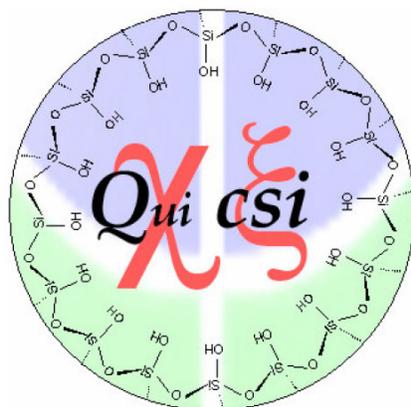


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Pós-Graduação em Química

*Aspectos físico-químicos da protonação e
desprotonação da superfície do ácido húmico.*



Dissertação de Mestrado

Autor: Jonas Pertusatti

Orientador: Alexandre Gustavo Soares do Prado

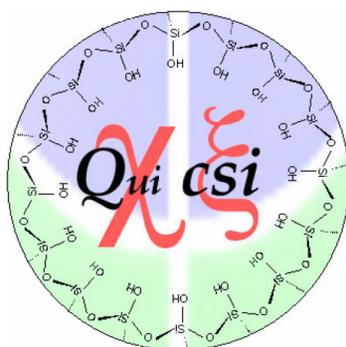
Brasília – DF / 2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Pós-Graduação em Química

*Aspectos físico-químicos da protonação e
desprotonação da superfície do ácido húmico.*



Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de Brasília
como exigência parcial para obtenção
do título de Mestre em Química.

Autor: Jonas Pertusatti

Orientador: Alexandre Gustavo Soares do Prado

Brasília – DF / 2007

A meus pais, Vanildo e Zelmira.

A meus irmãos, Raquel e Jackson.

A avó Zoltina

(in memoriam).

*Ante esse escuro problema
Há muito irônico rir.
Pra nós o vento da esp'rança
Traz o pólen do porvir.
E enquanto o cepticismo
Mergulha os olhos no abismo,
Que a seus pés raivando tem,
Rasga o moço os nevoeiros,
Pra dos morros altaneiros
Ver o sol que irrompe além.*

*Toda noite — tem auroras,
Raios — toda a escuridão.
Moços, creiamos, não tarda
A aurora da redenção.
Gemer — é esperar um canto...
Chorar — a guardar que o pranto
Faça-se estrela nos céus.
O mundo é o nauta nas vagas...
Terá do oceano as plagas
Se existem justiça e Deus.*

[...]

*Basta!... Eu sei que a mocidade
É o Moisés no Sinai;
Das mãos do Eterno recebe
As tábuas da lei! — Marchai!
Quem cai na luta com glória,
Tomba nos braços da História,
No coração do Brasil!
Moços, do topo dos Andes,
Pirâmides vastas, grandes,
Vos contemplam séc'los mil!*

Castro Alves

Agradecimentos

A Deus pela vida, saúde e força em meu caminho.

*À minha família, agradeço todo o amor, carinho, compreensão. Obrigado **Pai** e **Mãe** pelo apoio incondicional que sempre me proporcionaram para prosseguir na minha formação.*

Ao orientador e amigo professor Alexandre G. S. Prado pela amizade e preocupação com meu crescimento, pelo incentivo constante, confiança na minha capacidade e pelas taças de hidromel quente de conhecimento químico.

À Universidade de Brasília, ao Instituto de Química e ao DDP-UnB.

Aos amigos do Grupo QuiCSI, Elaine, Tuiuiu, Lucas, Aline, Carol, Jô, Priscila, Leonardo, Honorato, Jéssica, Sheila, Valéria, Paola, Núbia, Wanderson, Samira, Augusto, Willian, Rômulo.

Aos amigos do laboratório, Adolfo, companheiro de fins de semana no icc-sul, e também aos que já seguiram outros rumos, Afrânio e Carlos César.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Antonio Serra, USP – Ribeirão Preto, pelas imagens de MEV.

Ao Prof. Jurandir e aos colegas Jonatas e Eduardo pelo auxílio prestado no decorrer do trabalho.

Aos colegas do curso de pós-graduação Ricardinho, Lígia, Joyce, Flávia, Luciana, Paulo, Chico, Wender, Rafael, Dino, Ingrid e todos os demais.

Aos funcionários do Instituto de Química Júnior, Inocência, Teles, D. Chiquinha, Cleta e a todos os outros que são fundamentais para o bom andamento do dia-dia da universidade.

A galera do AP, Vanessa, João Paulo, Guilherme, Simone, Fernanda.

E a todas aquelas pessoas com quem convivi que contribuíram direta ou indiretamente para este momento se realizar e, por falta de efeito do ginko biloba, esqueci de agradecer.

MUITO OBRIGADO!!!

Resumo

O ácido húmico comercial foi dializado e caracterizado por análise elementar, acidez total, espectroscopia no infravermelho e de UV/Vis, por espectrometria ^{13}C -NMR no estado sólido, por termogravimetria, microscopia eletrônica de varredura e por isoterma de adsorção de N_2 . O ácido húmico acidificado foi titulado potenciométrica e condutimetricamente a fim obter a densidade de carga superficial, bem como o ponto de carga nula do material. O ácido húmico foi também titulado com HNO_3 e NaOH para obter o valor da sua capacidade tampão (β). O ácido húmico apresentou a região de carga aproximadamente nula no intervalo de pH 3,5 a 6, também apresentou comportamento de tampão tanto para adição de ácido como de base, além disso, apresentou uma excelente capacidade tampão para adição de NaOH . Mostrou uma ação tamponante entre os valores de pH 5.5 a 8.0, e uma capacidade de tamponamento máxima em pH = 6.0. O mesmo estudo foi acompanhado calorimetricamente a fim de determinar a entalpia da interação entre H^+/OH^- e o tampão, de que resultou em uma entalpia máxima de $-38.49 \text{ kJ mol}^{-1}$ em pH = 6,0. Este valor sugere que a atividade do tampão está baseada na quimiossorção da hidroxila.

Abstract

Commercial humic acid was dialyzed and characterized by elemental analysis, total acidity, infrared and UV/Vis spectroscopy, solid state ^{13}C -NMR spectrometry, thermogravimetry, scanning electron microscopy, N_2 adsorption isotherms. Titration of acidified humic acid with NaOH was followed by potentiometry and conductometry in order to determine the surface charge density and the point zero of charge. Humic acid was also titrated with HNO_3 and NaOH to obtain buffer capacity value (β). Humic acid presented surface charge density approximately zero in the pH range 3.5 to 6, and also presented buffer behavior by base and acid addition, moreover, an excellent buffer capacity was observed in addition of NaOH. Humic acid showed buffer action between 5.5 and 8.0 of pH range, and a maximum buffer capacity was observed at pH = 6.0. The same study was followed calorimetrically in order to determinate the enthalpy of interaction between H^+/OH^- and buffer, which resulted in a maximum enthalpy of $-38.49 \text{ kJ mol}^{-1}$ at pH = 6.0. This value suggests that the buffer activity is based on chemisorption of hydroxyl.

Sumário

Resumo	V
Abstract	VI
Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	X
1 Introdução	1
1.1 Ácidos Húmicos	1
1.2 Substâncias Húmicas	1
1.2.1 Substâncias húmicas de solo (SHS)	2
1.2.2 Substâncias húmicas aquáticas (SHA)	3
1.2.3 Mecanismos propostos para a formação das SH	3
1.2.4 Importância dos AH no meio ambiente	7
1.2.5 Interação dos ácidos húmicos com metais	8
1.2.6 Protonação e desprotonação dos AH	11
1.3 Tampões	13
1.3.1 Capacidade tampão	14
2 Objetivos	15
3 Procedimento Experimental	16
3.1 Reagentes e soluções	16
3.1.1 Diálise do ácido húmico	16
3.2 Caracterização	16
3.2.1 Análise elementar e residual	16
3.2.2 Acidez total	16
3.2.2.1 Acidez carboxílica	17
3.2.2.2 Acidez total e fenólica	17
3.2.3 Análise térmica	17
3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	17
3.2.5 Área superficial	18
3.2.6 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)	18
3.2.7 Espectroscopia ultravioleta/visível (UV/Vis)	18
3.2.8 Espectrometria de Ressonância magnética nuclear de ¹³ C no estado sólido	19
3.3 Estudo da densidade superficial de carga	19
3.4 Determinação da capacidade tampão	19

3.5	Estudo calorimétrico da capacidade tampão	20
4	Resultados e discussão	22
4.1	Caracterização	22
4.1.1	Análise elementar	22
4.1.2	Acidez total, carboxílica e fenólica	23
4.1.3	Análise térmica	23
4.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura	24
4.1.5	Área superficial	26
4.1.6	Espectroscopia no Infravermelho	27
4.1.7	Espectroscopia UV/Vis	30
4.1.8	Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹³ C no estado sólido	33
4.2	Estudo da densidade de carga superficial	34
4.3	Determinação da capacidade tampão	37
4.4	Estudo calorimétrico da capacidade tampão	39
5	Considerações Finais	43
6	Referências	44
Anexos		48
I	J. Pertusatti, A.G.S. Prado, Buffer capacity of humic acid: Thermodynamic approach, J. Colloid Interface Sci. 2007, in press.	48
II	A.G.S. Prado, J.D. Torres, P.C. Martins, J. Pertusatti, L.B. Bolzon, E.A. Faria, Studies on copper(II)- and zinc(II)-mixed ligand complexes of humic acid, J. Hazard. Mat. 2006, 136, 585.	48

Lista de figuras

- Figura 1.** Principais vias propostas para a formação das substâncias húmicas pela decomposição de resíduos animais/vegetais no solo.
- Figura 2.** Estruturas propostas para ácidos húmicos por Schulten e Schnitzer.
- Figura 3.** Arranjos estruturais em complexos de superfície. Possíveis complexos de adsorção na interface água/sólido (representada pela linha horizontal). O substrato sólido está abaixo da linha horizontal, já a solução está acima. O símbolo $\textcircled{\text{M}}$ representa um átomo metálico adsorvido em vários tipos de complexos de adsorção. Os símbolos \bullet e $\textcircled{\text{H}}$ representam átomos de oxigênio e hidrogênio, respectivamente.
- Figura 4.** Representação do calorímetro (a), e detalhes do dewar (b).
- Figura 5.** Curva termogravimétrica do ácido húmico.
- Figura 6.** Imagem de MEV do ácido húmico neutro (a) e acidificado (b).
- Figura 7.** Isoterma de adsorção/dessorção de N_2 .
- Figura 8.** Espectro de infravermelho do ácido húmico.
- Figura 9.** Influência do pH sobre o parâmetro β na solução do ácido húmico ($0,5\text{mg L}^{-1}$) e NaHCO_3 ($0,01\text{ mol L}^{-1}$).
- Figura 10.** Espectro de ^{13}C -RMN do ácido húmico.
- Figura 11.** Titulação potenciométrica (\blacktriangle) e condutimétrica (\square) do ácido húmico.
- Figura 12.** Variação da densidade de carga superficial (\blacksquare) em função do pH.
- Figura 13.** Curva de titulação para adição de ácido na presença (\blacksquare) e na ausência (\circ) de ácido húmico.
- Figura 14.** Curva de titulação para adição de base na presença (\blacksquare) e na ausência (\circ) de ácido húmico.
- Figura 15.** Capacidade tampão β \square do ácido húmico em função do pH.
- Figura 16.** Entalpia para a reação de tamponamento do ácido húmico em função do pH.
- Figura 17.** Capacidade tampão (\circ) e fluxo de calor (\blacksquare) em função do pH.
- Figura 18.** Variação da densidade superficial de carga (\circ) e do fluxo de calor (\blacksquare) em função do pH.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Análise elementar (percentual em massa) de diferentes ácidos húmicos.

