12 g (76,36 % em peso) de ácido húmico sintético (AHSII) e 0,62 g (7,52 % em peso) de ácido húmico sintético (AHSIII), respectivamente.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS AHS

3.2.1 Análise Elementar

Segundo a literatura²⁴ a composição elementar dos ácidos húmicos tem valores médios de 53,8-58,7% para o carbono, 3,2-6,2% para o hidrogênio, 32,8-38,3% para o oxigênio, 0,8-4,3% para o nitrogênio e 0,1-1,5% para o enxofre. Na Tabela 3.1 são mostrados os valores de composição elementar e teor de cinzas. Os AHSI e AHSII mostraram uma quantidade de oxigênio superior a 40% pela análise elementar (valores calculados por diferença), apresentando similaridade com a quantidade de oxigênio encontrada para o ácido húmico natural AH1 que também mostrou valor acima de 40%. O AHSIII apresentou uma menor quantidade de oxigênio com relação aos AHSI e AHSII, porém apresentou uma maior quantidade de nitrogênio em sua estrutura que os outros AHS. A quantidade de nitrogênio presente no AHSIII pode favorecer o processo de complexação com íons metálicos.

Tabela 3.1 – Características físico-químicas das amostras de ácidos húmicos sintéticos (AHSI, AHSII e AHSIII) e ácido húmico natural extraído de solo (AH1).

Amostras	N	C	H	S	O*	Teor de Cinzas
	%					%(m/m)
AH1	3,9	44,5	4,9	0,7	46,0	7,0
AHSI	0,3	54,6	3,2	0	41,9	5,0
AHSII	0,3	55,6	3,4	0	40,7	0,8
AHSIII	6,0	56,5	3,7	0	33,8	6,5

*Calculado por diferença: % O = 100 – % (C + H + N + S).

3.2.2 FTIR

As Figuras de 3.2 a 3.5 mostram espectros referentes aos precursores utilizados nas sínteses dos ácidos húmicos e também das amostras de AH sintéticas obtidas. Observou-se que os espectros de AH sintéticos apresentaram algumas bandas que são características de AH naturais. Também se observou um alargamento das bandas para os ácidos húmicos sintéticos, o que nos confirma que houve a reação de polimerização desejada. A banda observada em 1.700 cm^{-1} nos espectros de FTIR das amostras de AH sintéticas obtidas, indicando a presença de grupos carboxílicos, mostra que em alguns casos, a aromaticidade inicial do anel é perdida devido a reações de degradação e incorporação desses produtos na cadeia principal.

Nas Figuras 3.2 e 3.3 as curvas são, respectivamente, o espectro de FTIR da hidroquinona e AH sintético obtido a partir da hidroquinona, e da p-benzoquinona e AH sintético obtido a partir da p-benzoquinona. Pelos espectros mostrados podemos observar as seguintes bandas de absorção para os AH sintéticos obtidos a partir dos precursores hidroquinona e p-benzoquinona:

3.400 cm^{-1} (estiramento OH ligado) esta banda confirma a presença abundante de grupos OH no AH sintético;

1.199 cm^{-1} (estiramento C-OH) que confirma a presença dos grupos OH;

1.618 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O dos íons carboxilato, COO^- , estiramento C=C dos anéis aromáticos, estiramento C=O) pode ser devido aos grupos 1,2 e 1,4 - quinona presentes no anel;

1.700 cm^{-1} indica a presença dos grupos cetonas, lactonas ou carboxílico;

Também são observadas bandas que confirmam a natureza aromática do composto:

1.504 cm^{-1} (estiramento C=C dos anéis aromáticos);

1.451 cm^{-1} (deformação C-H dos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$);

818 cm^{-1} (impressão digital de grupos aromáticos) pode ser devido a deformação fora do plano de C-H.

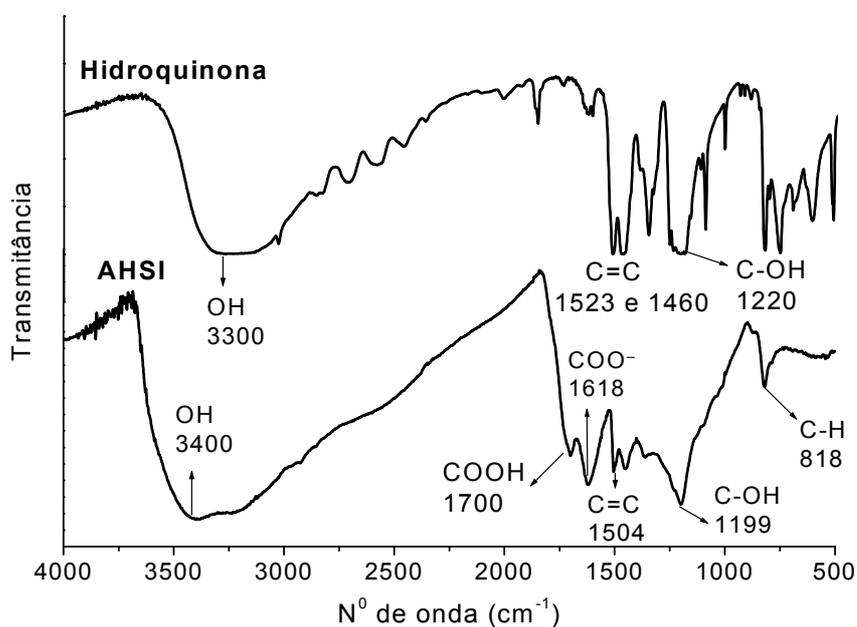


Figura 3.2 – Espectros de FTIR da hidroquinona e ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona (AHSI).

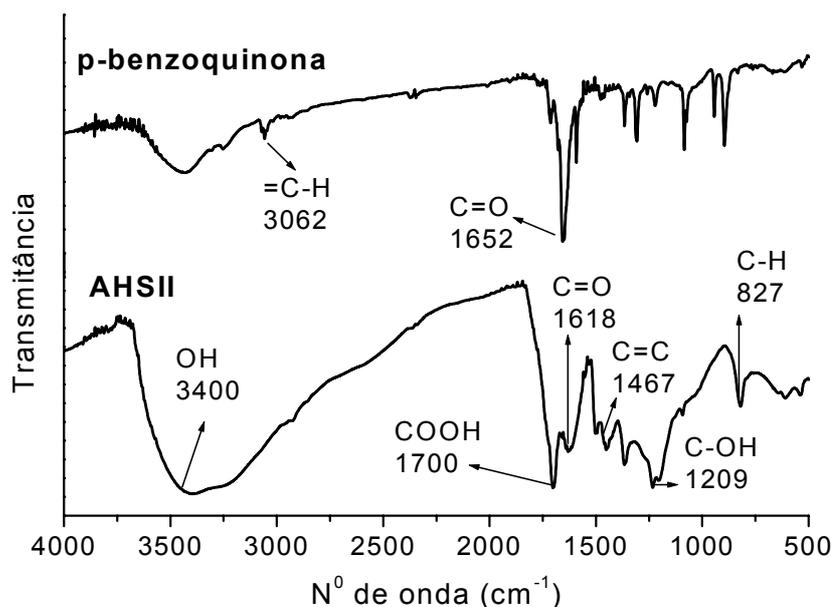


Figura 3.3 – Espectros de FTIR da p-benzoquinona e ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona (AHSII).

Na Figura 3.4 as curvas são respectivamente o espectro de FTIR da hidroquinona, ácido 4-aminobenzóico e AH sintético obtido a partir da mistura de hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico. Pelo espectro mostrado podemos observar as seguintes bandas de absorção para o AH sintético:

3.225 cm^{-1} (estiramento OH ligado e estiramento N-H) esta banda confirma a presença abundante de grupos OH no AH sintético;

1.700 cm^{-1} indica a presença dos grupos cetonas, lactonas ou carboxílico.

1.600 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O dos íons carboxilato, COO^- , estiramento C=C dos anéis aromáticos, estiramento C=O) pode ser devido aos grupos 1,2 e 1,4 - quinona presentes no anel;

1.287 cm^{-1} (deformação axial C-N);

1.167 cm^{-1} (estiramento C-OH) que confirma a presença dos grupos OH.

Também são observadas bandas que confirmam a natureza aromática do composto:

1.510 cm^{-1} (estiramento COO^- , deformação N-H ou deformação NH_2);

1.411 cm^{-1} (deformação C-H dos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$);

777 cm^{-1} (impressão digital de grupos aromáticos) pode ser devido a deformação fora do plano de C-H.

Também são observadas bandas que confirmam a natureza aromática do composto:

1.510 cm^{-1} (estiramento C=C dos anéis aromáticos);

1.411 cm^{-1} (deformação C-H dos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$);

777 cm^{-1} (impressão digital de grupos aromáticos) pode ser devido a deformação fora do plano de C-H.

Na Figura 3.4 também podemos observar as seguintes bandas para o espectro do ácido 4-aminobenzóico puro:

3.370 cm^{-1} (deformação axial assimétrica do N-H);

2.680 cm^{-1} (deformação axial de O-H);

1.668 cm^{-1} (deformação axial de C=O) indica a presença de grupos carboxílicos;

1.599 cm^{-1} (vibração de estiramento C=C de anéis aromáticos);

1.422 cm^{-1} (deformação angular no plano de C-O-H);

1.320 cm^{-1} (deformação axial C-N). A absorção aparece em frequências mais altas do que as absorções correspondentes das aminas alifáticas porque a constante de força de ligação C-N é aumentada pela ressonância com o anel;

770 cm^{-1} (Vibração de deformação fora do plano de C-H em anel aromático para-dissubstituído);

624 cm^{-1} (Vibração de deformação fora do plano de C-H em anel aromático para-dissubstituído).

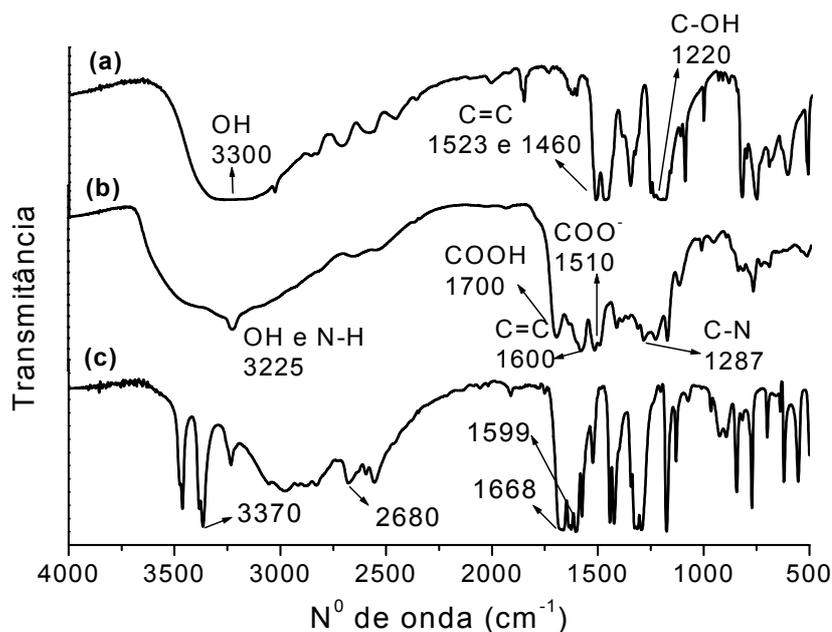


Figura 3.4 – Espectros de FTIR: (a) hidroquinona, (b) ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico(AHSIII) e (c) ácido 4-aminobenzóico.

A Figura 3.5 mostra os espectros das amostras de AH sintéticas. Observou-se semelhança entre os espectros obtidos, todos os espectros apresentaram sinal em torno de 3.400 cm^{-1} , que é devido a grupos OH, confirmando a presença do mesmo nas amostras de AH sintéticas. Para a amostra AHSIII o sinal em torno de 3.400 cm^{-1} também pode estar relacionado com a presença de N-H devido a utilização de composto que já possui o grupamento NH_2 como no caso do ácido 4-aminobenzóico para a obtenção do AHSIII. Observou-se nos espectros uma banda em torno de 1.700 cm^{-1} indicando a presença de grupos carboxílicos nas amostras AHSI, AHSII e AHSIII. Também se observou em todos os espectros sinal em torno de 1.504 cm^{-1} devido a estiramento de C=C de anéis aromáticos, confirmando a presença de anéis aromáticos em todas as amostras de AH sintéticas.

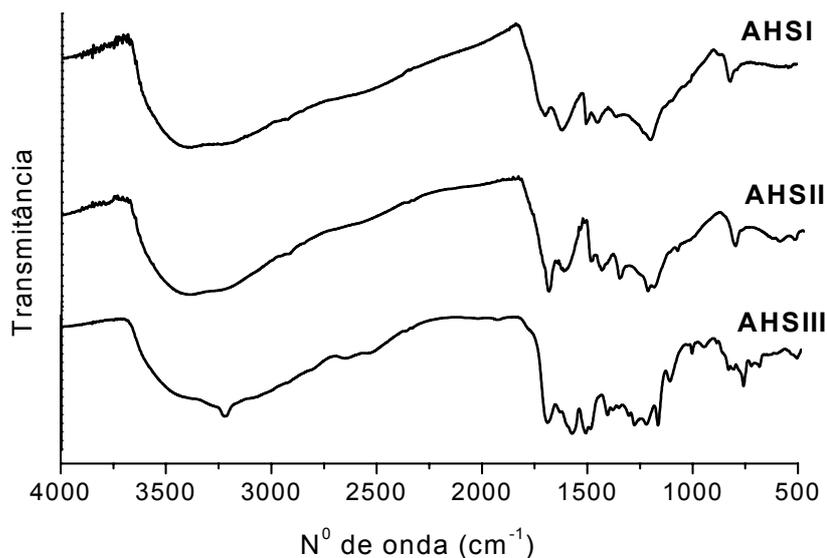


Figura 3.5 – Espectros de FTIR de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII), hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).

3.2.3 RMN

Experimentos de RMN de ^{13}C para obter informações sobre a composição de grupos funcionais dos AH sintéticos e do AH1 extraído de solo foram realizados em laboratório e os espectros obtidos estão mostrados na Figura 3.6.

O espectro do AH extraído de solo (AH1) apresenta bandas que podem ser associadas a diversos grupos funcionais alifáticos (CH, C-N, O-CH₃, carboidratos) e aromáticos (CH e fenólicos). Os espectros dos polímeros fenólicos sintetizados (AHSI e AHSII) entretanto, somente apresentam bandas associadas à carbonos aromáticos em anéis fenólicos (CH e fenólicos). Esta estrutura obtida é semelhante a estrutura da lignina que é um dos precursores do AH do solo e constitui entre 15 e 20% da matéria orgânica. Posteriormente a lignina é degradada pelos microrganismos mudando sua estrutura. Já a estrutura obtida utilizando a hidroquinona juntamente com o ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) como precursores apresenta grupos funcionais tais como aminas, carboxílicos e fenólicos, aproximando-se da estrutura desejada, já que nos AH estão presentes grupos funcionais tais como aminas, carboxílicos e cadeias alifáticas. Em todas as amostras de AH sintéticas observou-se um deslocamento

químico em torno de 110 ppm, cuja a intensidade de sinal é maior do que a intensidade dos sinais na região de aromáticos (105-140 ppm) para o AH1 extraído de solo, que possui baixa intensidade. Este resultado, pode ser confirmado pelo cálculo dos percentuais dos grupos funcionais associados as bandas correspondentes nos espectros (Tabela 3.2).

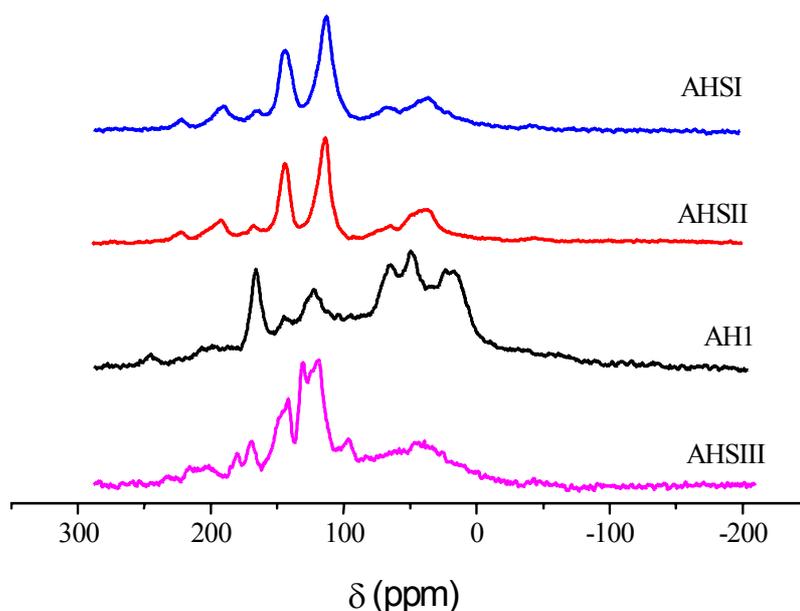


Figura 3.6 – Espectro de RMN de ^{13}C das amostras sintetizadas a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII), de ácido húmico (AH) extraídos de solo (AH1), hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).