Tabela 2 – Efeito do pH e da força iônica na conformação da molécula do ácido húmico. R_h denota o raio hidrodinâmico da molécula em solução.

Tabela 3 – Análise elementar e residual do ácido húmico.

Tabela 4 – Principais bandas presentes no espectro de FTIR do ácido húmico.

Tabela 5 – Valores da razão E_4/E_6 em diferentes valores de pH.

1 Introdução

1.1 Ácidos Húmicos

A transformação de substâncias de origem biológica nos solos, águas e sedimentos leva a formação das substâncias húmicas (SH). Um dos seus principais constituintes é o ácido húmico (AH).^{1,2}

Ácidos húmicos são macromoléculas amorfas, polidispersas, de caráter predominantemente ácido, de natureza polieletrólítica, tridimensionais com alto peso molecular. Muitas estruturas foram propostas para estes compostos, entretanto destacam-se as citadas por Stevenson (1982), Kononova (1966), os quais sugerem uma estrutura composta por OH fenólicos livres e ligados, quinonas, nitrogênio ligando unidades, estruturas aromáticas e grupos carboxílicos distribuídos ao longo da cadeia aromática e, por Schnitzer e Khan (1972) que apresentam uma estrutura fenólica com ácidos carboxílicos aromáticos unidos por ligações de hidrogênio formando uma estrutura polimérica de considerável estabilidade química.^{1,3-5}

Atualmente, apesar do grande número de pesquisas desenvolvidas sobre a estrutura do AH, considera-se uma definição menos pragmática e mais abrangente. Os ácidos húmicos são considerados biopolímeros altamente funcionalizados, ricos em carbono, que são “ancorados” na matéria orgânica dos solos e fixados às argilas e minerais funcionam como tampão e armazéns térmicos. São substâncias retentoras de água, ligam-se a metais e atuam como sorventes, por isso são considerados reguladores de solos e sedimentos. Estes compostos amorfos são materiais fractais, cujas estruturas tem sido modeladas a fim de se determinar sua provável estrutura.¹

1.2 Substâncias Húmicas

O termo substâncias húmicas refere-se a uma categoria de materiais de ocorrência natural com coloração escura e massa molecular relativamente alta, encontrados ou extraídos de solos sedimentos e águas naturais. Constituem uma das formas mais abundantes de matéria orgânica da superfície da Terra. As SH são,

genericamente, divididas em dois grupos: substâncias húmicas do solo e substâncias húmicas aquáticas.¹

1.2.1 Substâncias húmicas de solo (SHS)

O solo é considerado um sistema aberto natural e heterogêneo que troca energia e matéria com as vizinhanças da atmosfera, hidrosfera e biosfera. Suas características variam com o tempo e o espaço devido às incessantes transformações químicas, físicas e biológicas que, também, determinam sua fertilidade.^{1,6} Os solos são constituídos por uma porção inorgânica e outra orgânica. A porção orgânica, por sua vez, é formada por uma mistura de produtos, em vários estágios de decomposição, resultantes da degradação química e biológica de resíduos vegetais e animais e da atividade metabólica de microrganismos. Essa matéria é chamada de húmus e pode ser dividida em substâncias húmicas e substâncias não húmicas. Substâncias quimicamente bem definidas, tais como polissacarídeos, proteínas, ligninas, açúcares, ácidos nucleicos, entre outros, compõem o grupo das substâncias não húmicas que representam cerca de 20% do húmus. Enquanto substâncias cuja estrutura química não é bem definida, compondo um grupo de compostos heterogêneos, correspondem a 80% em média do húmus, formam as chamadas substâncias húmicas.^{7,8}

O termo *húmus* (do latim equivalente ao solo) foi introduzido em 1804 por Saussure para descrever o material orgânico de coloração escura originado do solo. Percebeu que húmus era derivado de resíduos de vegetais, sendo rico em carbono, mas pobre em hidrogênio e oxigênio.⁹ Anteriormente, em 1786, Achard realizou a primeira tentativa de isolar substâncias húmicas de solo submetendo turfas a solventes alcalinos e obteve uma solução escura que precipitava por acidificação. Esse material, solúvel em álcali e insolúvel em ácido, foi denominado ácido húmico, cuja definição operacional se mantém até hoje.⁹

As substâncias húmicas dividem-se, operacionalmente, em três principais frações de acordo com a solubilidade em meio aquoso em função do pH: ácidos húmicos são definidos como a fração das SH solúvel em meio alcalino diluído e que precipita por acidificação; ácidos fúlvicos (AF) que permanecem em solução quando

o extrato alcalino é acidificado e a humina, fração insolúvel em qualquer faixa de pH.^{1,9}

1.2.2 Substâncias húmicas aquáticas (SHA)

Em sistemas aquáticos, a matéria orgânica pode ser dividida em particulada e dissolvida. A diferenciação é puramente operacional, baseada em métodos cromatográficos de extração. Thurman & Malcolm definiram substâncias húmicas aquáticas (SHA) como a porção não específica, amorfa, constituída de carbono orgânico dissolvido (COD) em pH 2 e adsorvente em coluna de resina XAD 8 (poly-Metilmacrilato),⁷⁻⁹ não iônica e com altos valores de coeficiente de distribuição. A fração extraída de COD em uma amostra depende do tipo de resina utilizada, da quantidade de amostra e do eluente utilizado. Conseqüentemente, amostras extraídas por métodos diferentes geralmente não são comparáveis.¹⁰ SHA compreendem cerca de um terço até a metade do COD na água e são constituídas em sua maior parte por ácidos hidrofóbicos. Estes podem apresentar concentração de 20 mg L⁻¹ em águas de subsolo, chegando a 30 mg L⁻¹ em águas de superfície e 0,0029 mg L⁻¹ em águas marinhas. Grande parte do COD em sistemas aquáticos tropicais com coloração escura como, por exemplo, o Rio Negro, AM, Brasil, apresentam grandes quantidades de substâncias húmicas aquáticas, as quais são também responsáveis pelo baixo pH desses mananciais, entre 3,5 - 3,9.⁸⁻¹²

1.2.3 Mecanismos propostos para a formação das SH

Devido à natureza heterogênea e complexa das substâncias húmicas, pouco se sabe sobre sua origem, síntese, estrutura química e funções no solo e nas águas, apesar dos vários estudos que envolvem a tentativa de elucidação de suas estruturas. A humificação na natureza é um processo gradativo que leva milhares de anos, dando origem às substâncias húmicas com diferentes características estruturais.^{1,9,13}

A Figura 1 esquematiza as principais vias propostas para a formação das SH. O principal processo é a oxidação de substratos hidrolisados monoméricos, para formar polímeros macromoleculares de cor mais ou menos escura e peso molecular elevado. As vias podem ocorrer simultaneamente no solo, porém, não com a mesma

extensão e importância. A via da lignina pode se processar predominantemente em solos mal drenados e em áreas hidromórficas, enquanto que a síntese a partir de polifenóis pode ser de considerável importância para certos solos de florestas. Devido à rápida assimilação biológica dos açúcares, a teoria de condensação de aminoaçúcares, é válida principalmente para meios de baixa atividade biológica.⁹

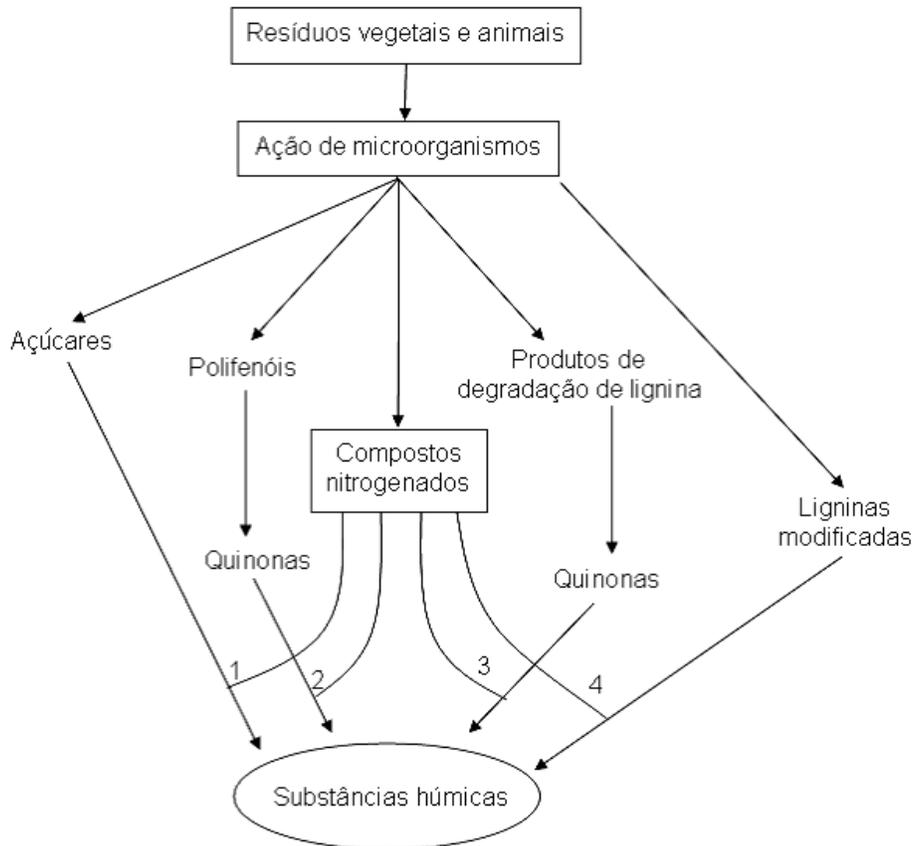


Figura 1. Principais vias proposta para a formação das substâncias húmicas pela decomposição de resíduos animais/vegetais no solo.⁹

A complexidade e a heterogeneidade estrutural, bem como a ausência de uma identidade estrutural genérica, influenciadas pelo grau e pelo mecanismo de decomposição da matéria orgânica original proporcionaram o aparecimento de varias propostas de estruturas para AH. Schulten et al., em 1991, a partir de estudos espectroscópicos, pirólise, degradação oxidativa e microscopia eletrônica, propôs as estruturas esquematizadas na Figura 2.a¹⁴ e 2.b.¹⁵

Já Piccolo em 2001, baseado em cromatografia e eletroforese capilar, propõe um novo conceito estrutural para o AH, a qual não seria extremamente complexa,

mas formada pela agregação complexa de pequenas moléculas húmicas, isto é, uma estrutura supramolecular.^{9,13}

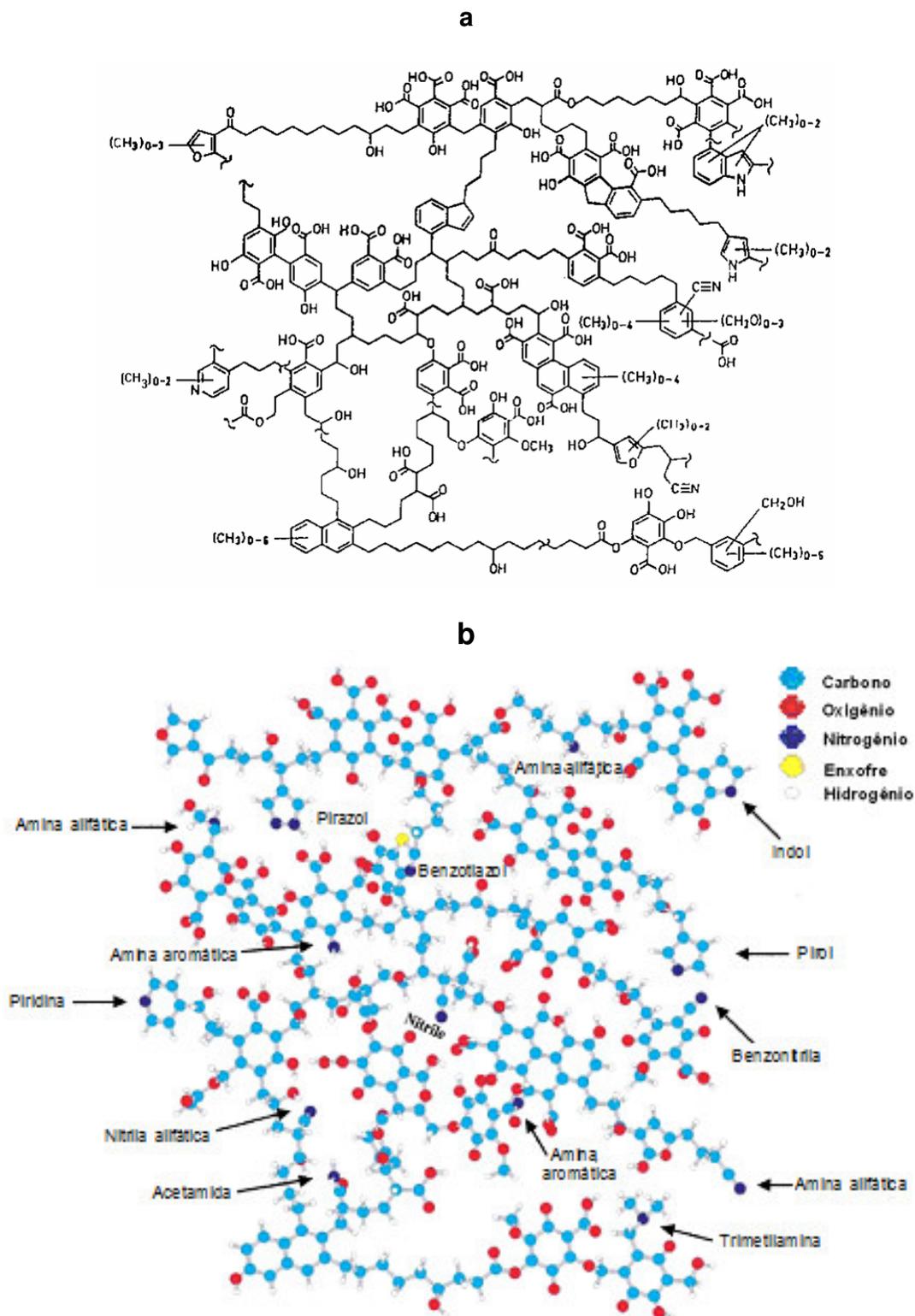


Figura 2. Estruturas propostas para ácidos húmicos por Schulten e Schnitzer.^{14,15}

As características físicas e químicas de ácidos húmicos extraídos de diferentes localidades dependem de muitos fatores como o tipo do material original, condições climáticas, acidez e grau de umidade do solo. Apesar da composição variada, dependendo da origem e do método de extração, há muitas características em comum entre diferentes AH que se sobrepõem às diferenças. A composição elementar média, a porcentagem de carbono está na faixa de 38 a 60%, a de oxigênio entre 35 e 46%, a de nitrogênio entre 0,5 e 3% e hidrogênio abaixo de 6%,^{16,17} como pode ser observado na Tabela 1. Também, os grupos funcionais predominantes como carboxilas e hidroxilas fenólicas e alcoólicas, o grau de acidez, o intervalo de massa molecular que para o ácido fúlvico situa-se entre 800-1000 Da e para o AH, entre 2000-3000 Da¹, as propriedades no meio ambiente, entre outras características.^{1,3,13,16}

Tabela 1 – Análise elementar (percentual em massa) de diferentes ácidos húmicos.

	AH (Aldrich) ¹⁷	AH de solo ¹⁸	AF de solo ¹⁸	AH aquático ¹⁹
% C	59,59	38,99	45,52	52,07
% H	3,90	3,95	5,63	5,07
% O	35,55	36,35	45,97	39,93
% N	0,80	0,60	2,78	2,37

1.2.4 Importância dos AH no meio ambiente

A presença dos ácidos húmicos no ambiente pode possibilitar efeitos benéficos a solos, sedimentos e águas naturais tais como:

- ✓ Influenciam a biodisponibilidade de metais,^{20,21} bem como de micro e macronutrientes para as plantas;
- ✓ Influenciam no transporte, acúmulo e concentração de espécies metálicas no ambiente.²¹ A elevada acumulação de Cu^{2+} em turfas é atribuída à presença desses compostos;²²
- ✓ Influenciam diretamente na toxicidade de alguns metais, formando complexos com diferentes labilidades relativas.^{20,23}
- ✓ Interação de Al^{3+} com material orgânico é importante no controle desse metal em solo ácido;²⁴
- ✓ A complexação com metais no solo auxilia na produção de compostos como aminoácidos e ácidos alifáticos por microorganismos;
- ✓ Podem interagir com compostos orgânicos como, pesticidas e herbicidas, diminuindo sua biodisponibilidade e toxicidade;²⁵⁻²⁷
- ✓ Possuem coloração escura o que aumenta a retenção de calor auxiliando a germinação de sementes;
- ✓ A elevada capacidade de retenção de água (até 20 vezes sua massa) auxilia a conservação do solo contra erosão;
- ✓ Ao se combinarem com argilas e minerais formam agregados que cimentam as partículas do solo fazendo com que pouca matéria orgânica seja lixiviada;
- ✓ Atuam como fertilizantes naturais cedendo nutrientes importantes para o desenvolvimento dos vegetais como NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} , resultantes de sua formação e decomposição.²⁶
- ✓ Desempenham ação tamponante em amplo intervalo de pH o que auxilia a manutenção das condições reacionais de solo.^{9,28}

1.2.5 Interação dos ácidos húmicos com metais

Uma das principais propriedades do ácido húmico é a sua capacidade de interação com espécies metálicas, pois através destas interações, são biodisponibilizados a maioria dos micro e macro-nutrientes às plantas, bem como as propriedades de interação com compostos argilo-minerais que garantem a cimentação do solo. No entanto, deve-se tomar cuidado nestes estudos, pois a capacidade de interação dos AH com os metais dependem diretamente da protonação/desprotonação de sua superfície. Assim, a grande capacidade de interação com metais que o AH apresenta é dependente do valor do pH. Pode ser observado que com a adição de metal em uma solução contendo AH, ocorre liberação de prótons à solução, comprovando que os metais devem interagir com os grupos carboxílicos.

Esta excepcional capacidade de complexação de metais pelo AH está diretamente ligada ao alto teor de oxigênio encontrado na sua estrutura na forma, principalmente, de grupos carboxílicos e fenólicos.^{22,29} O estado coloidal do AH e sua estrutura macromolecular retém íons metálicos de vários modos, tais como, adsorção por atração eletrostática (forças de van der Waals) e ligações de hidrogênio formando complexos de esfera externa, ou por quelação e/ou complexação através de ligações coordenadas formando complexos de esfera interna,³⁰ como pode ser observado na Figura 3. As interações entre metais e AH formam um sistema coloidal polidisperso relativamente complicado determinado por uma série de fatores, incluindo número de átomos que formam a ligação com o metal, concentração do íon metálico, pH e tempo de complexação.³⁰

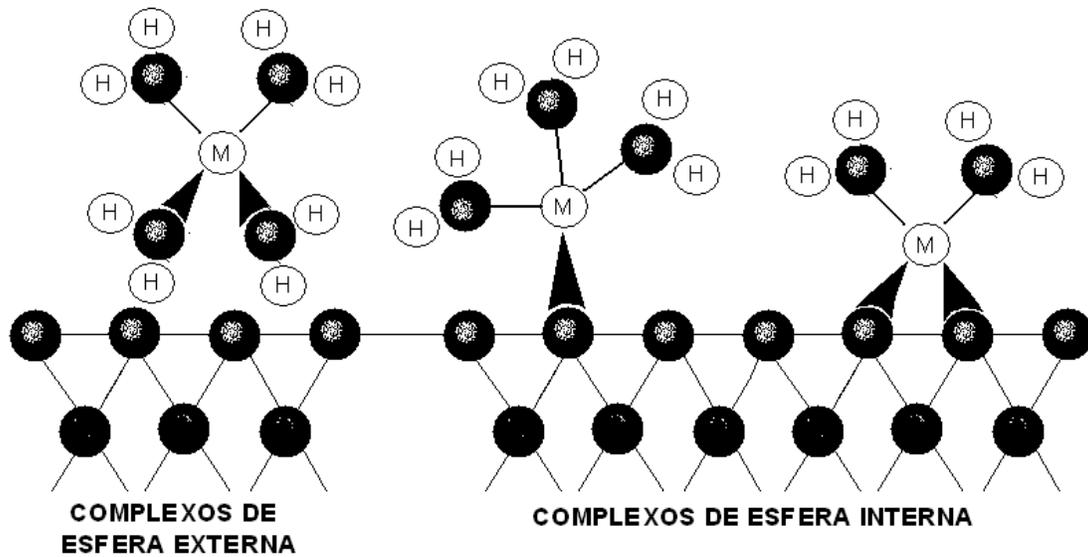


Figura 3. Arranjos estruturais em complexos de superfície. Possíveis complexos de adsorção na interface água/sólido (representada pela linha horizontal). O substrato sólido está abaixo da linha horizontal, já a solução está acima. O símbolo (M) representa um átomo metálico adsorvido em vários tipos de complexos de adsorção. Os símbolos (●) e (H) representam átomos de oxigênio e hidrogênio, respectivamente.³¹