Na Tabela 3.2 mostram-se os percentuais dos grupos funcionais associados as bandas correspondentes (Figura 3.6): grupos alifáticos (0-45ppm), N-alifáticos e metoxílicos (45-65ppm), O-alifáticos (65-105ppm), aromáticos (105-140ppm), O-aromáticos (140-160ppm), carboxílicos (160-185ppm) e carbonílicos (185-230ppm).

Tabela 3.2 - Intensidades relativas (% da área total) das bandas nos espectros de RMN de ^{13}C VACP/MAS de amostras sólidas de AH natural (AH1) e AH sintético (AHSI, AHSII e AHSIII) mostrados na Figura 3.6.

Amostra	(0-45)	(45-65)	(65-105)	(105-140)	(140-160)	(160-185)	(185-230)
AH1	25,32	16,06	21,14	16,41	6,75	9,97	4,30
AHSI	-	-	-	63,00	30,18	6,82	-
AHSII	-	-	-	62,32	31,28	6,40	-
AHSIII	15,00	7,61	15,53	32,45	15,29	8,08	6,03

3.2.4 Medidas Condutométricas

Através da titulação condutométrica de 0,1028 g de AH sintético preparado com o precursor p-benzoquinona utilizando como titulante hidróxido de sódio $0,052 \text{ mol L}^{-1}$, determinou-se a acidez total desta amostra.

A Figura 3.7, mostra o ponto estequiométrico da titulação. Observa-se nitidamente o encontro de duas retas, definindo bem um único ponto estequiométrico, sugerindo a existência de uma família de grupos ácidos predominantes. Normalmente com ácidos húmicos, observam-se dois pontos de equivalência representados por duas regiões distintas de grupos ácidos, carboxílicos e fenólicos.

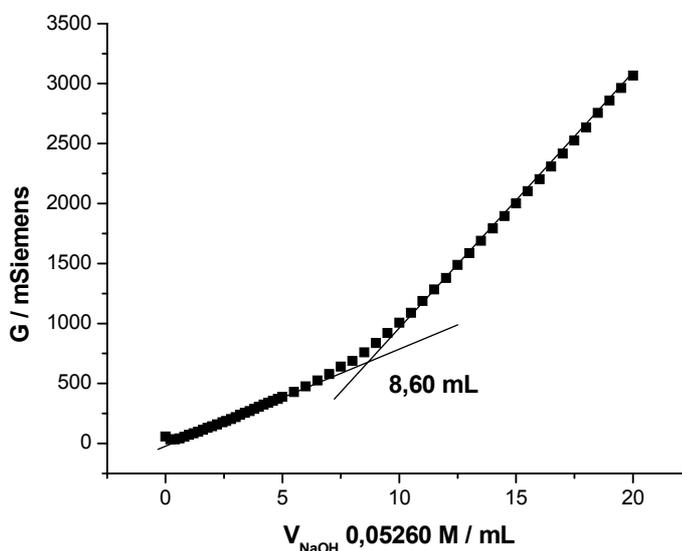


Figura 3.7 - Titulação condutométrica da amostra de AHSII (p-benzoquinona) titulado com NaOH $0,05260 \text{ mol L}^{-1}$.

A acidez total, ou seja, a soma da acidez dos grupos ácidos, foi de $4,40 \text{ moles de H}^+ \text{ kg}^{-1}$ de sólido da amostra de AHSII.

Através da titulação condutométrica de 0,0912 g de AH sintético preparado a partir dos precursores hidroquinona e ácido 4-aminobenzóico utilizando como titulante hidróxido de sódio 0,102 mol L⁻¹, determinou-se a acidez total desta amostra.

A Figura 3.8, mostra o ponto estequiométrico da titulação.

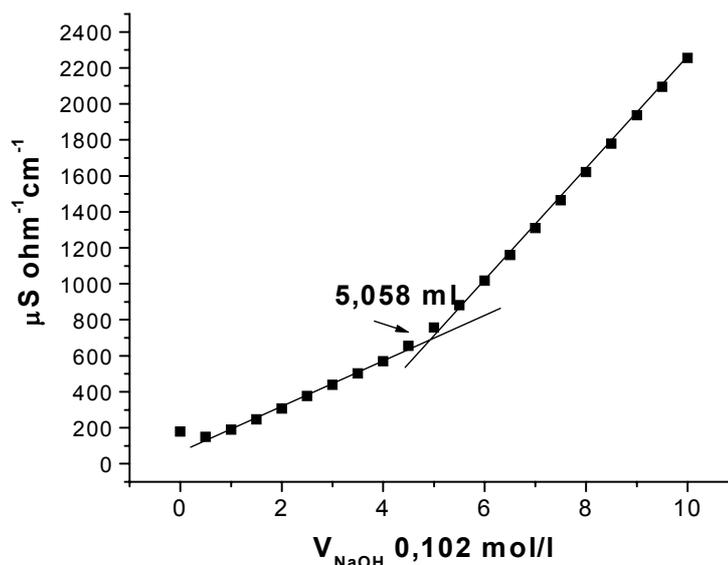


Figura 3.8 – Titulação condutométrica da amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico) titulado com NaOH 0,102 mol L⁻¹.

A acidez total, ou seja, a soma da acidez dos grupos ácidos, foi de 5,66 moles de H⁺ kg⁻¹ de sólido da amostra de AH sintético, um valor cerca de três vezes menor que aquele estimado para a titulação dos dois grupos fenólicos da hidroquinona. Sem dúvida a polimerização diminui o teor de grupos ácidos. O valor obtido é comparável com o de ácidos húmicos e fúlvicos.

3.2.5 Medidas Potenciométricas

Nos experimentos realizados procurou-se eliminar efeitos de matriz ajustando a força iônica com eletrólito de fraca interação com ácidos húmicos e tomando algumas medidas na calibração do eletrodo, como descrito em materiais e métodos no item 2.12. Escolheu-se o cloreto de potássio para esta finalidade, sendo um eletrólito do tipo uni-univalente.

Realizaram-se titulações potenciométricas de $p[H^+]$ (pH condicional expressando concentração e não atividade) em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ajustada com cloreto de potássio, das amostras de ácido húmico sintéticas obtidas através de polimerização oxidativa a partir dos precursores p-benzoquinona (AHSII) e hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII). Utilizou-se como titulante uma solução mista de hidróxido de potássio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,038 \text{ mol L}^{-1}$, solução esta que minimiza potenciais de junção causado pela alta mobilidade de íons OH^- . Confeccionou-se um gráfico com os dados de potencial obtidos da titulação, onde, no cruzamento das retas obtidas encontrou-se o ponto de neutralidade. A Figura 3.9 elucida melhor a idéia. O cruzamento entre as retas da titulação alcalina com a reta da titulação ácida nos fornece o valor de $\frac{1}{2} pK_w'$ da ionização da água em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O valor de $p[OH^-]$ inicial desta solução titulante é 1,523. Descontando-se do pK_w' da água neste meio, estimado em 13,724, calcula-se o valor de 12,201 para o $p[H^+]$.

Os gráficos potenciométrico e derivativo mostrados na Figura 3.10 e Figura 3.11 foram obtidos dos potenciais provenientes da titulação potenciométrica, utilizando-se um eletrodo de vidro, calibrado para a região ácida e para a região alcalina (Figura 3.9), obtendo-se o pK_w' condicional para a água nessa força iônica, 13,724.

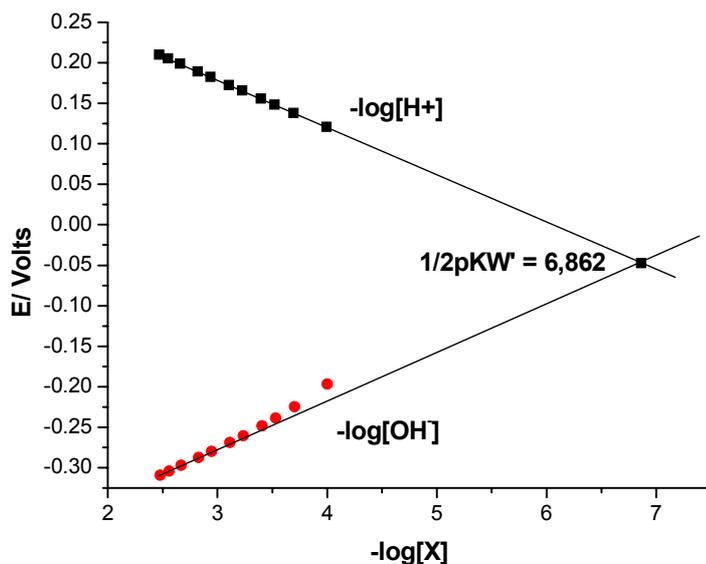


Figura 3.9 – Curva de calibração do eletrodo de vidro: meio KCl/ eletrólito misto (KOH 0,03 mol L⁻¹, KCl₃COO 0,06 mol L⁻¹ e KCl 0,038 mol L⁻¹), força iônica 0,5 mol L⁻¹.

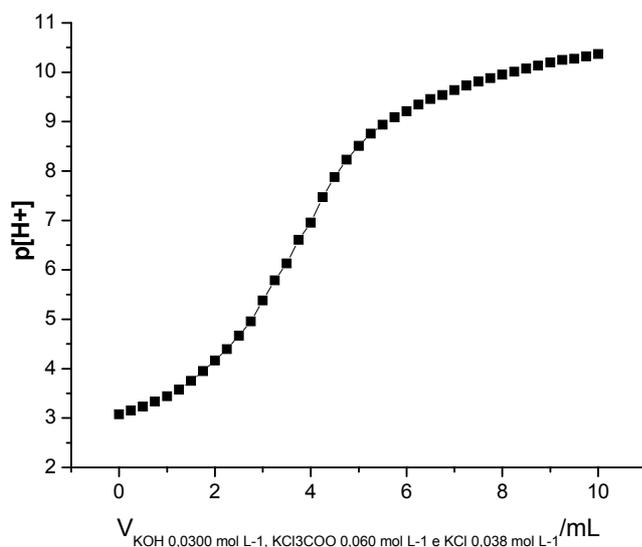


Figura 3.10 – Curva Potenciométrica de 0,0505 g amostra de AHSII (p-benzoquinona), em força iônica 0,5 mol L⁻¹ e titulado com uma solução mista de KOH 0,3 mol L⁻¹, KCl₃COO 0,06 mol L⁻¹ e KCl 0,038 mol L⁻¹.

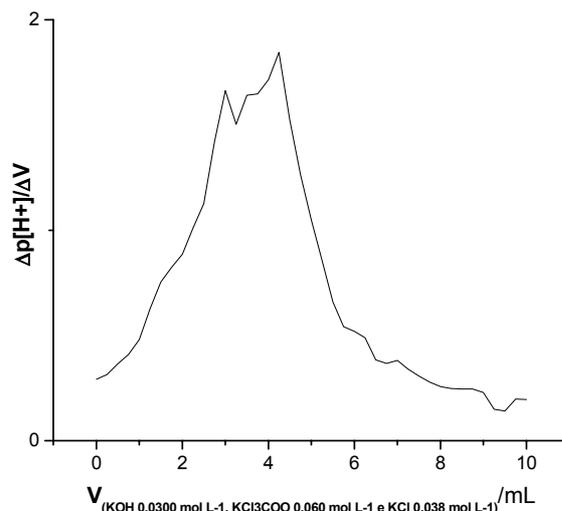


Figura 3.11 – Curva derivativa (ver Figura 3.10) dos dados de potencial da titulação de 0,0505 g amostra de AHSII (p-benzoquinona), em força iônica 0,5 mol L⁻¹ e titulado com uma solução mista de KOH 0,03 mol L⁻¹, KCl₃COO 0,06 mol L⁻¹ e KCl 0,038 mol L⁻¹. Dados analisados utilizando o programa computacional Microcal Origin 6.0.

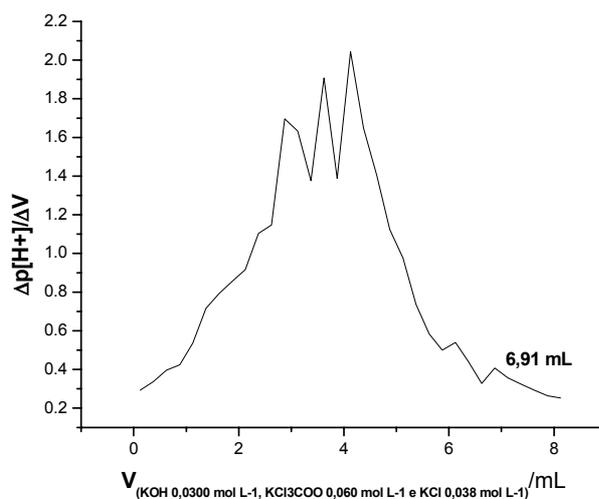


Figura 3.12 – Curva derivativa (ver Figs. 3.10 e 3.11) dos dados de potencial da titulação de 0,0505 g de amostra de AHSII (p-benzoquinona), em força iônica 0,5 mol L⁻¹ e titulado com uma solução mista de KOH 0,03 mol L⁻¹, KCl₃COO 0,06 mol L⁻¹ e KCl 0,038 mol L⁻¹. Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) e Microcal Origin 6.0.

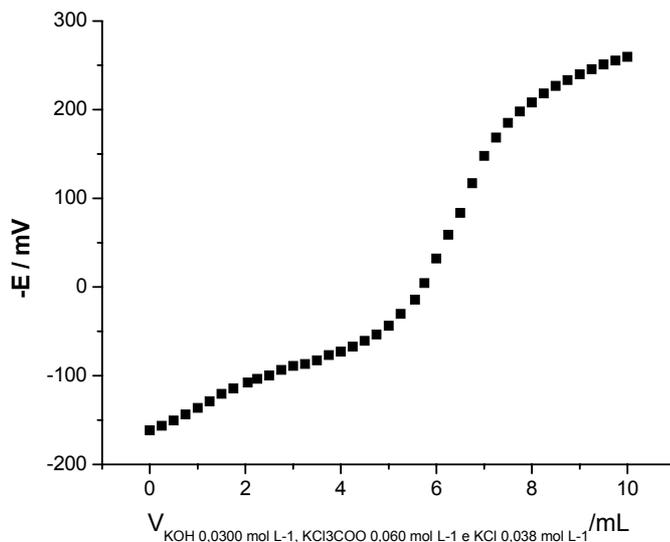


Figura 3.13 – Curva potenciométrica de 50 mg de amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico), em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de $\text{KOH } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{KCl}_3\text{COO } 0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,038 \text{ mol L}^{-1}$.

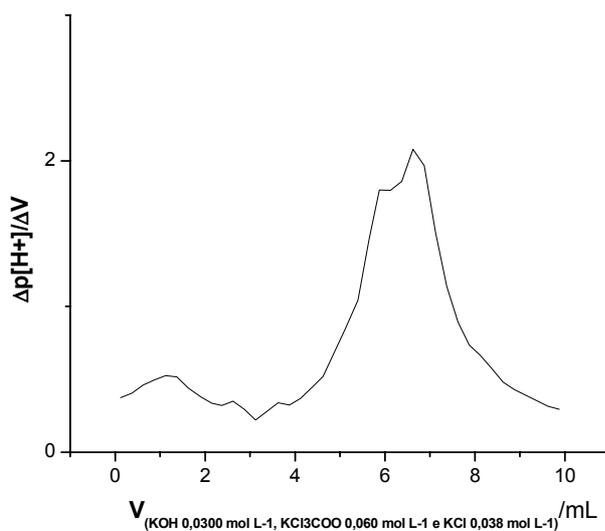


Figura 3.14 – Curva derivativa (ver Figura 3.13) dos dados de potencial da titulação de 50 mg amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico), em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de $\text{KOH } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{KCl}_3\text{COO } 0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional Microcal Origin 6.0.

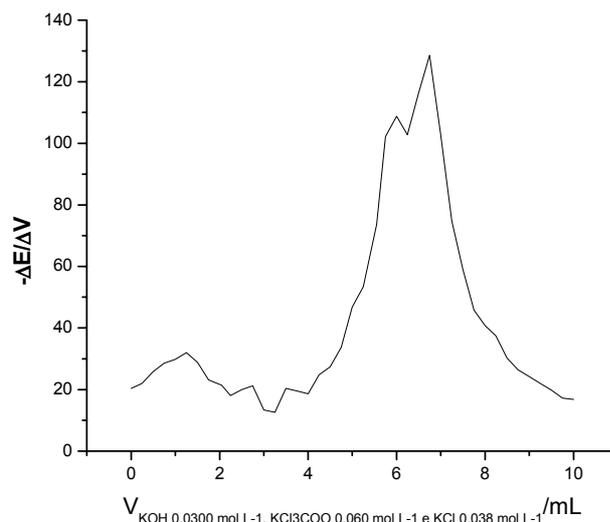


Figura 3.15 – Curva derivativa (comparar com dados das Figuras 3.13 e 3.14) dos dados de potencial da titulação de 50 mg amostra de AHSIII (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico), em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) com transferência de dados para Microcal Origin 6.0.

Nas curvas potenciométricas derivativas, mostradas nas Figuras 3.11, 3.12, 3.14 e 3.15 percebe-se uma diferença entre os gráficos referentes a primeira derivada ($\Delta\text{pH}/\Delta V$ vs $V_{\text{KOH}, \text{KCl}_3\text{COO}, \text{KCl}}$), com os dados analisados diretamente no Origin, e os dados analisados utilizando o programa QuickBASIC (Derivar.BAS). A derivação feita no sistema Origin causa um certo alisamento na curva derivativa, talvez por utilizar tratamento numérico baseado em ajuste polinomial prévio com os dados potenciométricos.

Nas Figuras 3.12 e 3.15, os picos descendentes correspondem ao volume da solução mista de hidróxido de potássio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ à meia neutralização, enquanto que nos picos ascendentes, correspondem ao volume da solução mista gasto para a neutralização total de cada grupamento ácido presente nas moléculas de AH sintéticos. Portanto, cada pico ascendente corresponde a um grupamento ácido, que foi totalmente neutralizado com a solução mista.

Como podemos observar nas Figuras 3.12 e 3.15 a intensidade dos picos não é igual pois cada grupamento ácido pode apresentar um teor maior ou

menor de acidez. O volume total gasto da solução mista de hidróxido de potássio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ para neutralizar os grupamentos ácidos presentes na amostra de AH sintético (p-benzoquinona) é $6,91 \text{ mL}$ e na amostra de AH sintético (hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico) é $9,36 \text{ mL}$. Estes dados de acidez total são coerentes com aqueles provenientes de titulações condutométricas.

Para se determinar os $\text{pK}'\text{s}$ correspondentes aos grupamentos ácidos neutralizados presentes nas amostras AHSII e AHSIII fizeram-se os gráficos ($\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$ vs $\text{p}[\text{H}^+]_{\text{inter}}$), mostrados nas Figuras 3.16 e 3.17.

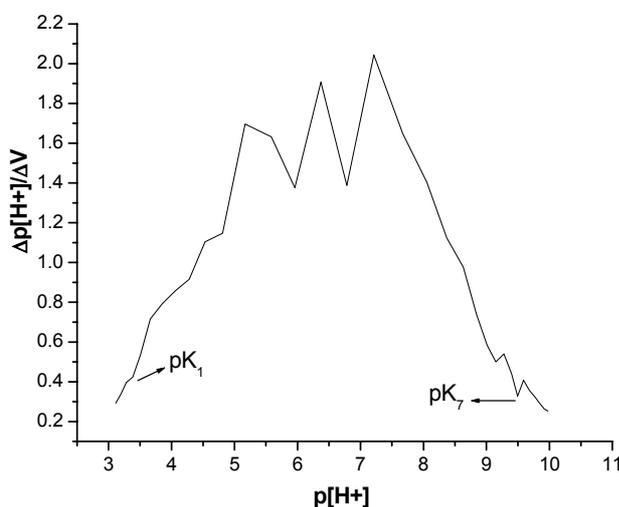


Figura 3.16 – Gráfico $\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$ vs $\text{p}[\text{H}^+]_{\text{inter}}$ para a amostra de AHSII, em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de KOH $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) e Microcal Origin.

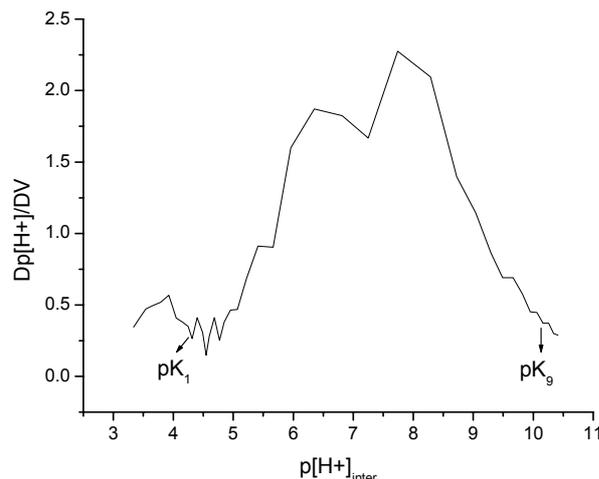


Figura 3.17 – Gráfico $\Delta p\text{H}/\Delta V$ vs $p[\text{H}^+]_{\text{inter}}$ para a amostra de AHSIII, em força iônica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e titulado com uma solução mista de $\text{KOH } 0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{KCl}_3\text{COO } 0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,038 \text{ mol L}^{-1}$. Dados analisados utilizando o programa computacional QuickBASIC (Derivar.BAS) e Microcal Origin.

Nas Figuras 3.16 e 3.17, os valores de pH nos picos descendentes devem corresponder aos valores de pK's, na região de maior efeito tampão, enquanto que os picos ascendentes correspondem ao pH no volume equivalente de solução mista de hidróxido de potássio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{KCl}_3\text{COO } 0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ gasto para a neutralização total dos grupamentos ácidos.

Como podemos observar nos gráficos, a amostra AHSII apresentou sete grupos ácidos tituláveis e a amostra AHSIII apresentou nove grupos ácidos tituláveis.

Os valores dos pK's obtidos para as amostras AHSII e AHSIII estão mostrados na Tabela 3.3 e 3.4, respectivamente.

Tabela 3.3 – Valores de pK's correspondentes aos grupamentos ácidos da amostra AHSII.

Grupamentos Ácidos Titulados	Valores de pK's
pK ₁	3,36
pK ₂	4,27
pK ₃	4,80
pK ₄	5,98
pK ₅	6,81
pK ₆	9,16
pK ₇	9,45

Tabela 3.4 – Valores de pK's correspondentes aos grupamentos ácidos da amostra AHSIII.

Grupamentos Ácidos Titulados	Valores de pK's
pK ₁	3,56
pK ₂	4,32
pK ₃	4,55
pK ₄	4,79
pK ₅	5,54
pK ₆	7,25
pK ₇	9,57
pK ₈	10,06
pK ₉	10,27

As Figuras 3.18 e 3.19 mostram a porcentagem de neutralização de cada grupamento ácido nas moléculas dos AHs sintéticos. Os valores de porcentagem de neutralização foram calculados através dos valores determinados de volume de solução mista de hidróxido de potássio 0,03 mol L⁻¹, KCl₃COO 0,06 mol L⁻¹ e cloreto de potássio 0,038 mol L⁻¹ gasto para neutralizar cada grupamento ácido (Figuras 3.12 e 3.15) e os valores de pK's correspondentes à cada grupamento ácido titulável das moléculas de AH sintético (Tabela 3.3 e 3.4).

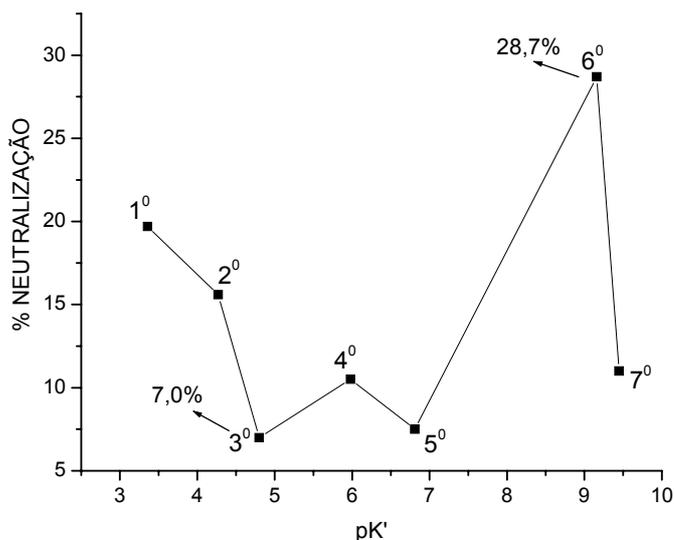


Figura 3.18 - Gráfico de percentagem de neutralização de cada grupamento ácido para a amostra de AHSII vs pK's. Titulante solução mista KOH 0,03 mol L⁻¹, KCl₃COO 0,06 mol L⁻¹ e KCl 0,038 mol L⁻¹.

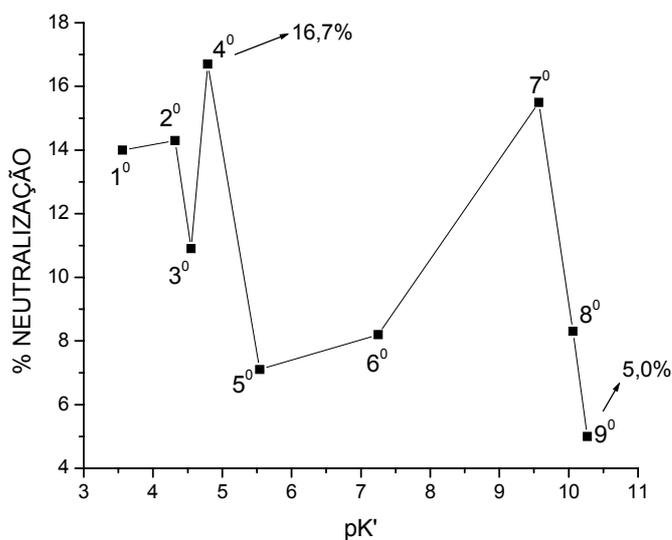


Figura 3.19 – Gráfico de percentagem de neutralização de cada grupamento ácido para a amostra de AHSIII vs pK's. Titulante solução mista de KOH 0,03 mol L⁻¹, KCl₃COO 0,06 mol L⁻¹ e KCl 0,038 mol L⁻¹.

Na Figura 3.18 podemos observar que o 6º pico é o mais intenso, apresentando um percentual de neutralização equivalente a 28,7%, portanto, conclui-se que este é o grupamento ácido mais presente na amostra AHSII. Já o 3º pico é o menos intenso, apresentando um percentual de neutralização equivalente a 7,0%, dessa forma, apresentando o menor teor ácido em relação aos outros grupamentos contidos na amostra AHSII.

Na Figura 3.19 também podemos observar um pico mais intenso, neste caso o 4° pico, que apresentou um percentual de neutralização equivalente a 16,7%, concluindo que este é o grupamento ácido mais presente na amostra AHSIII e o pico menos intenso observado foi o 9° pico, apresentando um percentual de neutralização equivalente a 5,0%, dessa forma apresentando o menor teor ácido em relação aos outros grupamentos contidos na amostra AHSIII.

Nas Tabelas 3.5 e 3.6 estão mostrados os valores percentuais que cada grupamento ácido presente nas amostras AHSII e AHSIII gastou de solução mista de hidróxido de potássio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, KCl_3COO $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de potássio $0,038 \text{ mol L}^{-1}$ para sua neutralização total.

Tabela 3.5 Porcentagem de neutralização para cada grupamento ácido da amostra AHSII.

Grupamentos Ácidos Titulados	% Neutralização
1°	19,7
2°	15,6
3°	7,0
4°	10,5
5°	7,5
6°	28,7
7°	11,0

Tabela 3.6 Porcentagem de neutralização para cada grupamento ácido da amostra AHSIII.

Grupamentos Ácidos Titulados	% Neutralização
1°	14,0
2°	14,3
3°	10,9
4°	16,7
5°	7,1
6°	8,2
7°	15,5
8°	8,3
9°	5,0

3.3 ESTUDO DOS AHS COM METAIS COMPLEXADOS

Uma das grandes vantagens de se usar modelos poliméricos é que os grupos funcionais e átomos doadores de elétrons podem ser regulados por precursores específicos. Utilizamos para complexação dos metais, o AHSII como modelo, que contém somente oxigênio como grupos fenólicos e carboxílicos e o AHSIII, pois além de conter grupos fenólicos e carboxílicos também contém nitrogênio em sua estrutura.

3.3.1 FTIR

Os espectros de FTIR do AHSII sem metais complexados, comparados com os obtidos após a complexação de metais (Figuras 3.20 a 3.22), apresentaram o mesmo comportamento em todos os espectros. De acordo com a literatura⁶⁰ a conversão de COOH para COO⁻ leva a perda de absorção em torno de 1.700 cm⁻¹ (C=O de COOH) e 1.200 cm⁻¹ (estiramento C-OH e deformação OH de COOH). Os espectros dos complexos mostram uma diminuição da absorção próximo a 1.700 cm⁻¹ (estiramento de C=O de COOH) e 1.209 cm⁻¹ (estiramento de C-OH ou deformação OH de COOH) e um aumento na intensidade da banda em 1.618 cm⁻¹ (absorção de COO⁻) quando comparado ao espectro do AHSII sem metais complexados. Essas variações são uma evidência da conversão do COOH a COO⁻ depois da interação do AHSII com os íons metálicos Cu²⁺, Fe³⁺ e Mn²⁺. A posição da banda em 1.618 cm⁻¹ (estiramento assimétrico de COO⁻) pode indicar se a ligação é do tipo iônica ou covalente¹⁹. Especificamente, essa banda desloca para altas frequências quando são formadas ligações covalentes. Para todos os espectros observamos um alargamento da banda em 1.618 cm⁻¹ na direção de baixas frequências.

Os espectros dos complexos de Cu²⁺ e Fe³⁺ mostraram uma diferença com relação ao espectro do complexo Mn²⁺. O ombro em 3.216 cm⁻¹ foi menos pronunciado para os complexos de Cu²⁺ e Fe³⁺ do que para o complexo de Mn²⁺. Segundo PICCOLO e STEVENSON⁶⁰, isto pode indicar que

grupos fenólicos e/ou alcoolicos (banda de estiramento O-H próximo a 3.216 cm^{-1}) participaram juntamente com grupos COOH na complexação de Cu^{2+} e Fe^{3+} (formação de estrutura tipo salicilato). Bandas na região entre $1.150\text{-}1.040\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas à deformação O-H e estiramento C-O de grupos fenólicos e/ou alcoolicos⁴⁴.

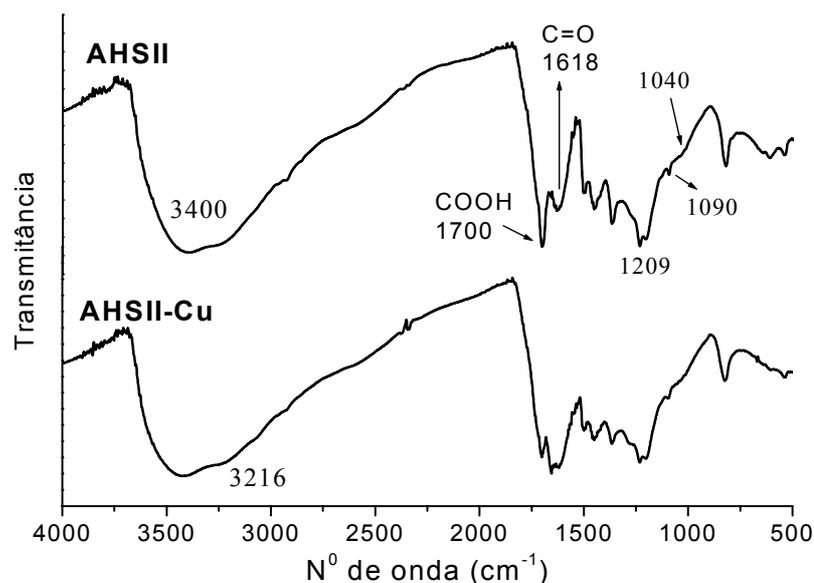


Figura 3.20 – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona (AHSII) e com cobre complexado (AHSII-Cu).

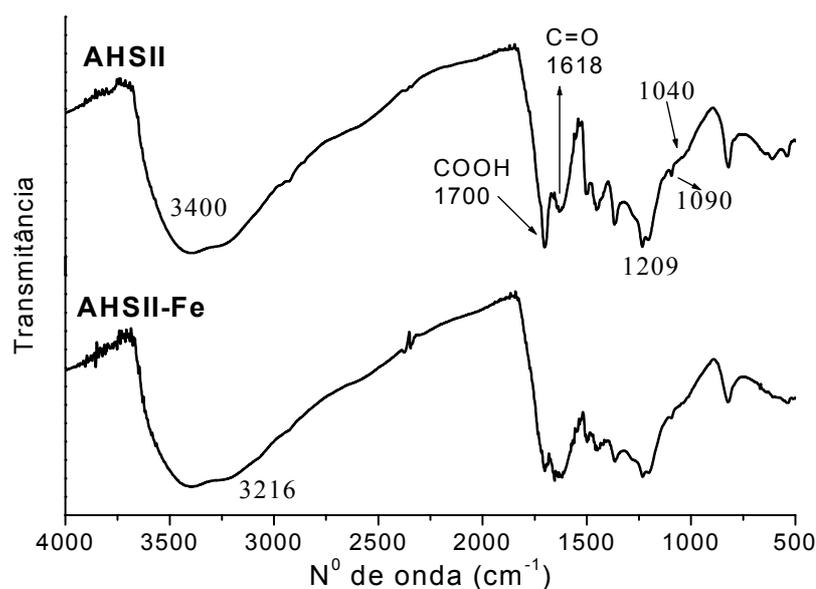


Figura 3.21 - Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona (AHSII) e com ferro complexado (AHSII-Fe).