Para reações de complexação, todos os modelos de estudo são empíricos devido à complexidade do sistema. Um modelo deve, então, descrever a interação do metal em função do pH, da concentração de AH e da força iônica. A expressão de equilíbrio que descreve uma reação de complexação de uma espécie metálica por um sítio simples é:^{8,9,21}



$$K = \frac{[M_mL]}{[M]^m[L]^l} \quad (2)$$

Onde M , L e ML representam as concentrações do íon metálico livre, ligante e complexo, respectivamente.^{8,9,20} Para AH, pelo fato do sistema ser polifuncional, o número de parâmetros é muito grande o que requer muitas aproximações para que os parâmetros sejam estatisticamente significativos. Por exemplo, considerar os sítios complexantes como ligantes dissolvidos na solução, não considerar interações entre eles e negligenciar a influência da carga elétrica da molécula na reação de

complexação.⁹ A concentração do metal complexado é calculada a partir do balanço de massa $[ML] = [M]_{total} - [M]$. A fração de sítios de ligação f_i é definida como

$$f_i = \frac{[ML]_i}{[L]_i} \quad (3)$$

Em que, $[L]$ é a concentração total de sítios de complexação, em mol L⁻¹, considerando-se um número finito de diferentes sítios complexantes. Como para AH, a massa molar não é definida por um único valor e a concentração total de sítios não é conhecida, a priori, se expressa a fração de sítios como:⁸

$$f_i = \frac{[ML]_i}{\{P\}} = CC \quad (4)$$

Em que $\{P\}$ é a concentração do ligante, em g L⁻¹, e CC é a capacidade complexante (número de mol de sítios de complexação por grama do ligante). Das equações (3) e (4), a expressão da constante de equilíbrio condicional K, em pH e força iônica constante pode ser:⁸

$$K_i = \frac{[ML]_i}{[M]_i[L]_i} \quad (5)$$

A estabilidade cinética e termodinâmica das espécies M-AH influencia diretamente seu transporte, acúmulo e biodisponibilidade no meio ambiente. Desta forma, a investigação dos processos de troca entre metal e AH são importantes para caracterizar qualitativa e quantitativamente espécies metálicas no ambiente. Processos de troca iônica entre íons metálicos e complexos metálicos macromoleculares, como AH-M, podem ser descritos pelo seguinte equilíbrio:^{8,9,20}



Onde AH-M indica espécies formadas entre o metal e AH, Tr é a resina trocadora iônica e M-Tr é a espécie formada pelo metal e a resina.²⁰

Um aspecto interessante sobre a interação de AH com metais é que estas interações são endotérmicas ($\Delta H > 0$) e espontâneas ($\Delta G < 0$). Assim, estas interações são dirigidas pelo aumento de entropia ($\Delta S > 0$), este tipo de interação endotérmica e endoergônica é característica de efeito quelato, ou seja, os grupos funcionais da superfície do AH devem complexar os metais através de quelatos.³²

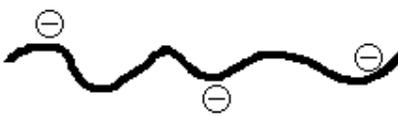
Novas e promissoras utilizações para os AH tem sido estudadas,⁹ entre elas, Santos et al. (2004),³³ sugerem um possível uso terapêutico para o AH. Comparando a complexação de elementos traço de interesse biológico (Al, Cu, Pb, Mn, Zn, Cd e Ni) com ácidos húmicos (AH) e α -aminoácidos (metionina, metionina sulfóxido e cloridrato de cisteína), observaram que os AH podem ser considerados agentes complexantes seletivos e com alta capacidade de complexação para Al, Cu e Pb.³³

1.2.6 Protonação e desprotonação dos AH

A ligação de um íon à superfície dos AH é influenciada pela heterogeneidade química e pelo comportamento da carga na sua superfície. Os prótons determinam o estado dos grupos funcionais, em baixo valor de pH os grupos estão protonados, já em valores altos de pH, os grupos funcionais se dissociam e se tornam negativamente carregados. Ao redor das partículas carregadas há a formação de uma difusa dupla-camada elétrica. A dupla-camada protege a carga de modo que o sistema, carga mais a dupla-camada, permaneça sem carga. No caso de uma partícula negativamente carregada, a concentração de íons metálicos positivamente carregados e de prótons serão maiores na dupla camada do que no restante da solução. Esta acumulação carga induzida resulta em um aumento das ligações com íons positivos. Os íons do eletrólito de fundo determinam a eficiência da proteção da carga superficial, ou seja, em pequena força iônica o campo elétrico ao redor da carga é relativamente mais abrangente dentro da solução, com isso a dupla-camada será espessa, em alta força iônica, uma forte proteção resulta em uma dupla-camada fina. A influência da força iônica sobre a eletrostática superficial do AH é determinante nas ligações com íons.³⁴

A conformação da macromolécula do AH em solução é governada pelo pH e pela força iônica, Tabela 2. Em meios neutros a alcalinos, a macromolécula carregada assume uma conformação estendida (grande raio hidrodinâmico, R_h) como resultado da repulsão eletrostática intramolecular. Em alta força iônica ou baixo pH, o polieletrólito apresenta uma configuração enovelada (pequeno R_h).³¹

Tabela 2 – Efeito do pH e da força iônica na conformação da molécula do ácido húmico. R_h denota o raio hidrodinâmico da molécula em solução.³¹

Condição	Solução
Baixo pH ou alta força iônica	 Pequeno R_h
pH neutro ou alcalino e baixa força iônica	 Grande R_h

A capacidade tamponante do solo e a biodisponibilidade, mobilidade, e transporte de macro e micronutrientes, metais tóxicos e cátions orgânicos xenobióticos no solo são fortemente influenciadas pelas propriedades ácido-básicas dos AH.³⁵ As interações peculiares do ácido húmico de protonação/desprotonação de sua superfície também influenciam diretamente o efeito tampão que os AH desempenham nos solos e sistemas aquáticos. Porém, os ácidos húmicos apresentam uma capacidade tampão pouco conhecida e de alta importância ambiental,^{36,37} por isso a determinação da capacidade tampão de ácidos húmicos é de suma importância para a compreensão do seu papel no tamponamento do pH em solos e águas.^{36,38}

1.3 Tampões

Uma solução tampão resiste a variações no pH decorrentes da diluição ou da adição de pequenas quantidades de ácidos ou bases.³⁹ Geralmente, as soluções-tampão consistem de um par ácido-base conjugado como ácido acético/acetato ou cloreto de amônio/amônia. Os tampões são fundamentais em um grande e variado número de situações tanto em química analítica, físico-química, biologia e agricultura nas quais se deseja um controle de pH.

O pH de uma solução tampão depende da posição dos equilíbrios envolvidos:



Assim, o tampão será ácido se o primeiro equilíbrio for favorecido e alcalino se o segundo for mais pronunciado. Para se calcular o pH é necessário utilizar as concentrações de HA e A⁻ no equilíbrio em função das concentrações iniciais que, a partir das equações 7 e 8, podem ser expressas da seguinte forma:

$$[HA] = c_{HA} - [H_3O^+] + [OH^-] \quad (9)$$

$$[A^-] = c_{A^-} + [H_3O^+] - [OH^-] \quad (10)$$

Por causa da relação inversa entre o H⁺ e o OH⁻ é sempre possível eliminar um ou outro das equações 9 e 10 e, por se tratar de ácidos ou bases fracas, pode-se negligenciar a diferença entre as concentrações inicial e no equilíbrio e aproximar as equações 11 e 12 para:

$$[HA] \cong c_{HA} \quad (11)$$

$$[A^-] \cong c_{A^-} \quad (12)$$

Portanto a concentração do íon hidrônio pode ser expressa, a partir da constante de dissociação e das aproximações, pela equação 13:

$$[H_3O^+] = K_a \frac{c_{HA}}{c_{A^-}} \quad (13)$$

As aproximações, entretanto, não serão válidas para concentrações do ácido fraco e de sua base conjugada muito baixas ou para ácidos ou bases com altas constantes

de dissociação, geralmente acima de 10^{-3} .³⁹ Um sistema poliprótico pode ser entendido como uma mistura de ácidos monopróticos individuais.⁴⁰

1.3.1 Capacidade tampão

A capacidade tamponante de uma solução é tão ou mais importante que o valor do pH que esta solução controla. A capacidade tampão (CT) é uma indicação da quantidade de ácido ou base que pode ser adicionada antes do tampão perder sua habilidade de resistir a mudanças de pH e é dependente da quantidade total de ácido ou base conjugada disponíveis no sistema. A CT é definida como o número de mols de um ácido, ou de uma base forte, que provoca a variação de uma unidade no pH de 1,00 L de um tampão, matematicamente foi proposta por Van Slyke, em 1922, e é expressa pela equação:

$$\beta = \frac{\Delta Cb}{\Delta pH} = -\frac{\Delta Ca}{\Delta pH} \quad (14)$$

Em que β é a capacidade tampão, e Ca e Cb são as concentrações de ácido ou base forte na solução, respectivamente. Como a adição de ácido provoca uma diminuição do pH, $\Delta Ca/\Delta pH$ é negativo, então a capacidade tampão é sempre positiva. Desta forma, a ação tamponante demonstra a habilidade de um tampão resistir a variações no pH, isto é minimizar o ΔpH . Por isso, para se escolher um tampão deve-se, não somente, definir o pH, mas quanto se adicionar deste tampão para se garantir a realização do processo no pH desejado.^{36,39-42}

2 Objetivos

Esta dissertação se propõe a contribuir com um maior entendimento das propriedades físicas e químicas do ácido húmico principalmente, em relação a suas propriedades ácido-base que são muito importantes na manutenção das condições reacionais dos solos e águas naturais

Para tanto, o trabalho tem como objetivos específicos os seguintes estudos:

Caracterizar o ácido húmico utilizando diversas técnicas citadas pela literatura, e também ampliar este leque com outras técnicas pouco exploradas na caracterização de AH;

Determinar a capacidade tampão do ácido húmico.

Determinar o efeito térmico das reações do ácido húmico com ácidos ou bases.

Determinar a densidade de carga superficial, bem como, o ponto de carga zero (PZC) do ácido húmico.

3 Procedimento Experimental

3.1 Reagentes e soluções

Foi utilizado ácido húmico comercial Fluka.

Foram utilizados hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), e ácido nítrico (HNO₃) Vetec de grau analítico e sem quaisquer purificações prévias.

3.1.1 Diálise do ácido húmico

O ácido húmico comercial foi suspenso em água e dializado em membrana de celulose com porosidade nominal de massa molecular de 2000 Da a fim de reduzir a quantidade de sal presente no ácido húmico. A água externa foi substituída regularmente durante as primeiras 5 h e então a cada 12 h até que o cloreto não pudesse mais ser detectado.

3.2 Caracterização

3.2.1 Análise elementar e residual

A análise elementar para C, N, H, e O foi realizada em um analisador elementar Perkin Elmer PE-2400.

O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa residual do AH obtida por calcinação do mesmo a 600 °C durante 24 h.