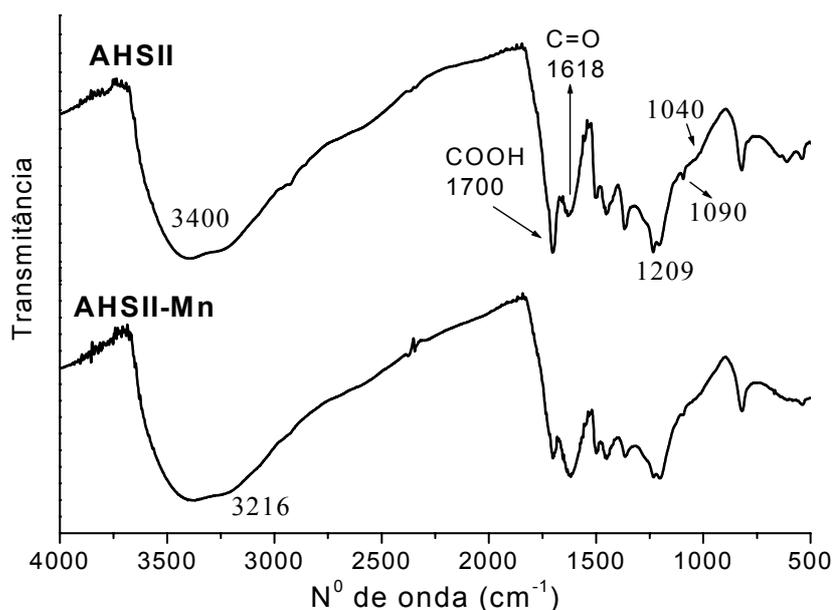


Figura 3.22 – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da p-benzoquinona (AHSII) e com manganês complexado (AHSII-Mn).

Os espectros de FTIR dos complexos de Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} com o AHSIII (Figuras 3.23 a 3.25) mostraram, como no caso dos complexos com AHSII, decréscimo na intensidade da banda em 1.700 cm^{-1} e aumento na intensidade da banda em 1.510 cm^{-1} (absorção de COO^-) quando comparado ao espectro do AHSIII sem metais complexados.

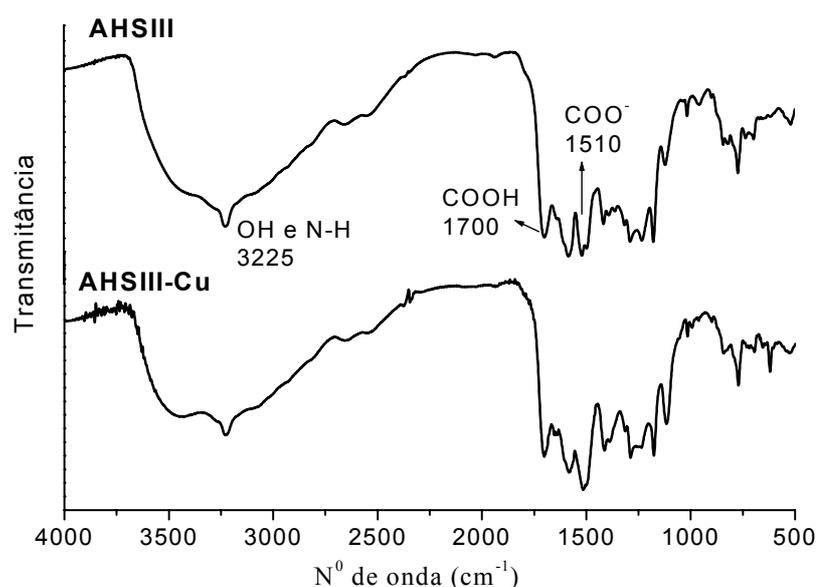


Figura 3.23 – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com cobre complexado (AHSIII-Cu).

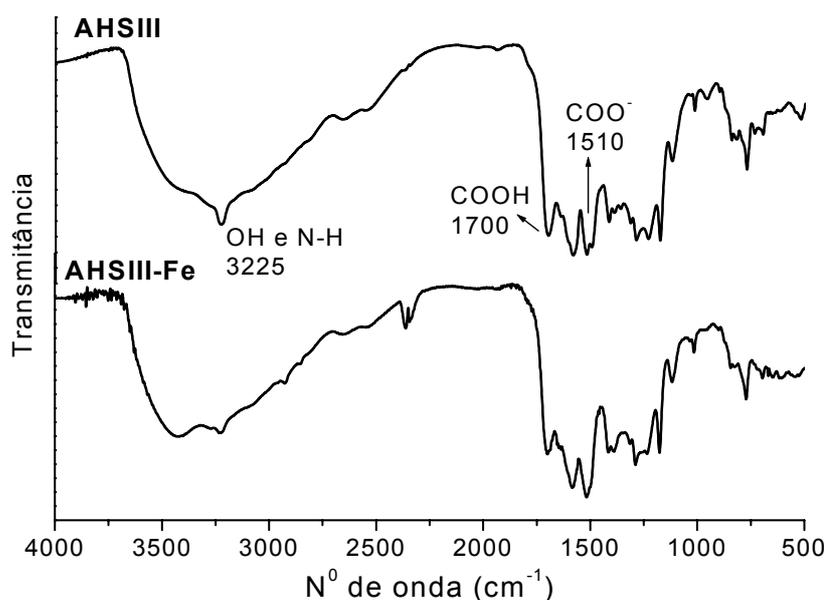


Figura 3.24 – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com ferro complexado (AHSIII-Fe).

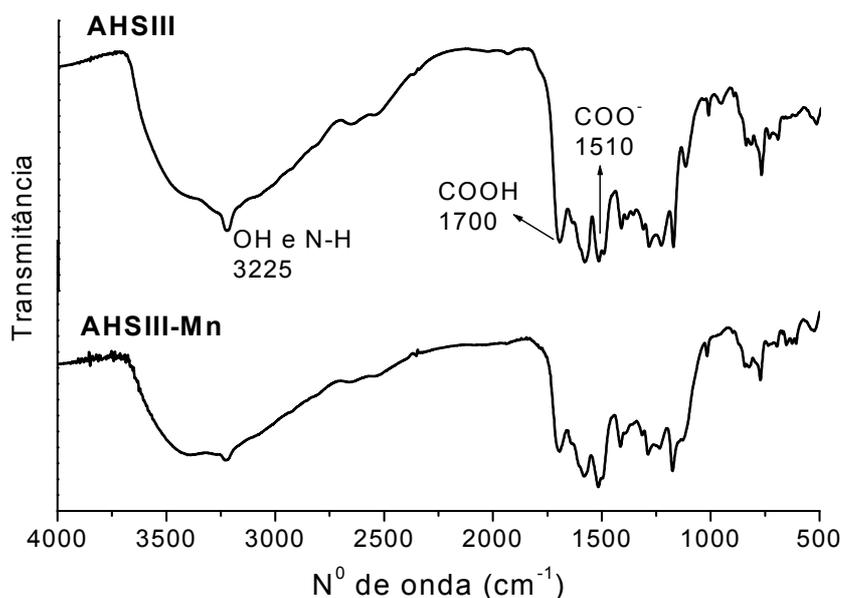


Figura 3.25 – Espectros de FTIR do ácido húmico sintetizado a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com manganês complexado (AHSIII-Mn).

Em todos os espectros dos complexos observamos uma diminuição da intensidade em 3.225 cm^{-1} , isto pode indicar a participação de grupos N–H na complexação dos íons metálicos. O espectro para o complexo de Cu^{2+} mostrou diferença com relação aos espectros dos complexos Fe^{3+} e Mn^{2+} . O ombro em

3.216 cm^{-1} foi menos pronunciado para os complexos de Fe^{3+} e Mn^{2+} do que para o complexo de Cu^{2+} . Como discutido anteriormente, esse comportamento pode indicar que grupos fenólicos e/ou alcoólicos (banda de estiramento O-H próximo a 3.216 cm^{-1}) participaram juntamente com grupos COOH na complexação de Mn^{2+} e Fe^{3+} (formação de estrutura tipo salicilato).

3.3.2 UV-Visível

Em função da grande quantidade e variabilidade de grupos cromóforos, existentes nas moléculas húmicas, os espectros obtidos por absorção de luz no UV-Visível são geralmente formados pela sobreposição de várias bandas, sem máximos definidos, apresentando absorção decrescente com o aumento do comprimento de onda. Sabe-se que a absorbância das SH no UV-Visível é influenciada pelo pH, tipo de solvente e concentração salina do meio¹⁰⁰. Muitos pesquisadores opinam que a cor escura das SH é devida principalmente aos cromóforos na forma ceto e enol¹⁹.

A Figura 3.26 mostra o gráfico de absorção na região de 200 a 800 nm(a) e na região de 400 a 800 nm(b) da amostra de de ácido húmico (AH) extraídos de solo (AH1) e das amostras sintetizadas a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII) e hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico. Tanto para as amostras de AH extraído de solo quanto para as amostras de AH sintéticas é observado uma diminuição da intensidade quando aumenta o comprimento de onda.

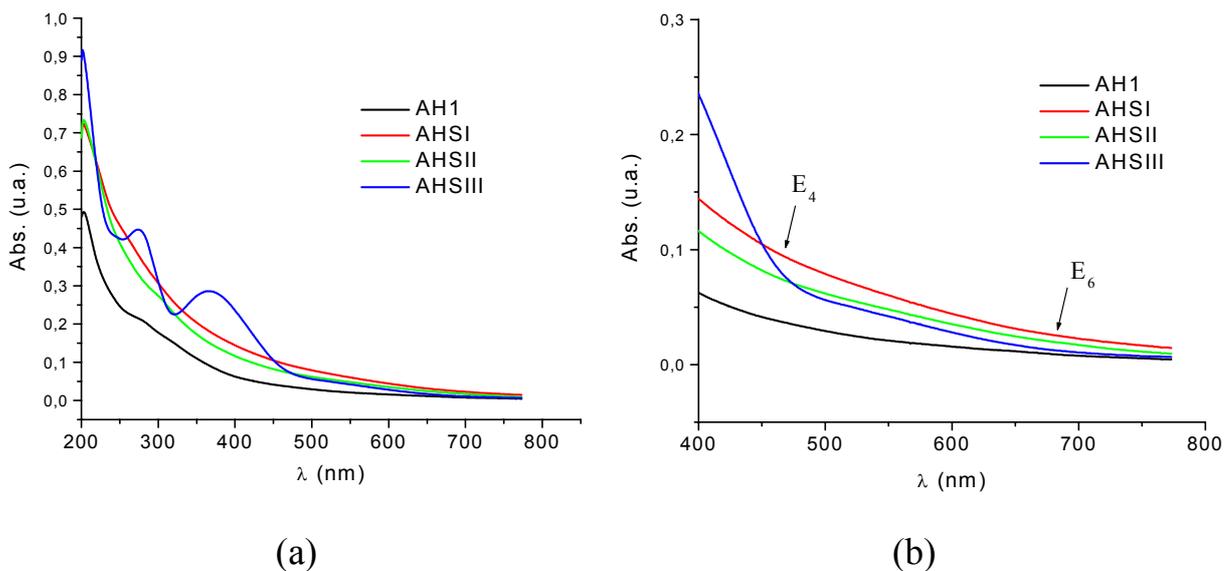


Figura 3.26 - Espectros de absorção na região de 200 a 800 nm (a) e na região de 400 a 800 nm (b) de ácido húmico (AH) extraído de solo (AH1) das amostras sintetizadas a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII) e hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).

Nos espectros das amostras dos ácidos húmicos sintéticos com metais complexados (Figuras 3.27 e 3.28) observou-se um aumento da intensidade com relação as amostras AHSII e AHSIII antes da complexação de metais. Isto provavelmente indica um decréscimo nos grupos COOH contidos e um aumento do tamanho molecular¹⁹.

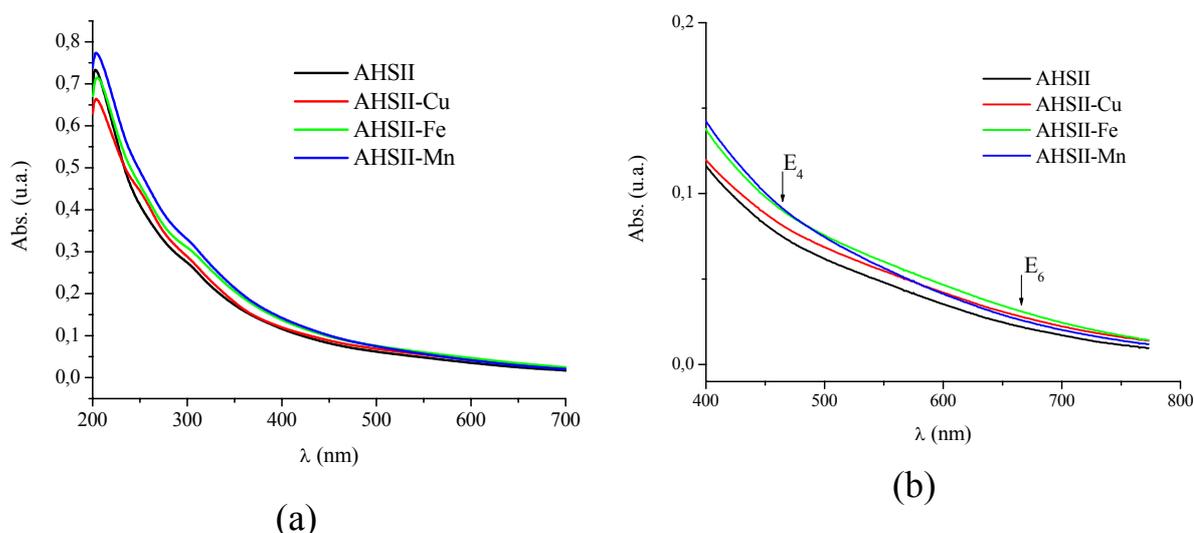


Figura 3.27 - Espectros de absorção na região de 200 a 800 nm(a) e na região de 400 a 800 nm (b) de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu), ferro (AHSII-Fe) e manganês (AHSII-Mn).

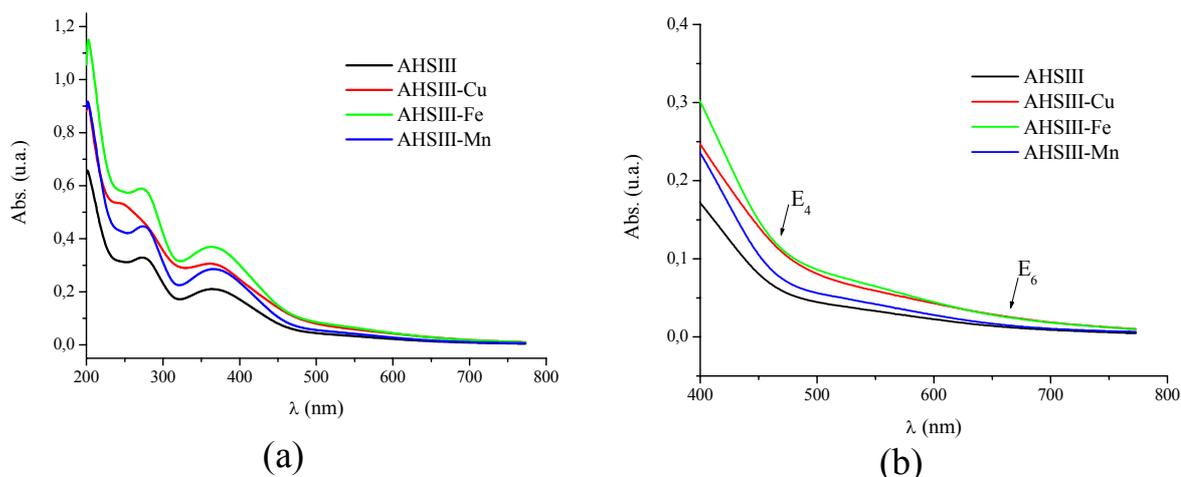


Figura 3.28 - Espectros de absorção na região de 200 a 800 nm (a) e na região de 400 a 800 nm (b) de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSIII-Cu), ferro (AHSIII-Fe) e manganês (AHSIII-Mn).

Através dos gráficos mostrados nas Figuras 3.26 (b), 3.27 (b) e 3.28 (b) pode-se calcular os valores da razão E_4/E_6 . A razão E_4/E_6 está relacionada ao sistema π da molécula húmica e permite, em alguns casos, uma avaliação relativa da massa molecular das amostras. Quando menor essa razão, maior será a liberdade eletrônica do sistema, o que demonstra que a molécula possui maior quantidade de cadeias aromáticas conjugadas. Os valores determinados da razão E_4/E_6 estão mostrados na Tabela 3.7. Os valores da razão E_4/E_6 para o ácido húmico extraído de solo AH1 foi de 3,7, estando de acordo com a literatura, sendo que para AHs de solos o valor de E_4/E_6 varia de 3,0 a 5,0. Isto evidencia que os AH extraídos possuem alta quantidade de anéis aromáticos. Para os ácidos húmicos sintéticos AHSI e AHSII os valores da razão E_4/E_6 foram de 3,3 e 3,4, respectivamente. Pode-se observar semelhança dos compostos sintetizados com os AHs extraídos de solo com relação a alta quantidade de anéis aromáticos. Já para o ácido húmico sintético AHSIII o valor da razão E_4/E_6 encontrado foi de 5,5. Isto evidencia que o AHSIII possui menor quantidade de anéis aromáticos conjugados.

Tabela 3.7 – Razão E_4/E_6 das amostras de ácido húmico (AH) extraído de solo (AH1), sintéticos (AHSI, AHSII e AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu e AHSIII-Cu), ferro (AHSII-Fe e AHSIII-Fe) e manganês (AHSII-Mn e AHSIII-Mn).

Amostras de AH	E_4/E_6
AH1	3,7
AHSI	3,3
AHSII	3,4
AHSII-Cu	2,9
AHSII-Fe	2,9
AHSII-Mn	3,4
AHSIII	5,5
AHSIII-Cu	4,5
AHSIII-Fe	4,8
AHSIII-Mn	5,1

O decréscimo da razão E_4/E_6 está diretamente relacionado com o aumento da massa e tamanho molecular, condensação dos carbonos aromáticos e a aromaticidade e inversamente relacionada à quantidade de grupos alifáticos¹⁹. Observou-se que os valores da razão E_4/E_6 encontrados para as amostras de ácidos húmicos sintéticas com metais complexados decresceram, este comportamento foi semelhante tanto para o AHSII quanto para o AHSIII com metais complexados. Este decréscimo nos valores encontrados da razão E_4/E_6 pode estar relacionado com um aumento no tamanho molecular com a complexação dos metais através da formação de complexos intermoleculares. Pode-se observar que para as amostras em que foram complexados os íons metálicos cobre (AHSII-Cu e AHSIII-Cu) e ferro (AHSII-Fe e AHSIII-Fe) houve um decréscimo maior do valor da razão E_4/E_6 quando comparado com os valores determinados da razão E_4/E_6 para as amostras de ácidos húmicos sintéticas sem os íons metálicos complexados. Enquanto que para as amostras em que foi complexado o íon metálico manganês (AHSII-Mn e AHSIII-Mn) houve um decréscimo menor no valor da razão E_4/E_6 quando comparado com os outros íons metálicos. Além disso, quando comparamos o valor razão E_4/E_6 encontrado para o AHSII de 3,4 com o valor encontrado após a complexação do manganês podemos observar que não houve mudança no valor razão E_4/E_6 . E

para o AHSIII podemos observar apenas um pequeno decréscimo já que o valor da razão E_4/E_6 encontrado para o AHSIII foi de 5,5 e o encontrado após a complexação do manganês foi de 5,1.

3.3.3 Cromatografia por Exclusão de Tamanho

A determinação do tempo morto da coluna empacotada com vidro de porosidade controlada foi realizada utilizando Blue Dextran, um polissacarídeo com peso molecular de 2 000 000, que é totalmente excluído da coluna devido à sua alta massa molecular. O tempo morto da coluna foi de 4,62 min e considerando que a velocidade de eluição utilizada foi de 5 mL min^{-1} , o volume morto é 23,1 mL.

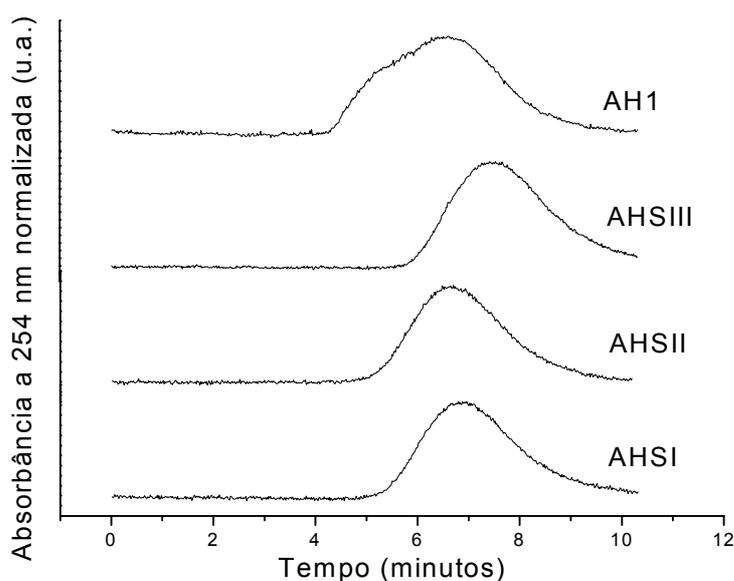


Figura 3.29 – Cromatogramas de amostras de ácido húmico extraído de solo (AH1) e ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII), hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).

A Figura 3.29 mostra os cromatogramas das amostras de ácido húmico extraído de solo (AH1) e ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona (AHSI), p-benzoquinona (AHSII), hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII).

A amostra de AH1 apresentou um ombro em 5,25 min e um pico alargado centrado em torno de 6,52 min. Mostrando uma diversidade de tamanhos moleculares que correspondem a fração de tamanho molecular igual ou menor que 15,6 nm. Não foi possível separar a solução de AH1 em duas frações de tamanho molecular. Isto pode ser porque a coluna cromatográfica foi curta demais para separar esses picos.

Nos cromatogramas das amostras de AH sintéticas observamos somente um pico em todas as amostras com máximo em 6,85 min para o AHSI, 6,70 min para o AHSII e 7,43 min para o AHSIII, que corresponde a fração de tamanho molecular igual ou menor que 15,6 nm. O mesmo foi observado para as amostras sintéticas com metais complexados. As amostras sintetizadas a partir do composto p-benzoquinona (AHSII) com os metais complexados, Cu, Fe e Mn apresentaram picos em 6,10, 6,50 e 6,30 min respectivamente (Figura 3.30). A amostra sintetizada a partir dos compostos hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) com os metais complexados, Cu, Fe e Mn apresentaram picos em 6,84, 6,94 e 6,94 min, respectivamente (Figura 3.31).

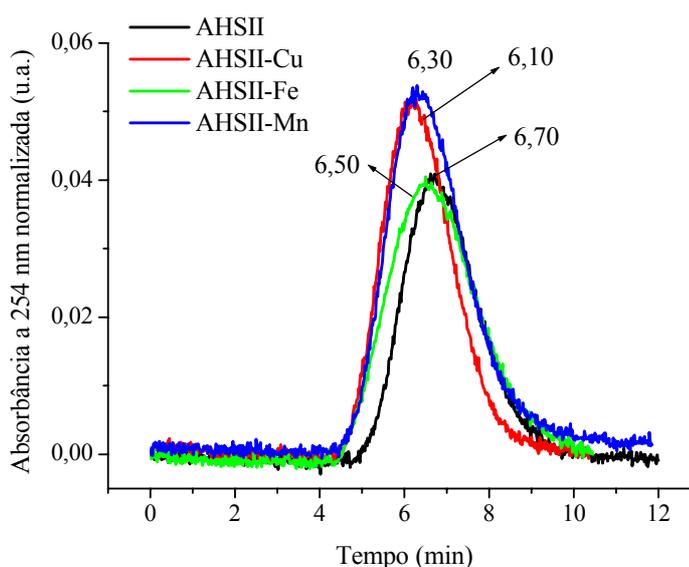


Figura 3.30 – Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu), ferro (AHSII-Fe) e manganês (AHSII-Mn).

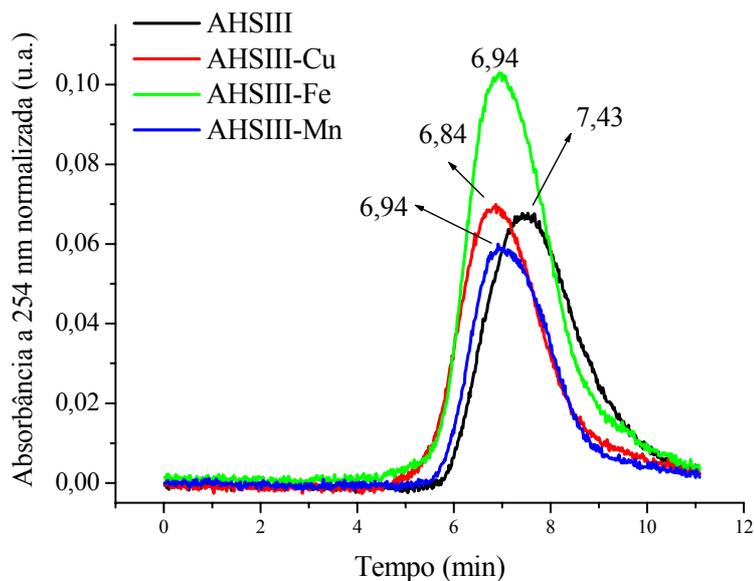


Figura 3.31 – Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSIII-Cu), ferro (AHSIII-Fe) e manganês (AHSIII-Mn).

Embora os valores de tempo de eluição estejam próximos, com desvio padrão de 0,01 segundos, fica evidente a variação do tamanho molecular, ou seja, a tendência ao aumento do tamanho molecular, das amostras de AH sintéticos com a complexação de metais. Os dados obtidos com a fluorescência de luz no UV-Visível mostram que existe uma diminuição na intensidade de fluorescência que pode estar relacionada ao aumento do tamanho molecular com a complexação dos metais.

Esta variação observada no tamanho molecular com a complexação de metais nas amostras de AH sintéticos correlacionou-se com os valores calculados para a razão E_4/E_6 , que mostraram um aumento no tamanho molecular após a complexação dos íons metálicos Cu, Fe e Mn às amostras de ácidos húmicos sintéticos.

3.3.4 Fluorescência de luz no UV-Visível

A fluorescência de luz no UV-Visível é uma das poucas técnicas que investiga as SH em concentrações e condições naturais, fornecendo assim, informações estruturais das moléculas que as compõe.

As principais vantagens desta técnica são a alta sensibilidade e seletividade, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados. Nas substâncias húmicas, os principais fluoróforos presentes, grupos capazes de absorver e emitir energia, na forma de luz, são sistemas com alto grau de conjugação, como por exemplo anéis aromáticos e grupos do tipo quinona.

A extensão do sistema de elétrons π , o nível de substituição por heteroátomos, o tipo e o número de grupos substituintes no anel aromático, afetam grandemente a intensidade de fluorescência e o comprimento de onda. Devido à complexidade molecular e heterogeneidade de materiais húmicos, o espectro de fluorescência, observado em qualquer um dos três modos de fluorescência, é provavelmente a soma dos espectros de vários fluoróforos diferentes presentes na molécula. A complexidade química e estrutural das moléculas húmicas, representam um obstáculo para a identificação individual dos componentes responsáveis pela fluorescência das SH⁵⁶. Usando-se modelos pode-se obter mais informações com relação a esses componentes, já que, os grupos funcionais e átomos doadores de elétrons podem ser regulados por precursores específicos.

A Figura 3.32 ilustra os espectros no modo excitação, obtidos para as amostras de AHS e amostras de complexos com AHS. Os espectros de excitação com emissão em $\lambda = 500$ nm, obtidos para o AHSII e complexos mostraram máximos em 230, 250, 340, 390 e 430 nm. As amostras AHSIII e complexos mostram máximos em 230, 250 e 430 nm. SENESI *et al.*⁵⁶ fizeram uma comparação entre os espectros obtidos para as substâncias húmicas de várias fontes e concluíram que apesar das diferenças nos espectros, existe uma

ocorrência regular de alguns picos sugerindo três regiões comuns aos espectros, no qual ocorrem a fluorescência. Essas regiões seriam em comprimento de onda longo (480-440 nm), comprimento de onda médio (400-380 nm) e comprimento de onda curto (360-300 nm).

Após a complexação dos íons metálicos às amostras de AHSII e AHSIII, todos os espectros (Figura 3.32) mostraram uma diminuição da intensidade de fluorescência na região de comprimento de onda de 200 a 350 nm e um aumento da intensidade de fluorescência na região de comprimento de onda de 375 a 460 nm. Na região de comprimento de onda de 375 a 460 nm, houve um pequeno deslocamento das bandas para o vermelho. Sendo que, o deslocamento das bandas para o vermelho foi mais visível para os complexos com o AHSII. A diminuição da intensidade de fluorescência foi mais acentuada nas amostras de AHSII e AHSIII complexadas com o íon cobre.

A diminuição na intensidade de fluorescência pode estar relacionada com um aumento no tamanho molecular após a complexação do íons metálicos⁷⁹. O aumento da intensidade de fluorescência na região de 375 a 460 nm pode estar relacionado com a diminuição dos grupos COOH na molécula após a complexação com íons metálicos. Segundo SENESI *et al.*⁵⁶ os picos de fluorescência em comprimentos de ondas longos estão associados a presença de substituintes como grupos carbonilas e carboxílicos, havendo uma diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento desses grupos na molécula. SPARK e SWIFT⁷⁹ encontraram redução da intensidade relativa com o aumento do tamanho molecular, e, também obtiveram resultados que indicam um aumento da intensidade de fluorescência com o decréscimo de grupos C=O, C de aromáticos e grupos COOH.

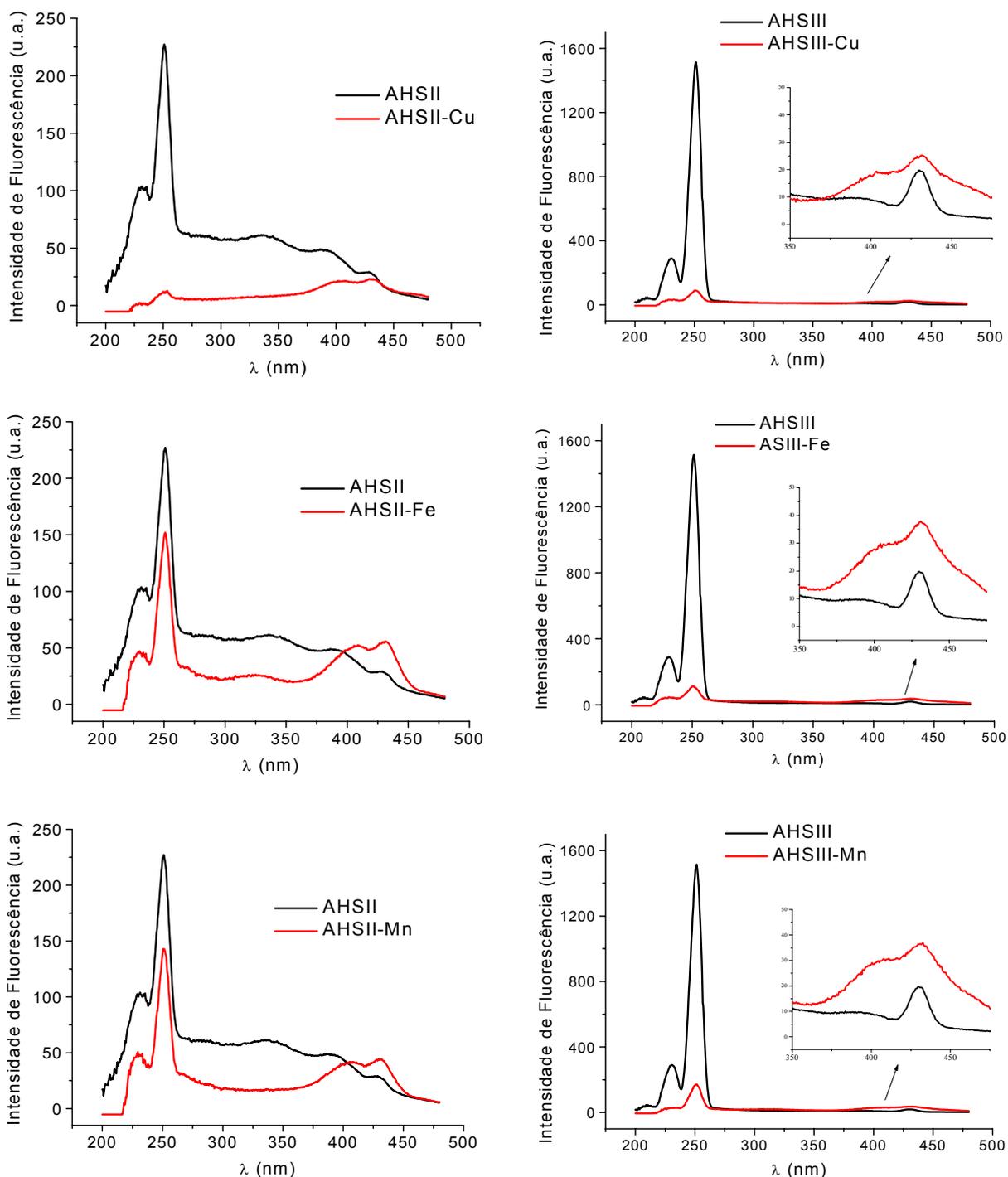


Figura 3.32 – Espectros de excitação com emissão em 500 nm de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) e a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu e AHSIII-Cu), ferro (AHSII-Fe e AHSIII-Fe) e manganês (AHSII-Mn e AHSIII-Mn).

A Figura 3.33 ilustra os espectros de emissão obtidos para as amostras de AHS e amostras de complexos com os AHS. Os espectros de emissão com excitação em $\lambda = 330$ nm, obtidos para o AHSII e complexos,

apresentaram uma banda em 370 nm e uma banda larga de emissão centrada em 433 nm. Os espectros para o AHSIII e complexos mostraram uma banda em 370 nm e uma banda larga em 429 nm.

Para os espectros de emissão, após a complexação dos íons metálicos às amostras de AHSII e AHSIII, também podemos observar que todos os espectros (Figura 3.33) mostraram uma diminuição da intensidade de fluorescência. Quando comparados, os complexos de AHSII com cobre, ferro e manganês, observou-se que houve uma diminuição da intensidade de fluorescência mais acentuada na amostra de AHSII complexada com o íon cobre.

Estudos mostraram que quando íons Cu^{2+} são adicionados ao ácido fúlvico de solo ocorre nos espectros de emissão e ou excitação um considerável decréscimo na intensidade de fluorescência¹⁰¹.