3.2.2 Acidez total

A acidez do ácido húmico foi determinada por titulação potenciométrica em duas reações distintas: uma para a determinação da acidez carboxílica e a outra

para acidez total. A acidez fenólica é, então obtida pela diferença entre acidez total e a carboxílica.⁴³

3.2.2.1 Acidez carboxílica

Uma amostra de 50 mg AH foi colocada em um erlenmeyer juntamente com 50 mL de solução de 0,2 mol/L de acetato de cálcio em água, livre de CO₂. A solução ficou em agitação por 24 horas. A suspensão foi filtrada em papel de filtro. O resíduo lavado com água livre de CO₂. A mistura (filtrado + água de lavagem) foi titulada com solução de NaOH 0,100 mol/L, padronizada. A variação do pH foi acompanhada em pH-metro, até pH = 9,8.

3.2.2.2 Acidez total e fenólica

Em 20 mL de solução de hidróxido de bário 0,125 mol/L, foi adicionado 50 mg de AH. A suspensão ficou sob agitação durante 24 horas, isolada do ar, e então foi filtrada com papel de filtro. O resíduo foi lavado com água, livre de CO₂. A mistura (filtrado + água de lavagem) foi titulada com solução padronizada de HCl 0,05 mol/L padronizada, sob atmosfera inerte. A titulação foi acompanhada com auxílio de um pH-metro até pH 8,4. Da mesma maneira foi feito o preparo do branco, constituído apenas por 20 mL de solução de Ba(OH)₂ 0,125 mol/L.

3.2.3 Análise térmica

As curvas termogravimétricas foram obtidas com aproximadamente 10 mg de amostra sólida do ácido húmico em um analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50, em atmosfera dinâmica com fluxo de hélio seco, inicialmente a temperatura ambiente que foi sendo elevada à razão de 0,33 °C s⁻¹ até 900 °C.

3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas para o efeito do pH na morfologia do ácido húmico. Foram realizadas análises do

ácido húmico em sua forma natural, isto é, o ácido húmico comercial foi dializado e liofilizado antes das análises de MEV. Também foram feitas imagens do ácido húmico em sua forma acidificada. Neste caso, 100 mg de ácido húmico foram suspensos em 50 mL de solução aquosa de HCl 0,10 mol/L. A suspensão ficou sob agitação magnética durante 24 h a temperatura ambiente, posteriormente, o volume da suspensão foi reduzido em um rota- evaporador e amostra foi liofilizada.

As amostras de AH foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50. A amostra foi fixada com fita adesiva dupla face em suporte e submetida à metalização em ouro em um metalizador Baltec SCD 050. O equipamento foi operado com um feixe de elétrons de 20 KeV.

3.2.5 Área superficial

A determinação da área superficial foi calculada através da isoterma de adsorção de nitrogênio em um analisador Quantachrome Nova 2200. As amostras foram previamente secas a vácuo a 80 °C.

3.2.6 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho, de todas as amostras, foram executados em pastilhas de KBr na região de 4000-400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, com um Espectrofotômetro FTIR MB-100 Bomem.

3.2.7 Espectroscopia ultravioleta/visível (UV/Vis)

A análise de UV/Vis foi executada em um espectrômetro UV/Vis Beckman DU a fim obter a relação E4/E6 em função do pH. Para determinar esta relação foi utilizada uma suspensão aquosa de ácido húmico 0,5 mg L^{-1} e NaHCO_3 0,01 mol L^{-1} . O pH foi ajustado com HCl ou NaOH ambos 0,01 mol L^{-1} .

3.2.8 Espectrometria de Ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido

O espectro ^{13}C -NMR de amostra sólida do HA foi determinado em um espectrômetro Varian Mercury Plus 300 operado em temperatura ambiente. O ácido húmico foi compactado em um rotor de nitreto de silício de 7 mm e as medidas foram obtidas em frequência de 75,47 MHz com velocidade do ângulo mágico de 3 kHz. A técnica de CP/MAS, com repetições do pulso de 2 s e tempo de contato de 4 ms, foi usada a fim aumentar a relação sinal/ruído nos espectros de estado sólido.

3.3 Estudo da densidade superficial de carga

A densidade de carga superficial foi calculada a partir dos dados obtidos através de titulações potenciométricas e condutimétricas simultâneas, as quais foram realizadas utilizando 50 mL de suspensão aquosa de AH 40,0 g/L. O AH foi totalmente protonado pela adição de 6,0 mL de HCl 1,0 mol/L, em seguida a suspensão foi titulada com NaOH 0,05 mol/L, padronizada. As titulações potenciométricas foram realizadas empregando-se um pHmetro PHTEK modelo PHS-3B com eletrodo de Ag/AgCl de dupla junção. Para as titulações condutimétricas foi utilizado um condutivímetro Cole Parmer.

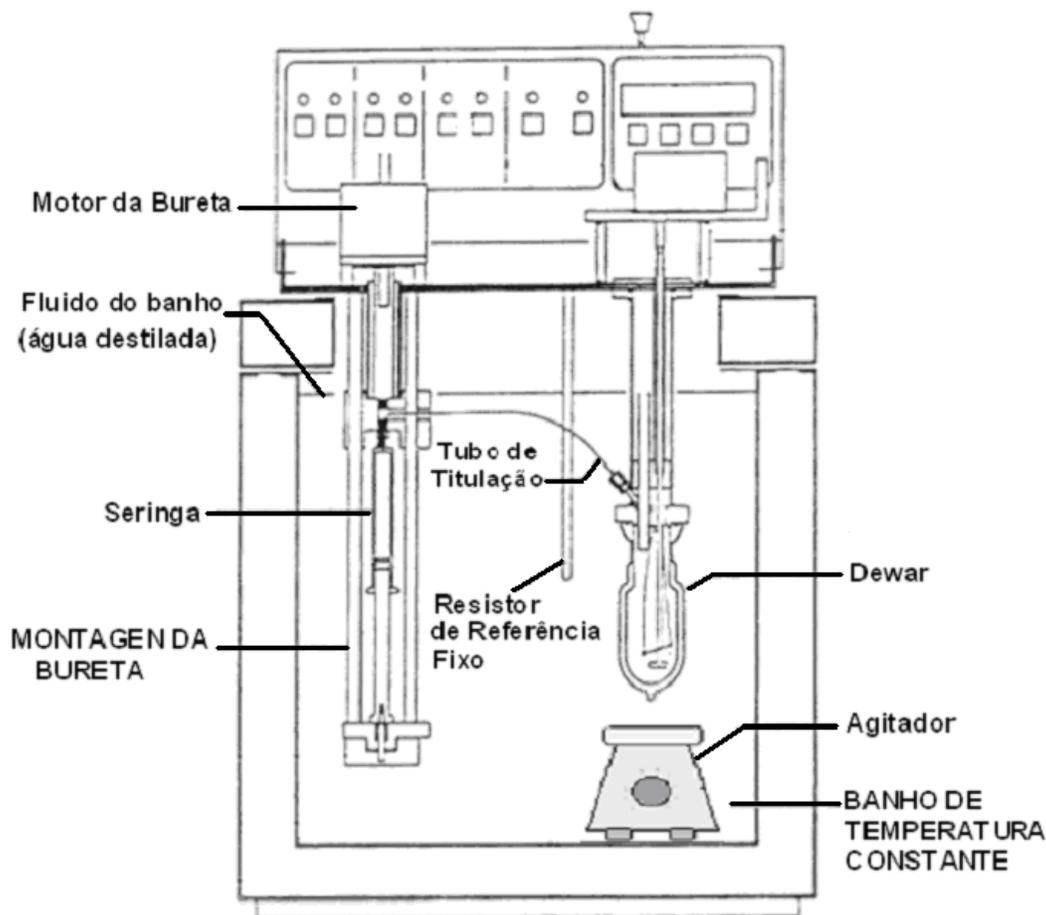
3.4 Determinação da capacidade tampão

A capacidade tampão foi determinada por titulações potenciométricas realizadas empregando-se um pHmetro PHTEK modelo PHS-3B. Uma suspensão de 20,0 mg de AH em 50 mL de água, sob agitação magnética, foi titulada com ácido nítrico (HNO_3 0,05 mol/L, padronizado), e depois com hidróxido de sódio (NaOH 0,05 mol/L, padronizado). Foi realizada também uma titulação na ausência de AH para observar as variações no pH pela simples adição de ácido ou base.

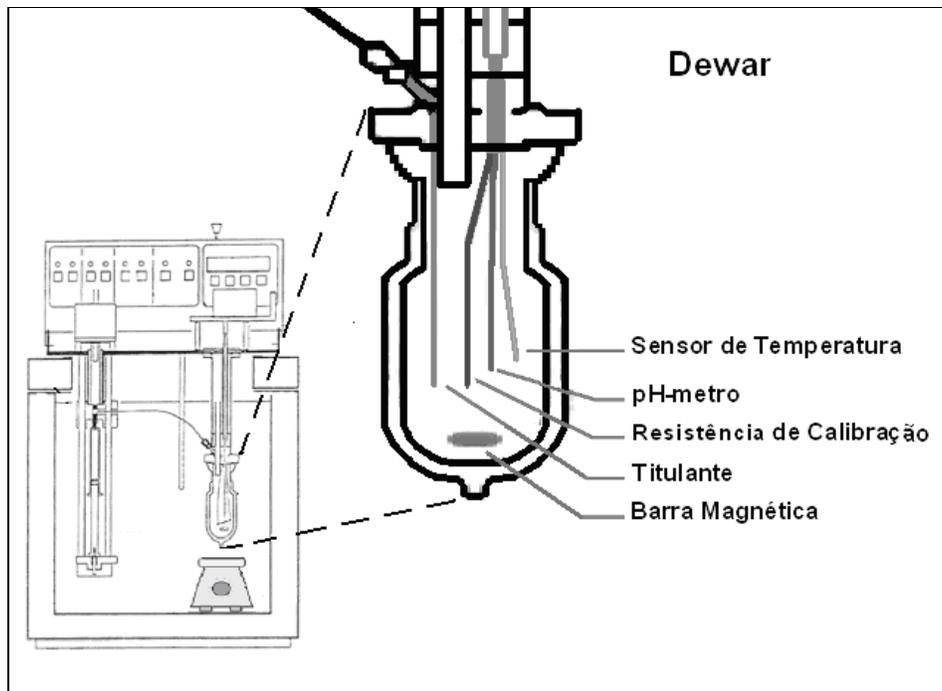
3.5 Estudo calorimétrico da capacidade tampão

As titulações calorimétricas foram realizadas em um Calorímetro Isoperibólico ISC-4300, cujos detalhes estão esquematizados na Figura 4. A temperatura do banho foi mantida a $25 \pm 0,01$ °C. Para determinar a entalpia da interação do AH com ácido e base, foram adicionados incrementos de 0,5 mL de HNO_3 0,05 mol/L e, em seguida, de NaOH 0,05 mol/L, ambos padronizados, na suspensão de 20,0 mg de AH em 50 mL de água sob agitação magnética. As adições foram feitas automaticamente pelo aparelho em intervalos de 10 min. A titulação calorimétrica também foi acompanhada na ausência de AH para observar as variações de calor da diluição de ácido ou base em 50 mL de água.