Mudanças foram observadas no espectro de excitação de um ácido fúlvico de solo com a adição dos íons Cu^{2+} e Fe^{2+} , indicando que os grupos fluoróforos são de algum modo envolvidos na complexação. Os dois picos de excitação característicos do ácido fúlvico sofreram uma redução na intensidade que foi diretamente relacionada com a concentração do metal. A posição do pico em 465 nm permaneceu inalterado quando mais metal foi adicionado, no entanto, a intensidade relativa da banda em 360 nm decresceu gradualmente e houve um deslocamento para maiores comprimentos de onda¹⁰¹. Outro estudo¹⁰¹, também com ácido fúlvico, mostrou uma diminuição na intensidade de fluorescência na complexação com íons Mn^{2+} .

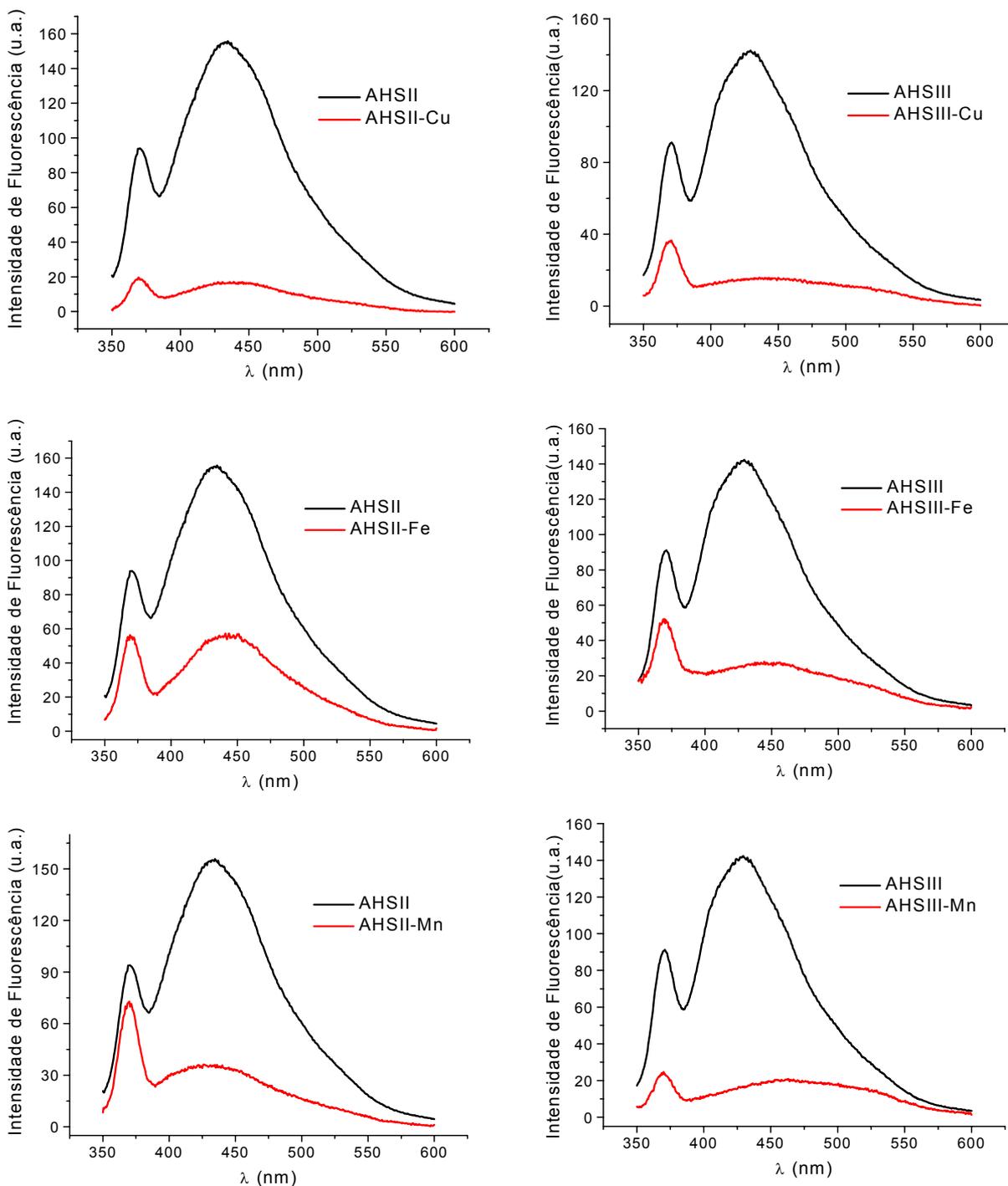


Figura 3.33 – Espectros de emissão com excitação em $\lambda = 330$ nm de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) e a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) e com metais complexados: cobre (AHSII-Cu e AHSIII-Cu), ferro (AHSII-Fe e AHSIII-Fe) e manganês (AHSII-Mn e AHSIII-Mn).

De acordo com SENESI¹⁰¹, acredita-se que a intensidade de fluorescência, nos modos de emissão e excitação, decresce com o aumento da massa molecular da amostra. Vários fatores podem contribuir para uma menor intensidade de fluorescência de moléculas grandes. Por exemplo, a presença de metais, como o ferro associado a sistemas eletrônicos π , pode diminuir a intensidade de fluorescência, aumentando a energia do estado singlete para o tripleto. Por outro lado, grupos doadores de elétrons, tais como, grupos hidroxil e metoxil, em pequenas moléculas, podem aumentar a fluorescência pelo aumento da probabilidade de transição entre os estados fundamental e singlete. Pode ocorrer deslocamento do comprimento de onda com a diminuição do tamanho molecular das frações, devido a mudanças no número e orientação dos grupos funcionais, ou a propensão da molécula para formar ligações de hidrogênio.

Com aumento na massa molecular, há um deslocamento do pico de emissão para o vermelho acompanhado por um alargamento. Esses efeitos são atribuídos a uma maior proximidade dos cromóforos aromáticos e ao consequente aumento da probabilidade de desativação dos estados excitados por “*quenching*” interno em moléculas com elevado peso molecular¹⁰¹.

ALBERTS *et al.*¹⁰² compararam frações obtidas por cromatografia de exclusão de tamanho de três amostras, ácido fúlvico e húmico extraído de solo e matéria orgânica natural extraída de água de rio. Pela cromatografia o ácido húmico extraído de solo apresentou frações maiores e distribuição de carbono diferente pela absorção UV, com relação àquela observada para o ácido fúlvico isolado do mesmo solo e o material orgânico extraído de água de rio. No entanto, a distribuição do material fluorescente no ácido húmico é muito similar àquele encontrado para o ácido fúlvico e matéria orgânica de água de rio. Eles observaram que os componentes fluorescentes da mistura ocorrem em frações específicas, com tamanho molecular menor. Indicando que a fluorescência das

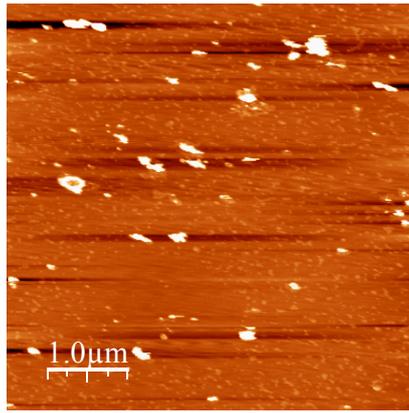
três amostras, mesmo de fontes diferentes, aparentemente pode estar associada com moléculas do mesmo tamanho.

Uma óbvia consideração é a distribuição dos fluoróforos como uma função do tamanho molecular dos componentes da mistura. Intuitivamente, pode parecer que moléculas grandes têm maior potencial para possuir sistemas altamente conjugados, que podem proporcionar maior fluorescência. No entanto, moléculas com conjugação estendida, também são capazes de absorver luz. Misturas de ácidos húmicos têm em média maiores tamanhos moleculares do que ácidos fúlvicos, no entanto, foi mostrado que misturas de compostos com grandes tamanhos, definidos por ultracentrifugação, mostram menores intensidades de fluorescência por unidade de carbono do que materiais menores¹⁰³.

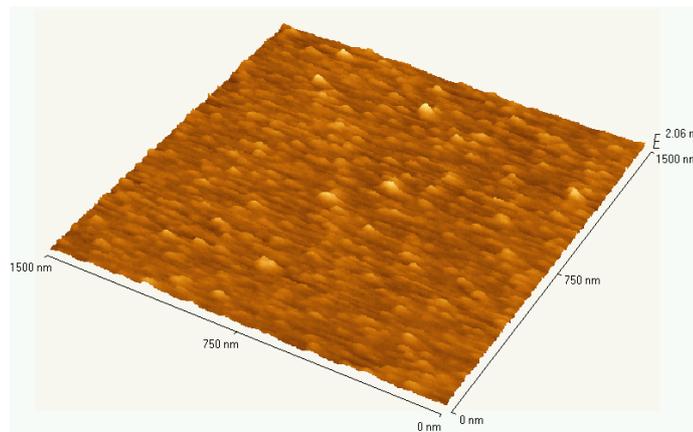
É plausível que os fluoróforos presentes nas grandes moléculas de ácidos húmicos de solo estejam mais impedidos dentro do corpo da matriz hidrofóbica do que aqueles nos ácidos fúlvicos e materias aquáticos.

3.3.5 Caracterização por Microscopia de Força Atômica

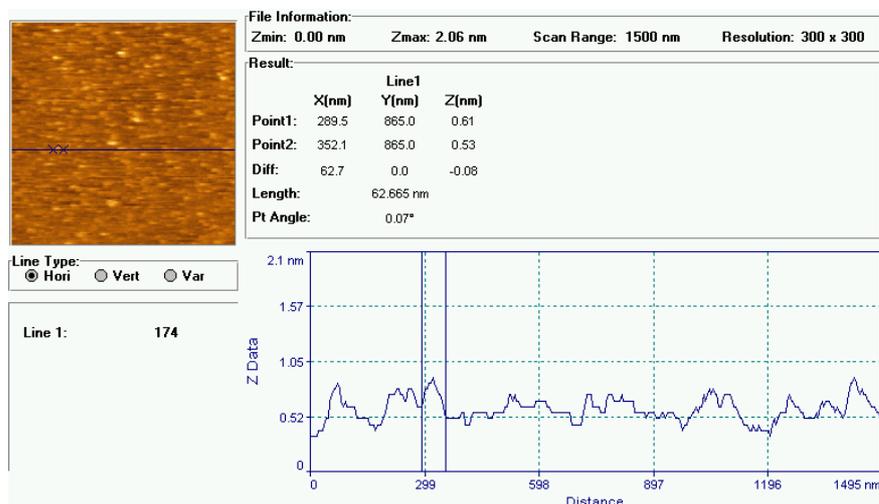
A condição para adsorção das moléculas dos AH na superfície da mica é a inexistência de repulsão eletrostática entre as moléculas dos AH e a superfície do substrato devido aos grupos carboxílicos dos AH. Portanto, considerando o valor do pKa em torno de 4 do grupo carboxílico das moléculas dos AH, é necessário ajustar o pH das suspensões de AH para valores de pH menores que o pKa desse grupo funcional¹⁹.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.34 – Imagens de microscopia de força atômica de ácido húmico extraído de solo (AH1) sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato (5 x 5 μm) (a); imagem ampliada de uma região mostrando a distribuição de partículas na superfície da mica (1.5 x 1.5 μm) (b); análise de seção da imagem de ácido húmico (AH1) para partículas (c).

A Figura 3.34a, apresenta uma imagem dos AH1 sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato. Nessa imagem observamos pequenas partículas distribuídas pela superfície da mica e também alguns agregados. É possível observar uma tendência de interação entre as partículas adsorvidas, ressaltando as associações intermoleculares entre as moléculas dos AH para valores baixos de pH. Uma ampliação da imagem anterior foi necessária para mostrar a distribuição das partículas (Figura 3.34b). A Figura 3.34c mostra que as partículas adsorvidas de AH têm um diâmetro de $\approx 60 - 80$ nm.

Os ácidos húmicos sintéticos AHSII e AHSIII foram investigados sob as mesmas condições experimentais do ácido húmico extraído de solo (AH). As imagens do AHSII e AHSIII podem ser vistas nas Figuras 3.35 e 3.36, respectivamente. Nessas imagens podemos observar uma forma globular para as partículas e novamente uma tendência a agregação. A esfera observada e medida nessas imagens apresentou um diâmetro de 140-150 nm para o AHSII e 50-60nm para o AHSIII.

A repulsão eletrostática dos grupos ionizáveis $-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$ favorece uma conformação estendida das moléculas de AH para valores de pH maiores e força iônica baixos. Por outro lado, um aumento na força iônica ou um decréscimo do pH favorecem uma conformação mais globular das moléculas dos AH devido a blindagem das cargas. Sob essas condições, interações intermoleculares entre as moléculas são favorecidas, levando a formação dos agregados húmicos¹⁰⁴.

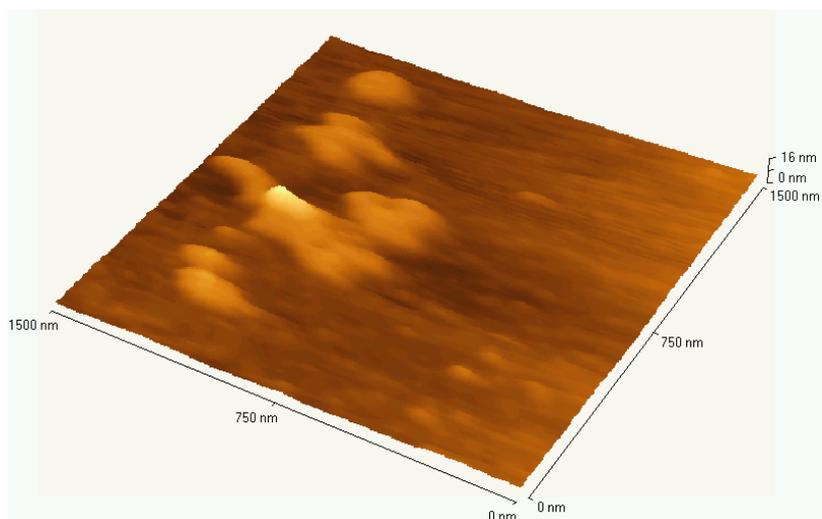


Figura 3.35 – Imagem de microscopia de força atômica de ácido húmico sintético AHSII sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato.

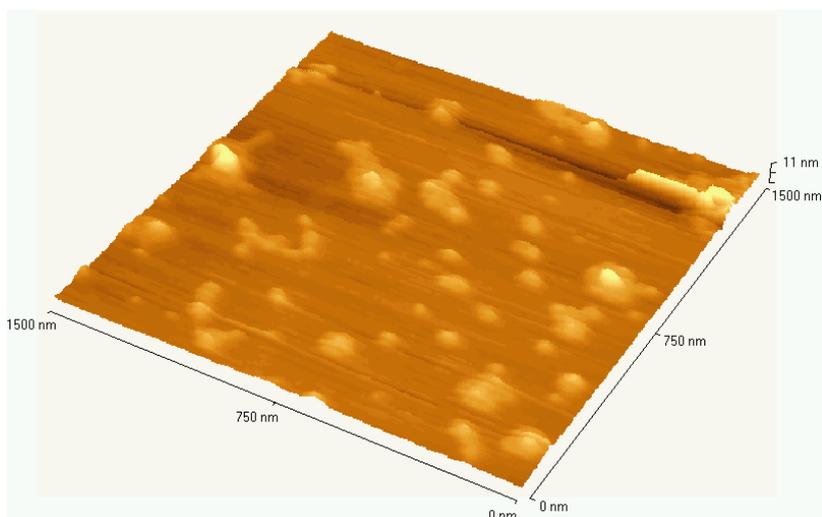


Figura 3.36 – Imagem de microscopia de força atômica de ácido húmico sintético AHSIII sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato.

As mudanças morfológicas para o AHSII na presença dos íons metálicos Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} são mostrados na Figura 3.37. Na presença dos íons Cu^{2+} , o material forma poucos agregados afastados, na forma de estruturas globulares. Também se observam algumas partículas dispersas sobre a superfície da mica, com diâmetro na faixa de 140-150 nm (Figura 3.37a). Observamos o mesmo comportamento com relação ao complexo com o íon ferro (Figura 3.37b), sendo que os aglomerados mostram diâmetro lateral de 107 nm. O complexo com manganês (Figura 3.37c) também mostra a formação de

agregados, porém mostra uma quantidade maior de partículas e uma maior dispersão das mesmas sobre a mica, com partículas medindo em torno de 70-80 nm. Para o complexo com manganês as imagens mostram partículas na forma de esferas, porém também pode-se observar partículas na forma de cones que não foram observadas para os complexos com cobre e ferro.

Em todos os complexos dos íons metálicos com AHSII observa-se agregados em um aparente arranjo de partículas menores.