O calor liberado em cada ponto da titulação é calculado através da calibração elétrica do calorímetro onde, um sinal elétrico conhecido é gerado à resistência para o aquecimento da solução dentro do Dewar, com a variação da temperatura medida é calculada a energia equivalente do sistema em $\text{J } ^\circ\text{C}^{-1}$.



a



b

Figura 4. Representação do calorímetro (a), e detalhes do dewar (b).

4 Resultados e discussão

4.1 Caracterização

4.1.1 Análise elementar

A análise elementar é uma das técnicas mais utilizadas para caracterização de substâncias húmicas, pois possibilita comparações entre classes e origens de diferentes materiais húmicos e, avaliações sobre a eficiência dos processos de extração e purificação,²⁶ bem como estimar o conteúdo de grupos funcionais oxigenados. Estes grupos são tidos como os principais responsáveis pelas interações das SH com compostos orgânicos e inorgânicos.⁴⁴

Os valores obtidos para a composição elementar e para o teor de cinzas do AH, bem como dados citados na literatura encontram-se listados na Tabela 3. De acordo com os dados da Tabela 3, os valores para a composição elementar do AH utilizado estão dentro do intervalo citado por Stevenson,⁵ e são muito similares a outros trabalhos que utilizam AH Fluka.⁴⁵ O conteúdo de hidrogênio está relacionado com o grau de saturação, isto é, um aumento no teor de hidrogênio indica maior número de carbonos alifáticos (CH₂) que carbonos aromáticos (C=C).^{15,44}

Tabela 3 – Análise elementar e residual do ácido húmico.

	C (%)	N (%)	H (%)	O (%)	Cinzas (%)
AH	56.34 ± 0.71	4.91 ± 0.56	5.57 ± 0.11	33.18 ± 0.89	1.88 ± 0.05
Purificado					
Stevenson ⁵	50-60	4-6	2-6	30-35	<5

4.1.2 Acidez total, carboxílica e fenólica

A excepcional capacidade de interação do ácido húmico com metais ocorre devido ao grande número de oxigênios encontrados em sua estrutura, na forma de grupos ácidos, principalmente carboxilas e hidroxilas fenólicas. Por isso, a determinação da acidez do AH é de grande importância, pois está diretamente relacionada com sua reatividade.⁴³

O ácido húmico apresentou os valores 2,54 mmol/g para acidez carboxílica, 4,94 mmol/g para acidez total e, conseqüentemente, 2,40 mmol/g para acidez fenólica. Estes valores estão de acordo com os descritos na literatura para AH de solo.^{17,46}

4.1.3 Análise térmica

Métodos de análise térmica são meios rápidos e precisos muito importantes no estudo de materiais complexos. Para os AH, entretanto, pelo fato de ser uma mistura variada de estruturas não possibilita através da análise térmica a identificação individual de compostos, apesar disto, parâmetros básicos como perda de massa em regiões específicas de temperatura, cinética de degradação ou temperatura de transição vítrea são freqüentemente obtidos. A degradação térmica ou termoxidativa dos AH ocorre em duas ou três etapas. A baixas temperaturas moléculas alifáticas, muitos grupos polares e aromáticos simples são degradados, em seguida, para um intervalo de temperatura entre ~200-300 °C, ocorre a degradação de frações poliaromáticas e, em temperaturas maiores que 400 °C, são atribuídas a degradação de estruturas poliheterocíclicas. A termodegradação pode, entretanto causar a recombinação de moléculas alifáticas em compostos aromáticos mais estáveis, ocasionando interferências nas etapas. Como medida da estabilidade térmica e velocidade da perda de massa a análise térmica é freqüentemente utilizada.⁴⁷

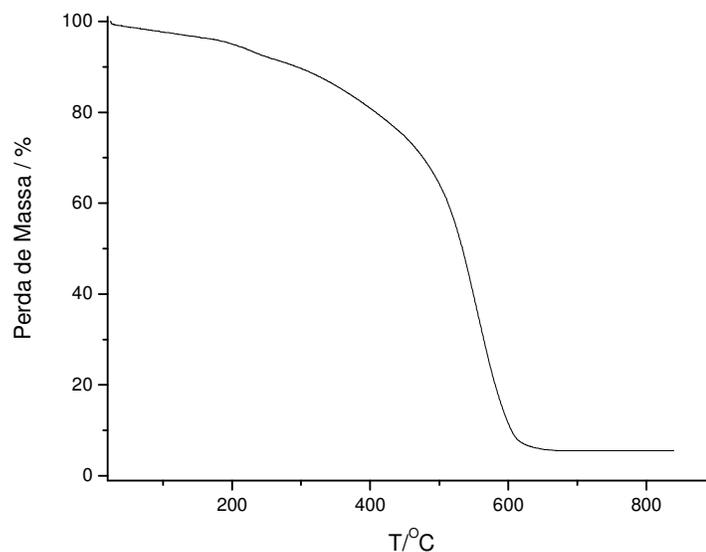


Figura 5. Curva termogravimétrica do ácido húmico.

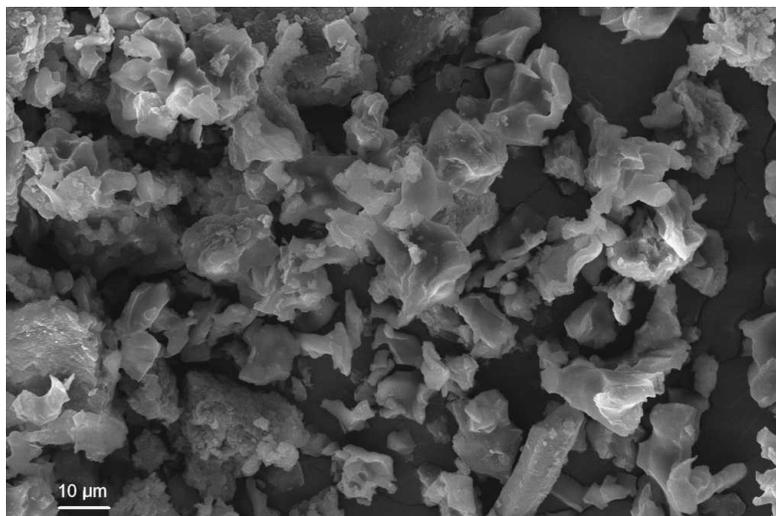
A curva termogravimétrica para o AH foi obtida para determinar a estabilidade térmica, como mostra a Figura 5. O ácido húmico apresentou uma perda de massa típica entre 60-140 °C, atribuída à água adsorvida, seguida de uma abrupta perda de massa referente à matéria orgânica iniciada em 240 °C e finalizada em 740 °C, restando um resíduo de aproximadamente 10%. As porcentagens de perda de massa $\Delta m = 16.0$ e 79.5 %, e os respectivos intervalos de temperatura foram de $T = 100-180$ e $240-800$ °C.¹⁶

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

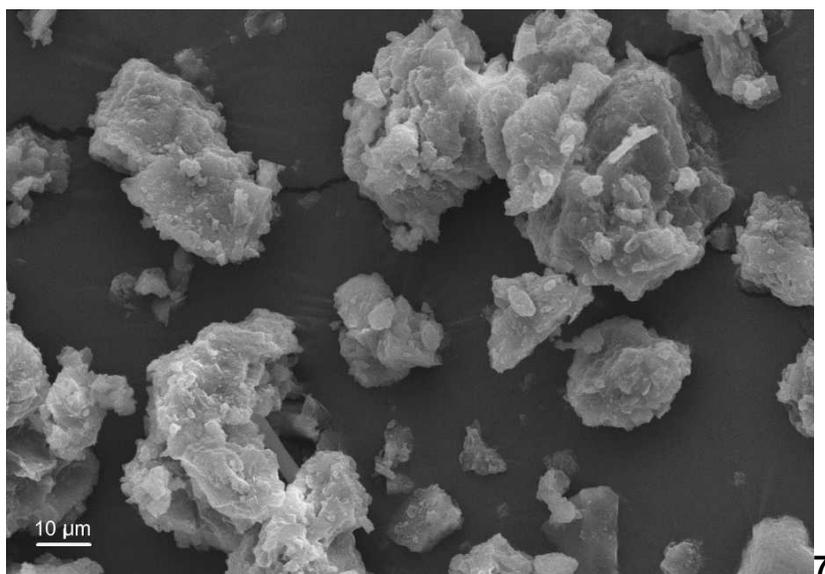
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é amplamente utilizada para análises da morfologia de materiais em função da alta resolução que pode ser atingida, tipicamente da ordem de 10,0 nm, e a grande profundidade de foco, em média 300 vezes melhor que a do microscópio ótico, resultando em imagens com aparência tridimensional.

A Figura 6a apresenta a imagem de MEV do AH em seu pH natural, o qual apresenta uma morfologia com certa regularidade, com partículas próximas em uma estrutura amorfa em microescala, o que sugere uma estrutura mais estendida.

Enquanto, a imagem a Figura 6b, a qual representa o AH acidificado, pode ser observado a agregação de pequenas partículas, formando partículas amorfas de maior tamanho e mais isoladas, o que sugere a interação supramolecular através de interações fracas não-específicas (London e van der Waals), bem como interações supramoleculares do tipo ligação de hidrogênio que dão suporte a esta estrutura mais rígida e enovelada.⁴⁸



a



b

Figura 6. Imagem de MEV do ácido húmico no pH natural (a) e acidificado (b).

4.1.5 Área superficial

A técnica de adsorção de nitrogênio a baixas temperaturas tem sido utilizada para obtenção da área superficial de um material, através da metodologia de cálculo denominada de BET (em referência a equação de S. Brunauer, P. Emmett e E. Teller).⁴⁹ Além disso, diversas informações sobre a morfologia do material podem ser obtidas através de uma análise mais aprofundada de tais isotermas.