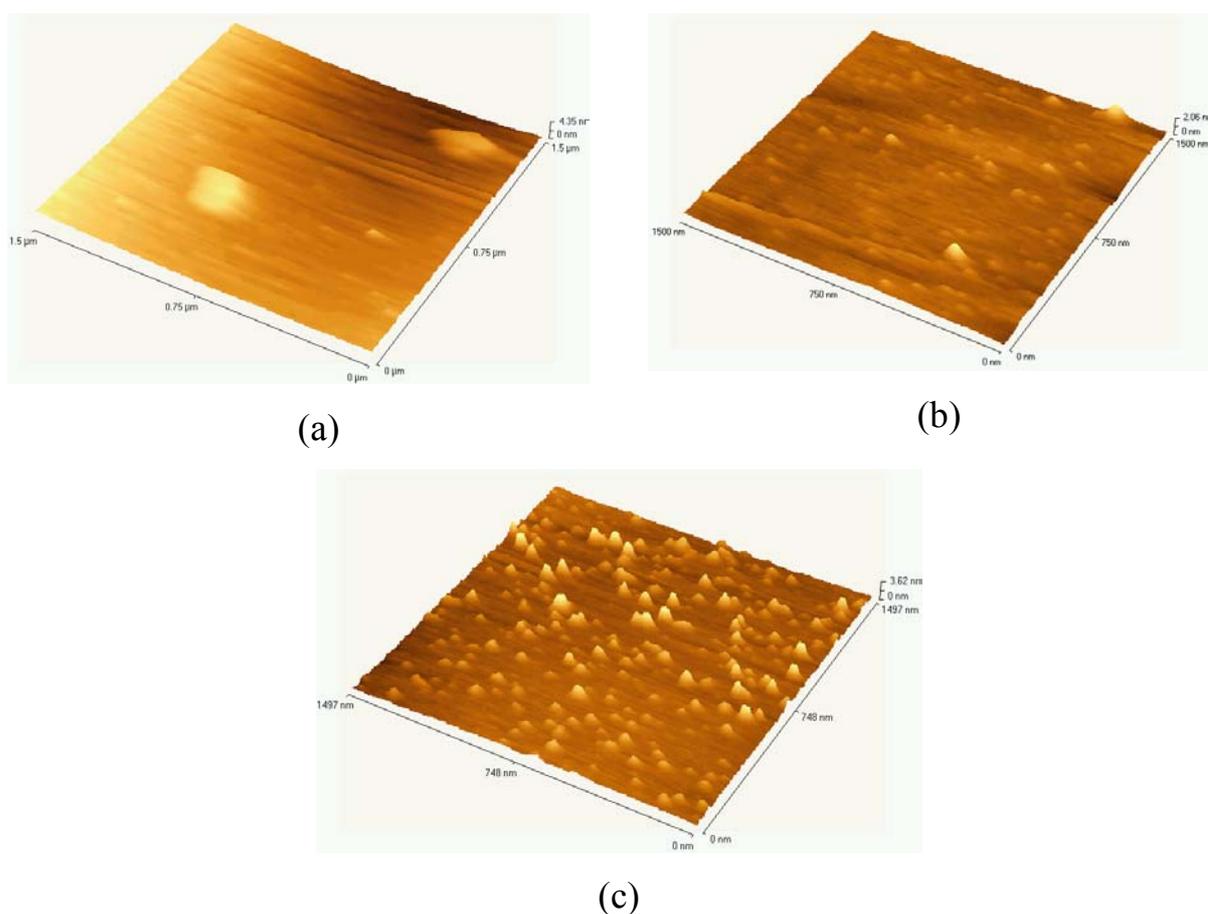


Figura 3.37 – Imagens de microscopia de força atômica de ácidos húmicos sintetizados a partir da p-benzoquinona (AHSII) com metais complexados: (a) cobre (AHSII-Cu), (b) ferro (AHSII-Fe) e (c) manganês (AHSII-Mn), sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato.

As imagens do AHSIII na presença dos íons metálicos Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} são mostrados na Figura 3.38. Para o complexo com cobre (Figura 3.38a), não foi possível medir o diâmetro das partículas, pois as imagens mostraram a formação de estruturas do tipo esponja cobrindo a superfície da mica, como um

filme. O complexo com íon ferro (Figura 3.38b), mostrou a formação de estruturas do tipo “esponja” cobrindo a superfície da mica, porém, com morfologia globular, com aparente medida de diâmetro lateral na faixa de 180-190nm. As imagens não mostraram partículas dispersas sobre a mica. O complexo com manganês (Figura 3.38c), mostra a formação de agregados, e uma maior dispersão das partículas sobre a mica, com partículas medindo em torno de 40-50 nm. Para o complexo de AHSIII com manganês a imagem é semelhante a obtida para o complexo AHSII-Mn, onde mostram partículas na forma de esferas, porém também pode-se observar partículas na forma de cone.

Para os complexos dos íons metálicos com AHSIII observa-se variações na morfologia para cada íon metálico complexado.

As morfologias variáveis, ambas partículas, dos AHS e complexos de AHS, observadas por AFM, estão em concordância com dados reportados pela literatura, tais como pequenas esferas, agregados de esferas e estrutura tipo esponja^{105,106}. Os complexos dos ácidos húmicos sintéticos AHSII e AHSIII exibem uma morfologia um tanto similar aquela observada para o AH natural. A presença dos íons metálicos cobre, ferro e manganês levaram a formação de estruturas do tipo agregados em um aparente arranjo de partículas menores para o AHSII. As amostras AHSIII-Cu e AHSIII-Fe mostraram uma morfologia uniforme do tipo esponja, cobrindo a superfície da mica.

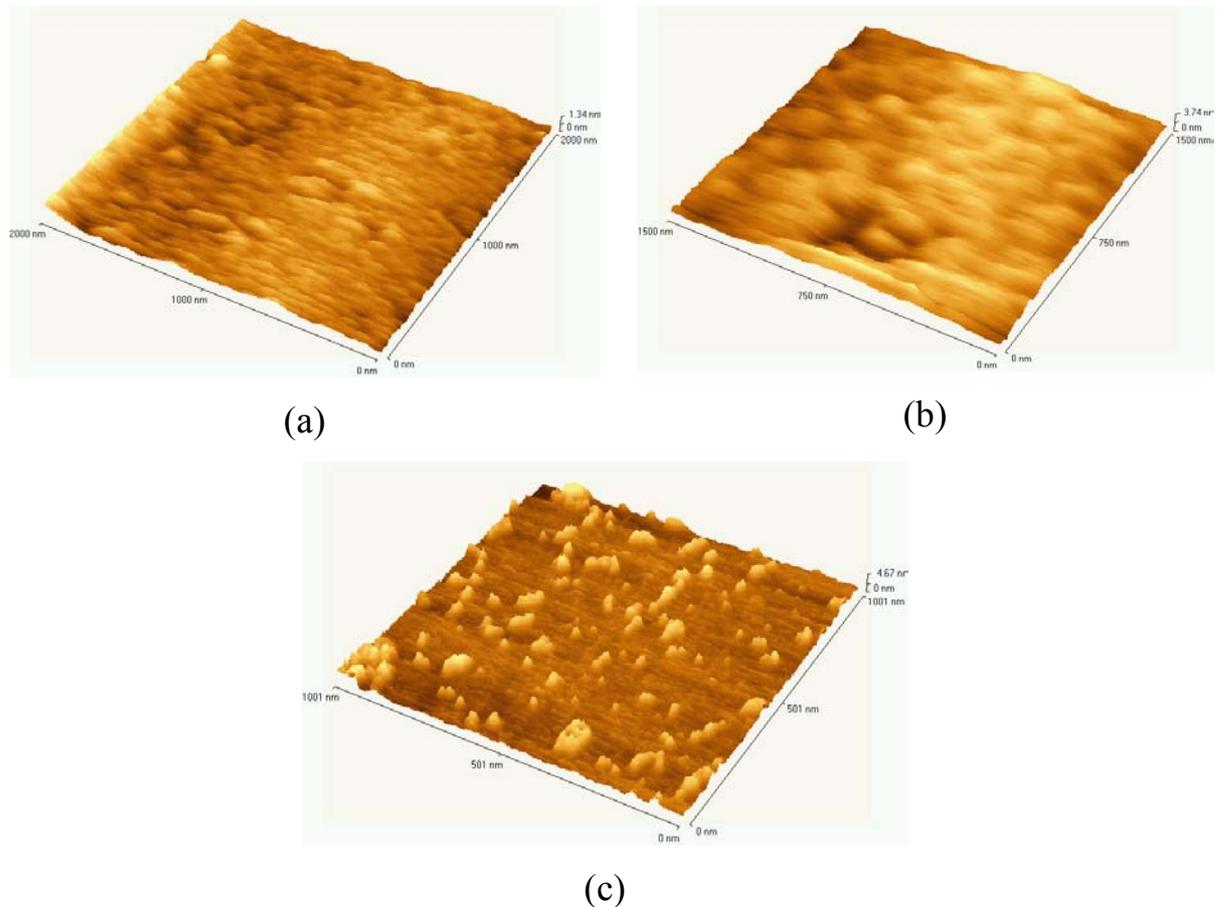


Figura 3.38 - Imagens de microscopia de força atômica de ácidos húmicos sintetizados a partir da hidroquinona com ácido 4-aminobenzóico (AHSIII) com metais complexados: (a) cobre (AHSIII-Cu), (b) ferro (AHSIII-Fe) e (c) manganês (AHSIII-Mn) sorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato.

As diferenças morfológicas indicam uma diferença nas funcionalidades químicas das espécies. Isto pode afetar o comportamento físico-químico de colóides húmicos, por exemplo, forças de ligação nas superfícies de minerais, complexação com íons metálicos ou o comportamento de agregação.

Um aspecto é a formação dos agregados adsorvidos no substrato na presença dos íons metálicos, sugerindo a influência dos mesmos no fenômeno de adsorção e agregação dos AH. Uma idéia geral para explicar a agregação dos AH está baseada na neutralização das cargas superficiais. Pela diminuição do pH, aumento da força iônica ou por adição de cátions polivalentes, a carga negativa superficial natural do AH, que é responsável pela repulsão entre as partículas, é neutralizada e conseqüentemente, as partículas se agregam. No caso

dos cátions polivalentes, a formação de pontes entre os cátions e os colóides AH carregados negativamente, podem ser sugeridas como um plausível mecanismo de agregação (AH.....Me⁺.....AH)¹⁰⁶.

Ressalta-se que as imagens obtidas e apresentadas neste trabalho, são provenientes de um estudo preliminar, sendo necessário o desenvolvimento de um estudo mais detalhado sobre a cinética de deposição das moléculas dos AH nos substratos (hidrofóbicos e/ou hidrofílicos) usando a microscopia.

A combinação de métodos espectroscópicos, (como Absorção e Fluorescência de Luz UV-Vísivel, Ressonância Magnética Nuclear, Infravermelho), Cromatografia por Exclusão de Tamanho e Microscopia de Força Atômica, considerando a complexidade do sistema analisado, controvérsias na literatura sobre a estrutura das substâncias húmicas, revelaram-se adequados e geraram resultados de interesse para a pesquisa sobre as substâncias húmicas, sendo possível dar contribuições originais no tema. Entre elas destacam-se:

- 1- Obteve-se um polímero com características análogas às dos ácidos húmicos através de reações de síntese, por meio de polimerização oxidativa em meio alcalino utilizando como precursores a hidroquinona, p-benzoquinona e o ácido 4-aminobenzóico, constituindo um precursor de interesse para o avanço nos estudos de substâncias húmicas;
- 2- Os resultados mostrados por FTIR e RMN mostraram a ocorrência da formação do ácido húmico sintético, sendo estes compatíveis com os encontrados na literatura;
- 3- A estrutura obtida para o ácido húmico sintético, através da reação de polimerização oxidativa apresentou grupos funcionais semelhantes aos encontrados nos ácidos húmicos naturais;
- 4- A complexação de íons metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+}) aos ácidos húmicos sintéticos influenciou na estrutura levando a um aumento no tamanho molecular, conforme sugere os dados obtidos por Cromatografia de Exclusão por Tamanho;
- 5- Os espectros de FTIR dos ácidos húmicos sintéticos após a complexação de íons metálicos mostraram alterações nas bandas que estão associadas a mudanças estruturais indicando a complexação dos íons metálicos principalmente com grupos fenólicos e carboxílicos presentes nos polímeros;

- 6- Os espectros de UV-Visível e Fluorescência dos ácidos húmicos sintéticos após a complexação de íons metálicos mostraram alterações nas bandas que estão associadas a mudanças estruturais;
- 7- Foram observadas mudanças nos espectros de Fluorescência com a adição dos íons metálicos Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , indicando que os grupos fluoróforos estão de algum modo envolvidos na complexação;
- 8- As titulações condutométricas dos ácidos húmicos sintéticos dão diagramas lineares com retas de diferentes inclinações mostrando pontos de equivalência;
- 9- As curvas potenciométricas derivativas são um meio bastante eficiente para identificar e estimar o pK de grupos ácidos nas SH e substâncias poliméricas similares;
- 10- Em geral, as imagens de AFM das moléculas do AH e ácido húmico sintético (AHS) sorvidos no substrato mica, apresentaram estruturas globulares. Foi observado também interação entre as partículas dos AHS após a complexação dos íons metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+}) que levaram a formação de estruturas do tipo agregados.

Os resultados obtidos neste trabalho, reforçam a importância de utilizarem-se diversas técnicas independentes para o estudo de materiais tão complexos e heterogêneos como as substâncias húmicas.

CAPITULO 5 PERPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

- Estudar as características estruturais do polímero sintetizado, análogo às substâncias húmicas, na presença e ausência de íons metálicos com diferentes características por técnicas eletroanalíticas envolvendo titulações potenciométricas e condutométricas com bases fortes para determinar as afinidades protônicas.

- Realizar estudos sistemáticos da complexação de íons metálicos com a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

- Os estudos mostraram que a lenta polimerização da hidroquinona em meio alcalino, em presença de ar, leva a mistura de polímeros que devidamente isolados e analisados pelas técnicas espectroscópicas mostraram algumas semelhanças com substâncias húmicas. É importante prosseguir neste estudo, procurando polimerizar a hidroquinona na presença de aminoácidos e outras substâncias contendo nitrogênio, e também carboidratos, já que os compostos naturais sempre contêm nitrogênio, e têm componentes hidroxílicos, alifáticos. Estes compostos poliméricos poderão ter considerável interesse em preparações farmacêuticas/cosméticas de proteção às radiações solares ultravioleta, causadoras de câncer de pele, conforme evidenciado recentemente no XII Encontro Internacional da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), realizado em julho/2004, no Brasil.

-
- ¹ CARVALHO, E.R.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; ROCHA, J.C. ROSA, A.H. “Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy”. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15(53): 421, 2004.
 - ² SOMBROEK, W.G.; NACHTERGAELE, F. O.; HEBEL, A. “Amounts, dynamics and sequestrations of carbon in tropical and subtropical soils”. *Ambio*, **22**: 417, 1993.
 - ³ BATJES, N.H. “Total carbon and nitrogen in the soils of the world”. *Eur. J. Soil Sci.*, **47**: 151, 1996.
 - ⁴ PICCOLO, A. “Atmospheric CO₂ and alteration of Global Climate”. *In: 3º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, Anais... Santa Maria, RS, 1999. p.145.*
 - ⁵ BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C.A. “Effect of non-till cropping systems on soil organic matter in a Sandy Clay Loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance”. *Soil & Tillage Research*, **53**: 95, 2000.
 - ⁶ BAYER, C.; MARTIN-NETO, L. “Plantio direto aumenta a matéria orgânica do solo e contribui para a remoção do CO₂ atmosférico na Região Tropical do Cerrado Brasileiro”. *In: 3º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, Anais... Santa Maria, RS, 1999. p.193-194.*
 - ⁷ PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; HABERHAUER, G.; GERZABEK, M.H. “Increased sequestration of organic carbon in soil by hydrophobic protection”. *Naturwissenschaften*, **86**: 496, 1999.
 - ⁸ PICCOLO, A. Humus and Soil Conservation. *In: PICCOLO, A. (ed) Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Amsterdam: Elsevier, 1996. p.225-264.*
 - ⁹ PICCOLO, A. and CONTE, P. “Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers”. *Advances in Environmental Research*, 3(4): 508, 2000.

- ¹⁰ SENESI, N.; RIZZI, F.R.; DELLINO, P. and ACQUAFREDDA, P. “Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH and time”. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 60(6): 1773, 1996.
- ¹¹ HANNINEN, K.I.; KLÖCKING, R.; HELBIG, B. “Synthesis and characterization of humic acid-like polymers”. *The Science of the Total Environment*, **62**: 201, 1987.
- ¹² WUNDERWALD, U.; KREISEL, G.; BRAUN, M.; SCHULZ, M. “Formation and degradation of a synthetic humic acid derived from 3-Fluorocatechol”. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**: 441, 2000.
- ¹³ HESS, A.N.; CHIN, Y-P. “Physical and chemical characteristics of Poly(Maleic Acid), a synthetic organic colloid analog”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **107**: 141, 1996.
- ¹⁴ RICCA, G. and SEVERINI, F. “Structural investigations of humic substances by IR-FT, ¹³C-NMR spectroscopy and comparison with a maleic oligomer of known structure”. *Geoderma*, **58**: 233, 1993.
- ¹⁵ SPITELLER, M.; SCHNITZER, M. A “Comparison of the structural characteristics of polymaleic acid and a soil fulvic acid”. *Journal of Soil Science*, **34**: 525, 1983.
- ¹⁶ SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. *Humic Substances in the Environment*. New York, Marcel Dekker. 1972. p.192-197.
- ¹⁷ KONONOVA, M.M. *Soil Organic Matter: Its Nature, Its Role in soil Formation and in Soil Fertility*. New York: Pergamon Press, 1961.
- ¹⁸ WERSHAW, R.L. “Molecular aggregation of humic substances”. *Soil Science*. 164(11): 803, 1999.
- ¹⁹ STEVENSON, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2. ed. New York: Wiley, 1994. 496p.
- ²⁰ WERSHAW, R.L. “Membrane-micelle model for humus in soils and sediments and its relation to humification”. U.S Geological Survey Water - Supply, 1994. paper 2410.

- ²¹ ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T.M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. "Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics". *Geoderma*, **79**: 117, 1997.
- ²² STEVENSON, F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York: Wiley, 1982. 443p.
- ²³ SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. "A state of the art structural concept for humic substances". *Naturwissenschaften*, New York, **80**: 29, 1993.
- ²⁴ SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. *Soil organic matter*. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1978. 319p
- ²⁵ SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. "Chemical model structures for soil organic matter and soils". *Soil Sci.*, **162**: 115, 1997.
- ²⁶ SEIN, L.T.; VARNUM, J.M.JR.; JANSEN, S.A. "Conformational modeling of a new building block of humic acid: approaches to the lowest energy conformer". *Environ. Sci. Technol.* **33**: 546, 1999.
- ²⁷ WERSHAW, R.L.J. "A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems". *Journal of Contaminant Hydrology*. Amsterdam, **1**: 29, 1986.
- ²⁸ WERSHAW, R.L. "Model for humus in soils and sediments". *Environ. Sci. Technol.* **27**: 814, 1993.
- ²⁹ TANFORD, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Krieger, Malabar, 1991.
- ³⁰ PUCHALSKI, M.M.; MORRA, J.M. and von WANDRUSZKA, R. "Fluorescence quenching of synthetic organic compounds by humic materials". *Environ. Sci. Technol.* **26**: 1767, 1992.
- ³¹ MORRA, M. J.; CORAPCIOGLU, M.O.; von WANDRUSZKA, R.; MARSHALL, F. B. and TOPPER, K. "Fluorescence quenching and polarization studies of Naphthalene and 1-naphthol interaction with humic acid". *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **54**: 1283, 1990.
- ³² ENGBRETSON, R. and von WANDRUSZKA, R. "The effect of molecular size on humic acid associations". *Org. Geochem.*, **26**: 759, 1997.

- ³³ PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. “Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography”. *Chemosphere*, **33**: 595, 1996.
- ³⁴ PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. “Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids”. *European Journal of Soil Science*, **47**: 319, 1996.
- ³⁵ KENWORTHY, I.P.; HAYES, M.H.B. Investigations of Some Structural Properties of Humic Substances by Fluorescence Quenching. *In*: HAYES, M.H.B.; WILSON, W.S., eds. *Humic Substances, Peats and Sludges. Health and Environmental Aspects*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. p. 39.
- ³⁶ SPARKS, D. L. *Environmental Soil Chemistry*, Academic Press, United States of America, 1999. 267 p.
- ³⁷ KOVALENKO, A. YUODOV, M. PERMINOVA, I. PETROSYAN, V. “Synthesis and characterization of humic derivatives enriched with hydroquinonic and catecholic moieties”. *In*: 12th INTERNATIONAL MEETING OF IHSS, Livro de Resumos, São Pedro, SP, 2004. p.472-473.
- ³⁸ STOTT, D.E. and MARTIN, J.P. Synthesis and Degradation of Natural and Synthetic Humic Material in Soils. *In*: *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*. Madison: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, 1990.
- ³⁹ MARTIN, J.P.; HAIDER, K.; LINHARES, L. “Decomposition and stabilization of ring ¹⁴C-labeled Catechol in soil”. *Soil. Soil Sci. Am. J.*, **43**: 100, 1979.
- ⁴⁰ MARTIN, J.P.; HAIDER, K. "Decomposition of specifically carbon-14-labeled Ferulic Acid: free and linked into model humic acid-type polymers". *Soil Sci. Soc. Am. J.* **40**: 377, 1976.
- ⁴¹ MARTIN, J.P.; HAIDER, K. “A comparison of the use of phenolase and peroxidase for the synthesis of model humic acid-type polymers”. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, **44**: 983, 1980.

- ⁴² BRANNON, C.A.; and SOMMERS, L.E. Preparation and Characterization of Model Humic Polymers Containing Organic Phosphorus. *In: Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Redings*. Madison: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, 1990.
- ⁴³ ZUNINO, H.; AGUILERA, M.; CAIOZZI, M.; PEIRANO, P.; BORIE, F.; MARTIN, J.P. “Metal-binding organic macromolecules in Soil: 3. competition of Mg(II) and Zn(II) for binding sites in humic acid and fulvic-type model polymers”. *Soil Science*, 128(5): 256, 1979.
- ⁴⁴ SENESI, N.; SPOSITO, G.; MARTIN, J.P. “Copper(II) and Iron(III) complexation by soil humic acids: an IR and ESR study”. *The Sci Total Environ*, **55**: 351, 1986.
- ⁴⁵ KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace Elements in Soils and Plants. 3th ed. Boca Raton, CRC, 1985. 315 p.
- ⁴⁶ MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O.R; TALAMONI, J.; POPPI, N.R. “EPR of Micronutrients – Humic Substances Complexes Extracted from Brazilian Soil”. *Soil Science*, 151(5): 369, 1991.
- ⁴⁷ NOVOTNY, E.H. Estudos Espectroscópicos e Cromatográficos de Substâncias Húmicas de Solos sob Diferentes Sistemas de Preparo. São Carlos – SP, Instituto de Química de São Carlos, USP, 2002. Tese de Doutorado, 231 p.
- ⁴⁸ WERSHAW, R.L. “Molecular aggregation of humic substances”. *Soil Science*, 164(11): 803, 1999.
- ⁴⁹ RYAN, D.K. and WEBER, J.H. “Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid”. *Anal. Chem.*, **54**: 986, 1982.
- ⁵⁰ SPOSITO, G. *The Chemistry of Soils*. New York: Oxford University, 1989. 277p.
- ⁵¹ SHIN, H.S.; MONSALLIER, J.M.; CHOPPIN, G.R. “Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid”. *Talanta*, **50**: 641, 1999.

- ⁵² CLAPP, C.E.; HAYES M.H. “Sizes and shapes of humic substances”. *Soil Science*, 164(11): 777, 1999.
- ⁵³ PICCOLO, A.; CONTE, P. “Molecular size of humic substances. supramolecular associations versus macromolecular polymers”. *Advances in Environmental Research*, 3(4): 508, 2000.
- ⁵⁴ ZSOLNAY, A.; HAIGAR, F.; JIMENEZ, M.; STEINWEG, B.; and SACCOMANDI, F. “Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying”. *Chemosphere*, **38**: 45, 1999.
- ⁵⁵ KALBITZ, K.; GEYER, W.; GEYER, S. “Spectroscopic properties of dissolved humic substances – a reflection of land use history in a fen area”. *Biogeochemistry*, **47**: 219, 1999.
- ⁵⁶ SENESI, N.; MIANO, T. M.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. “Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy”. *Soil Sci.* **152**: 259, 1991.
- ⁵⁷ MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; and BAGNATO, V. S. “Humification degree of soil humic acid determined by fluorescence spectroscopy”. *Soil Sci.*, 167(11): 739, 2002.
- ⁵⁸ WILSON, M.A. Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Organic Matter in Whole Soils. *In: Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*. Madison: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, 1990.
- ⁵⁹ PRESTON, C.M. “Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects”. *Soil Science*, 161(3): 145, 1996.
- ⁶⁰ PICCOLO, A.; STEVENSON, F.J. “Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Ca^{2+} complexes of soil humic substances”. *Geoderma*, **27**: 195, 1982.
- ⁶¹ CAMPPELL, I.D.; DWEK, R.A. *Biological Spectroscopy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, 1984. 403p. *In: SAAB, S.C. Caracterização da Matéria Orgânica em Gleissolos por Espectroscopias de EPR, RMN, IV e UV-Visível*, São Carlos - SP, Instituto de Química de São Carlos, USP, 1999. Tese de Doutorado, 111p.

- ⁶² SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Análise Instrumental*. 5 ed. Porto Alegre, Bookman, 2002. 836p.
- ⁶³ STUART, B. *Modern Infrared Spectroscopy*. Analytical Chemistry by Open Learning. John Willey & Sons LTD, 1996. 179p.
- ⁶⁴ MARLEY, N.A.; GAFFINEY, J.S.; ORLANDINI, K.A. and CUNNINGHAM, M.M. "Evidence for radionuclide transport and mobilization in a Shallow, Sandy Aquifer". *Environ. Sci. Technol.*, **27**: 2456, 1993.
- ⁶⁵ MIIKKI, V.; SENESI, N. and HANNINEN, K. "Characterization of humic materials formed by composting of domestic and industrial biowastes". *Chemosphere*, **34**: 1639, 1997.
- ⁶⁶ DAVIS, W.M.; ERICKSON, C.L.; JOHNSTON, C.T.; DELFINO, J.J. and PORTER, J.E. "Quantitative Fourier Transform Infrared Spectroscopic investigation of humic substance functional group composition". *Chemosphere*, **38**(12): 2913, 1999.
- ⁶⁷ SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5. ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1994. 387p.
- ⁶⁸ PARISH, R.V. *NMR, NQR, EPR, and Mössbauer Spectroscopy in Inorganic Chemistry*. London, Ellis Horwood, 1990. p. 26.
- ⁶⁹ MARTIN, D.; SRIVSTAVA, P.C.; GHOSH, D.; ZECH, W. "Characteristics of humic substances in cultivated and natural forest soils and Sikkim". *Geoderma*, **84**: 345, 1998.
- ⁷⁰ COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C.I.; NASCIMENTO, O.R.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H.; VIEIRA, E.M.; SEIDEL, P.R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S.J. *Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Ressonância Paramagnética Eletônica (EPR)*. In: CRESTANA, S. et al. (Eds.) *Instrumentação Agropecuária: Contribuição no Limiar do Novo Século*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. p.15-50.
- ⁷¹ CONTE, P.; PICCOLO, A.; VAN LAGEN, B.; BUURMAN, P.; DE JAGER, P. A. "Quantitative differences in evaluating soil humic substances by liquid and Solid-State ¹³C-NMR Spectroscopy". *Geoderma*, **80**: 339, 1997.

- ⁷² NOVOTNY, E. H.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A.; MARIA, I.C.; VIEIRA, S.R.; DECHEN, S.C.F. “Espectroscopias de RPE e RMN em ácidos húmicos extraídos de solos submetidos a diferentes sistemas de manejo. *In*: 3º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, Anais... Santa Maria, RS, 1999. p.226-228.
- ⁷³ GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C. Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. 1012p.
- ⁷⁴ JELINSKI, L.W.; MELCHIOR, M.T. “High-Resolution NMR of solids”. *Applied Spectroscopy Reviews*, 35(1 & 2): 25, 2000.
- ⁷⁵ SACHS, S.; BUBNER, M.; SCHMEIDE, K.; CHOPPIN, G.R.; HEISE, K.H.; BERNHARD, G. “Carbon-13 NMR Spectroscopic studies on chemically modified and unmodified synthetic and natural humic acids”. *Talanta*, **57**: 999, 2002.
- ⁷⁶ SKJEMSTAD, J.O.; JANIK, L.J.; TAYLOR, J.A. “Non-Living soil organic matter: what do we know about it?”. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **38**: 667, 1998.
- ⁷⁷ SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7. ed., Philadelphia: Sanders College Publishing, 1996. 870 p.
- ⁷⁸ SENESI, N. Application of Electron Spin Resonance and Fluorescence Spectroscopies to the Study of Humic Substances *In*: KUBAT, J. (Ed.) *Humus, its Structure and Role in Agriculture and Environment*. Elsevier Science Publishers B.V., 1992. p.11-26.
- ⁷⁹ SPARK, K.M. and SWIFT, R.S. Investigation of Some of the Parameters Affecting the Fluorescence Spectra of Humic Substances. *In*: SENESI, N. and MIANO, T.M. (Ed) *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Elsevier Science B.V., 1994. p. 153-160.
- ⁸⁰ BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; SAAB, S. da C.; MILORI, D.M.P.; BAGNATO, V.S. “Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies”. *Geoderma*, **105**: 81, 2002.

- ⁸¹ BARRIQUELLO, M.F.; MILORI, D.M.B.P.; NEVES, E.A.; MARTINETO, L. “Estudo da estrutura de polímeros fenólicos análogos a substâncias húmicas através de fluorescência”. *In: XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Ribeirão Preto, SP, 2003.*
- ⁸² BARRIQUELLO, M.F.; MILORI, D.M.B.P.; NEVES, E.A.; MARTINETO, L. “Fluorescence spectroscopy comparison of soil humic acids and model humic acid-type polymers”. *In: 12th INTERNATIONAL MEETING OF IHSS, Livro de Resumos, São Pedro, SP, 2004. p.358-360.*
- ⁸³ MIANO, T.; SPOSITO, G.; MARTIN, J.P. “Fluorescence Spectroscopy of model acid-type polymers”. *Geoderma*, **47**: 349, 1990.
- ⁸⁴ ASTER, B.; BERGH, J.V.; BURBA, P. “Characterization of aquatic humic substances and their metal species by using ligand exchange (EDTA) and multistage-ultrafiltration”. *In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS. 2., 1997. São Carlos. Anais... São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA, 1997. p.131-132.*
- ⁸⁵ NOVOTNY, E.H., TRAGHETTA, D.G. e MANGRICH, A.S. “Extração, fracionamento e caracterização espectroscópica da matéria orgânica do solo”. *In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2º. São Carlos, SP, 1997. Anais... São Carlos-SP, novembro. São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA. p.177.*
- ⁸⁶ SPOSITO, G.; REGINATO, R.J. *Opportunities in Basic Soil Science Research. Soil Science Society of America, Inc. Madison, 1992.*
- ⁸⁷ BAILEY, G.W.; YU, S.Y. 1993. *In: Agronomy Abstracts, Annual Meeting, Cincinnati, Ohio, 1993. p.221.*
- ⁸⁸ VEMPATI, R. K.; COCKE, D. L.; HESS, T.R. 1993. *In: Agronomy Abstracts, Annual Meeting, Cincinnati, Ohio, 1993. p.237.*
- ⁸⁹ BAILEY, G.W.; SHEVCHENKO, S.M.; YU, S.Y.; KAMERMANS, H. “Combining scanning tunneling microscopy and computer simulation of humic substances: Citric Acid, a model”. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **61**: 92, 1997.
- ⁹⁰ NAMJESNIK-DEJANOVIC, K.; MAURICE, A.P. “Atomic force microscopy of soil and stream fulvic acids”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects*, **120**: 77, 1997.

- ⁹¹ SETTLE, F. A. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey, 1997. p. 485.
- ⁹² FLAIG, W.; BEUTELSPACHER, H.; RIETZ, E. Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances. *In*: STEVENSON, F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. 2. ed. New York: Wiley, 1994. 496p.
- ⁹³ SCHNITZER, M.; SKINNER, S.I.M. Soil. Sci. v. 96, 1963. p.86. *In*: STEVENSON, F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. 2. ed. New York: Wiley, 1994. 496p.
- ⁹⁴ ABATE, G. & MASINI, J.C. “Acid-basic and complexation properties of a sedimentary humic acid. A study on the Barra Bonita Reservoir of Tietê River, São Paulo State, Brazil”. J. Braz. Chem. Soc. 12(1): 109, 2001.
- ⁹⁵ SOUZA, D.R.C. Balanços de Massa Protônicos em Estudos Sistemáticos de Substâncias Húmicas. São Carlos-SP, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 130 p.
- ⁹⁶ POSNER, A.M. Intern. Congr. Soil Sci. 8 th, Bucharest, v.2, 1964. p.161-174 *In*: SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. Soil organic matter. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1978. 319p
- ⁹⁷ MC PHIE, P. Enzyme Purification and Related Techniques: dialysis. *In*: JACOBY, W.B., ed. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1971. v. 22, cap.14
- ⁹⁸ CATALDO, F. “On the structure of macromolecules by oxidative polymerization of polyhydroxyphenols and quinones”. Polymer International, 46(4): 263, 1998.
- ⁹⁹ BAES, C. F.; MESMER, R. E. The Hydrolysis of Cations. New York, John Wiley & Sons, 1976. p.85.
- ¹⁰⁰ CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. “Information provide on humic substances by E₄/E₆ ratios”. Soil Sci. Soc. Am. J., **41**: 352, 1977.
- ¹⁰¹ SENESI, N. “Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals”. Anal. Chim. Acta, **232**: 77, 1990.

- ¹⁰² ALBERTS, J.J.; TAKÁCS, M. “Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter”. *Organic Geochemistry*, **35**: 1141, 2004.
- ¹⁰³ ALBERTS, J.J.; TAKÁCS, M. “Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms”. *Organic Geochemistry*, **35**: 243, 2004.
- ¹⁰⁴ BALNOIS, E.; WILKINSON, K.J.; LEAD, J.R.; BUFFLE, J. “Atomic Force Microscopy of humic substances: effects on pH and ionic strength”. *Environ. Sci. Technol.*, **33**: 3911, 1999.
- ¹⁰⁵ PLASCHKE, M.; RÖMER, J.; KLENZE, R.; KIM, J.I. “In situ AFM study of sorbed humic acid colloids at different pH”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **160**: 269, 1999.
- ¹⁰⁶ PLASCHKE, M.; RÖMER, J.; KLENZE, R.; KIM, J.I. “Influence of Europium (III) on the adsorption of humic acid onto mica studied by AFM”. *Surf. Interface Anal.*, 30(1): 297, 2000.