Quando um sólido é exposto a um gás ou vapor em um sistema fechado à temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, ocorrendo assim um aumento da massa do sólido e um decréscimo da pressão do gás. Após um determinado tempo, a massa do sólido e a pressão do gás assumem um valor constante. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido. As isotermas de adsorção/dessorção são obtidas a partir dos valores de volume de nitrogênio adsorvido no material em função da pressão relativa P/P_0 , onde P_0 é a pressão de saturação do gás, ou seja, a pressão em que o gás entrará em equilíbrio com a forma líquida na temperatura de ebulição do nitrogênio. Deste modo, a isoterma mostra a relação entre a quantidade molar n de gás adsorvida ou dessorvida por um sólido, a uma temperatura constante em função da pressão do gás.⁵⁰

A análise para o AH foi realizada utilizando-se nitrogênio de alta pureza como adsorbato e nitrogênio líquido como banho refrigerante, visto que a adsorção é um processo exotérmico e um aumento de temperatura desfavorece a adsorção. A Figura 7 mostra a isoterma de adsorção/dessorção de N_2 do AH, o qual apresentou uma baixa área superficial $0,52 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, concordante com os valores encontrados na literatura.⁵¹ O perfil desta isoterma, bem como a ausência de histerese, ou seja, tanto a adsorção como a dessorção seguem o mesmo caminho, caracterizam que este material é microporoso.⁵⁰

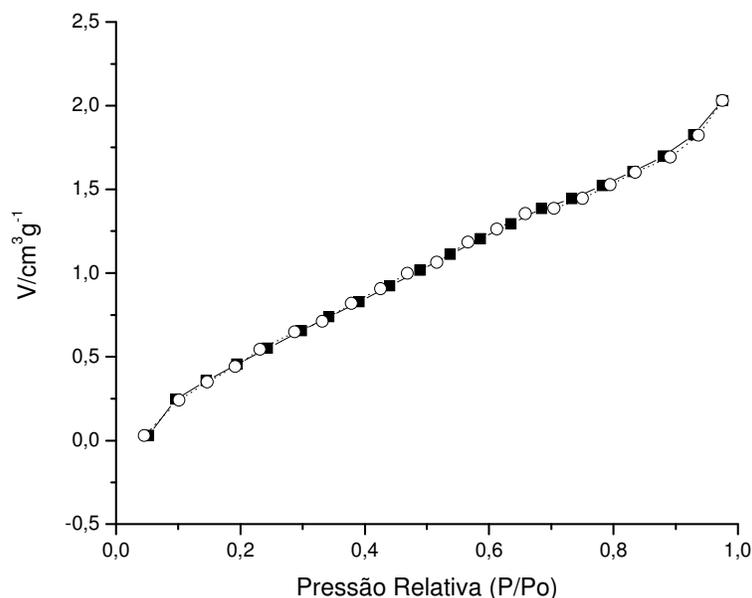


Figura 7. Isoterma de adsorção/dessorção de N₂.

4.1.6 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho tem sido empregada para caracterizações gerais de ácidos húmicos e pode fornecer informações valiosas sobre a estrutura, a natureza dos grupamentos funcionais nos AH das mais diversas origens, bem como para avaliar os efeitos dos extratores químicos utilizados e o grau de pureza alcançado através dos processos de purificação. Outras aplicações desta técnica espectroscópica estão relacionadas com a investigação de possíveis trocas nas estruturas químicas dos AH e na indicação de interações com herbicidas e/ou metais nos ambientes aquáticos e terrestres.^{16,52,53} O espectro de infravermelho do AH, figura 8, mostra picos característicos do AH como: i) uma banda forte e muito larga em 3500 a 3000 cm⁻¹ atribuída ao estiramento OH de grupos álcoois, fenóis e carboxílicos; ii) bandas em 2922 e 2851 cm⁻¹ relacionadas ao estiramento CH de carbono sp³; iii) bandas largas entre 1720 e 1650 cm⁻¹ atribuídas a C=O de amidas, cetonas, ésteres e ácidos carboxílicos; iv) outras bandas largas em 1600-1500 cm⁻¹ atribuídas a freqüências de estiramento simétrico de COO⁻ e C=C de grupos aromáticos; v) as bandas largas entre 1400 e 1300 cm⁻¹, atribuídas a deformação OH e estiramento anti-simétrico de COO⁻, ambas características de moléculas de

AH; vi) bandas largas entre 1290 a 1100 cm^{-1} atribuídas a C aromático e a estiramento C–O de grupos fenólicos e alifáticos, bem como a deformação OH de –COOH, e vii) picos entre 1120 to 1000 cm^{-1} atribuídos a C–O de polissacarídeos.^{16,54} As principais bandas de absorção para os AH e as atribuições correspondentes são listadas na tabela 4.

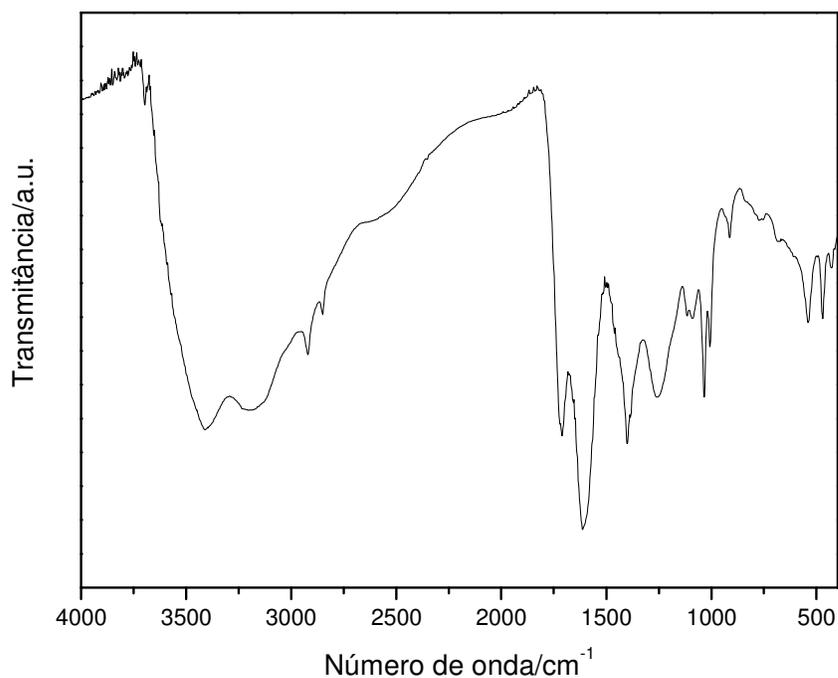


Figura 8. Espectro de infravermelho do ácido húmico.

Tabela 4 – Principais bandas presentes no espectro de FTIR do ácido húmico.

Número de onda/cm ⁻¹	Descrição
3413,7	$\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{NH})$
3205,4	$\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{NH})$
2921,9	$\nu_{\text{as}}(\text{CH})$
2850,5	$\nu_{\text{s}}(\text{CH})$
2623	$\delta(\text{OH})$
2042,4	$\nu(\text{C}=\text{C}=\text{O})_{\text{cetano}}$ e $\nu(\text{C}=\text{C}=\text{C})_{\text{aleno}}$
1712,6	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ácido carboxílico}}$
1614,3	$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{aromático}}$
1400,2	$\nu(\text{C}-\text{N})$ e $(-\text{CH})_{\text{deformação no plano}}$
1257,4	$\nu(\text{OH})$
1114,7	$\nu(\text{CO})$
1091,6	$\nu(\text{COC})_{\text{éter}}$
1035,6	$\nu(\text{CO})$ e $\delta(\text{COH})$
1006,7	$\nu(\text{CO})$
914,19	$\delta(\text{CH})$
777,25	$\delta(\text{CH})$
684,68	$\delta(\text{CH})$

4.1.7 Espectroscopia UV/Vis

A conformação estrutural de macromoléculas como os AH depende de vários fatores: pH, força iônica, densidade de carga, grau de ionização dos grupos ácidos e concentração do AH, bem como, ligações de hidrogênio e rearranjos intramoleculares.

A dispersão de luz monocromática em uma solução diluída de macromoléculas ou em colóides está intimamente ligado com a massa, tamanho e interações das partículas na solução. Entretanto, de acordo com Doty e Steiner,⁵⁵ informações similares podem ser obtidas pela comparação das absorvâncias em comprimentos de onda distintos, usando a formula:

$$\frac{-\Delta \log A}{\Delta \log \lambda} = 4 - \beta \quad (15)$$

Onde A é a absorvância da solução, λ o comprimento de onda da luz transmitida, β é diretamente proporcional a b/λ° , b é a maior dimensão da partícula e λ° , o comprimento de onda da luz incidente. Chen et al.,⁵² usando absorvância da solução do ácido fúlvico com diferentes massas moleculares médias em 465 e 665 nm mostraram que a teoria de Doty e Setiner pode ser aplicada para substâncias húmicas em soluções diluídas. Consequentemente, o valor de β pode ser diretamente relacionado ao nível de agregação molecular e o aumento do seu valor indica uma maior agregação.⁴⁹

A investigação da agregação estrutural de AH é importante, pois sua estrutura influencia em suas propriedades como, por exemplo, capacidade de reagir com metais e na estabilidade da espécie AH-metal formada. Através da técnica de espectroscopia de absorção na região do visível, obtém-se a razão E_4/E_6 (razão entre as absorvâncias em 465 e 665 nm). Esse parâmetro tem sido utilizado como índice do grau de agregação molecular das substâncias húmicas. Os valores da razão E_4/E_6 são mostrados na tabela 5.

Tabela 5 – Valores da razão E_4/E_6 em diferentes valores de pH.

pH	E_4/E_6
3,01	4
5,03	6
7,05	7
9,00	7
11,03	3,5

A razão E_4/E_6 diminui com o aumento do peso molecular e com a quantidade de estruturas aromáticas. Valores mais altos da razão E_4/E_6 podem indicar também a presença de maior quantidade de estruturas alifáticas na cadeia.^{52,55,56} Aplicando a relação E_4/E_6 na fórmula de Doty e Steiner, temos:

$$\frac{-\log E_4 - \log E_6}{\log 464 - \log 665} = 4 - \beta \quad (16)$$

Rearranjando:

$$\beta = 4 - 6,435 \log(E_4 / E_6) \quad (17)$$

O valor β pode ser diretamente relacionado ao nível da condensação da estrutura macromolecular, valores mais elevados indicam conformação mais condensada da macromolécula húmica.

A Figura 9 mostra o do valor de β variando 1,5 unidades na região ácida (pH 3-7), enquanto na região alcalina (pH 7-11) a variação atingiu 1,9. Este efeito na região alcalina pode ser devido a uma redução, na solução diluída, da repulsão intra ou intermoleculares entre as cargas negativas liberadas da ionização dos grupos ácidos, conduzindo a uma estrutura mais condensada. Os valores mais baixos de β são encontrados em pH neutro, o que leva a concluir que, neste caso, o AH adota uma forma estendida, por causa das repulsões intramoleculares associadas com um aumento da carga na macromolécula.⁵⁵

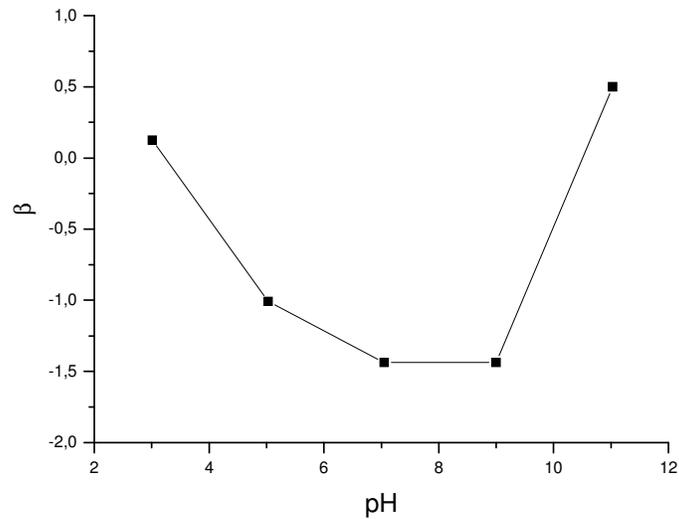


Figura 9. Influência do pH sobre o parâmetro β na solução do ácido húmico ($0,5\text{mg L}^{-1}$) e NaHCO_3 ($0,01\text{ mol L}^{-1}$).

Na Figura 9, β é elevado em pH ácido o que indica maior condensação molecular. Em pH baixo, as interações intra e intermoleculares devido às ligações do hidrogênio, forças de van der Waals e nos orbitais- π dos anéis aromáticos conjugados favorecem uma conformação mais agregada para o HA,^{1,14} como observado anteriormente nas análises de MEV. Além disso, as interações intermoleculares podem induzir a formação de dipolos com a deslocalização dos elétrons π dos anéis aromáticos, favorecendo a agregação da macromolécula húmica.^{7,55} Em pH elevado, a densidade da carga na superfície da molécula ocorre devido à ionização dos grupos ácidos. Entretanto, os contra íons na solução (Na^+) podem minimizar o potencial da carga no polieletrólito, causando uma expansão da dupla camada elétrica, resultando na repulsão e na dispersão da partícula. Nesta circunstância o AH pode assumir uma estrutura pseudomicelar. O AH tem propriedades anfífilas nas quais as moléculas têm partes hidrofóbicas (apolares) e hidrofílicas (polares), que podem induzir a formação da estrutura pseudomicelar em solução.^{7,55}

4.1.8 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido

Através da espectroscopia de ^{13}C -RMN podem ser obtidas informações específicas sobre a estrutura do AH. Na Figura 10, pode-se observar que o espectro de estado sólido do AH apresenta picos largos em cinco regiões distintas que podem ser relacionados com: i) carbono alquílico, 0–50 ppm; ii) C–O e C–N em éteres, ésteres, carboidratos e aminas, 50–85 ppm; iii) C–O em carboidratos (acetal): 85–105 ppm; iv) C aromático: 105–160 ppm; v) C carbonílicos: 160–200 ppm. As áreas relativas a estes intervalos de ressonância foram usadas para calcular o grau de hidrofobicidade (Carbono Hidrofóbico/Carbono Hidrofílico, HB/HI) do AH aplicando-se a equação 18.⁵⁷⁻⁶⁰

$$\frac{HB}{HI} = \frac{[(0 - 50) + (105 - 160)]}{[(50 - 105) + (160 - 200)]} \quad (18)$$

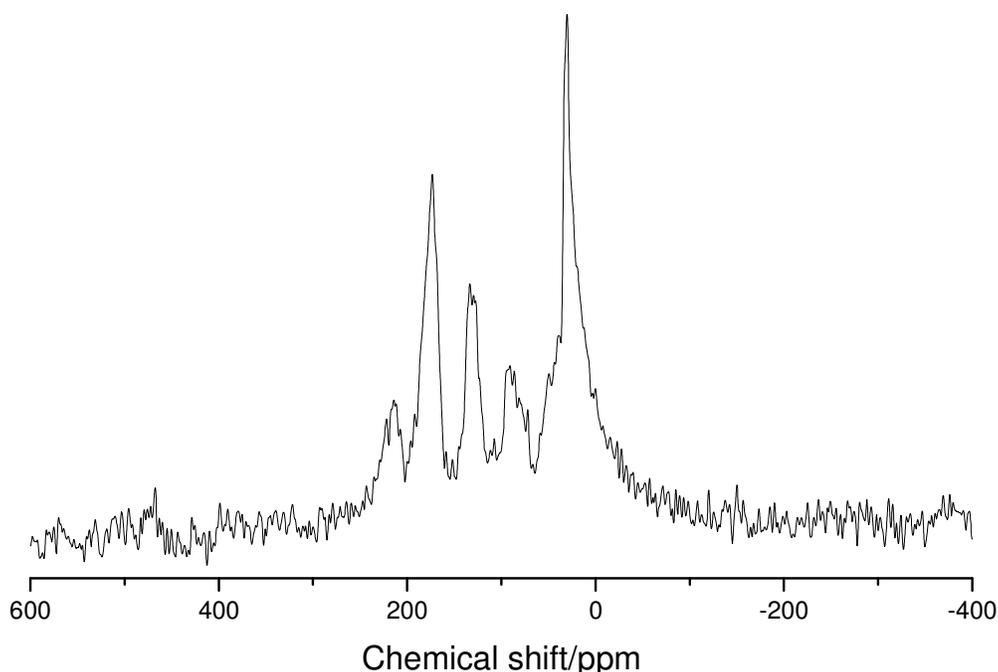


Figura 10. Espectro de ^{13}C -RMN do ácido húmico.

A distribuição de ^{13}C nos intervalos de deslocamento químico foi obtida do espectro de ^{13}C -RMN, Figura 10. A integração do espectro de RMN mostra 28,4 % do total de carbonos entre 0 e 50 ppm, 23,0 % entre 105 e 160 ppm, resultando um total de carbonos hidrofóbicos de (HB) = 51,4 %. Carbonos hidrofílicos entre 50 e 105 ppm e entre 160 e 200 ppm apresentaram, respectivamente, 25,9 e 24,7 % na integração total, resultando em um percentual de carbono hidrofílico (HI) = 48,6 %; e um grau de hidrofobicidade de (HB/HI) de 1,06. O grau de hidrofobicidade do AH utilizado neste trabalho está de acordo com os valores encontrados na literatura, os quais apresentam valores na faixa de 0,61 e 1,00.⁵⁸ Esta alta hidrofobicidade do AH está de acordo também com os valores obtidos através da relação E4/E6.^{53,55,61-63}

4.2 Estudo da densidade de carga superficial

Nos casos dos colóides suspensos em água, muitos processos, tais como a sorção iônica, interações entre partícula-partícula e a dissolução do material são resultantes da distribuição e da heterogeneidade dos sítios superficiais protonados e desprotonados.⁶⁴ A carga eletrostática formada na interface aquosa dos óxidos metálicos é gerada pelas interações dos sítios superficiais com o potencial dos íons determinantes e é parcialmente compensada pelo efeito de contra-íon. Cada reação na superfície é acompanhada por trocas de calor, que são informações valiosas para a caracterização da interface dos processos físico-químicos.⁶⁴ De acordo com o modelo de complexação da superfície, o mecanismo do carregamento da superfície será interpretado pelo modelo de 2-pk no qual o metal imerso em água é representado como uma série de sítios anfotéricos que são tratados como ácidos dipróticos. De acordo com as seguintes reações, pode-se considerar:



Onde AH é o ácido húmico na superfície sólida, K a constante de equilíbrio de cada reação, ΔH representa a entalpia para cada reação, e $\Delta\xi$ representa mudanças no caminho da cada reação.

A partir dos dados da Figura 11 (titulação do AH protonado) foram calculados o pK_1 e o pK_2 , cujos valores foram $2,03 \pm 0,13$ e $7,28 \pm 0,13$, respectivamente. O valor do pH no ponto de carga zero (pH_{PZC}) é prontamente relacionado as constantes de equilíbrio para os sítios superficiais,³⁹ e é calculado por meio da equação 22:

$$pK_1 + pK_2 = 2pH - \log \frac{[HA^-]}{[HAH^+]} \quad (22)$$

onde $[HA^-]$ é a concentração do ácido húmico desprotonado e $[HAH^+]$ é a concentração do AH protonado. No pH_{PZC} , $[HA^-] = [HAH^+]$ e a equação 22, conseqüentemente, dá o pH_{PZC} como a média do pK_1 e do pK_2 , que é igual a $4,66 \pm 0,26$.

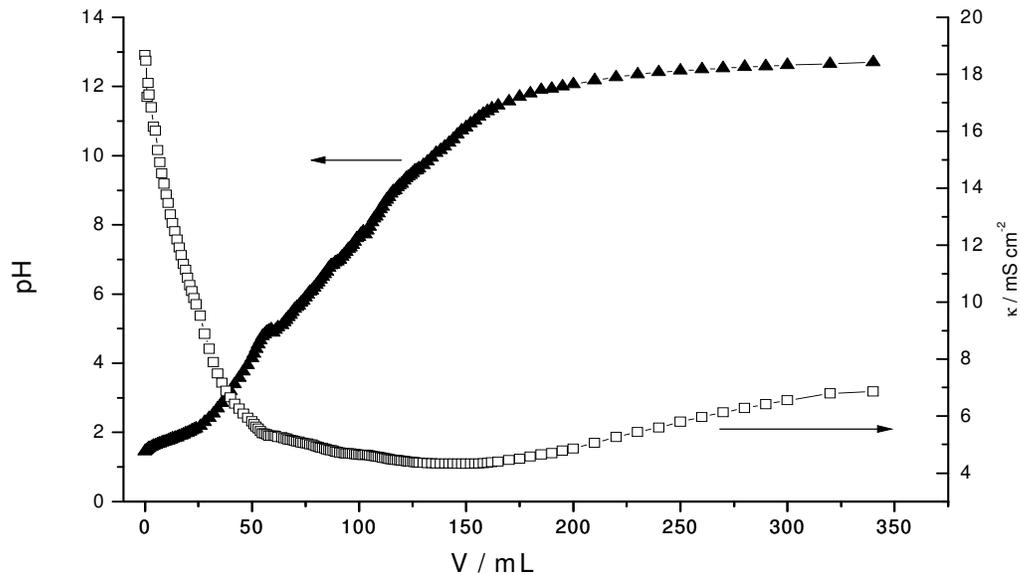


Figura 11. Titulação potenciométrica (▲) e condutimétrica (□) do ácido húmico.

A partir dos dados da Figura 11, a densidade de carga superficial em função do pH do AH foi determinada usando a equação 23:⁶⁵

$$\rho_0 = \frac{F}{A} \left(\frac{10^{-2\text{pH}} - K_1 K_2}{10^{-2\text{pH}} + K_1 \cdot 10^{-\text{pH}} + K_1 K_2} \right) N_T \quad (23)$$

Em que ρ_0 é a densidade de carga superficial, F é a constante de Faraday, A área superficial específica obtida através da isoterma de adsorção/dessorção de N_2 e N_T o número total de moles dos sítios superficiais.⁶⁵

O gráfico da Figura 12, que apresenta o gráfico da densidade de carga superficial em função do pH, possui três regiões distintas:

Região 1 - referente ao sítio ácido AHH^+ (bulk solution) onde a densidade de carga decresce drasticamente até $\text{pH} = 3,5$. A partir deste valor (*região 2*) a densidade de carga superficial se mantém praticamente constante até o $\text{pH} = 6$, correspondente aos sítios anfotéricos AH , onde a densidade mantém um valor de $\rho_0 \approx 0$. Finalmente (*região 3*), a densidade de carga superficial decresce drasticamente acima do $\text{pH} = 6$, chegando a completa desprotonação dos seus sítios ativos acima dos $\text{pH} = 9$, que caracteriza os sítios básicos A^- .

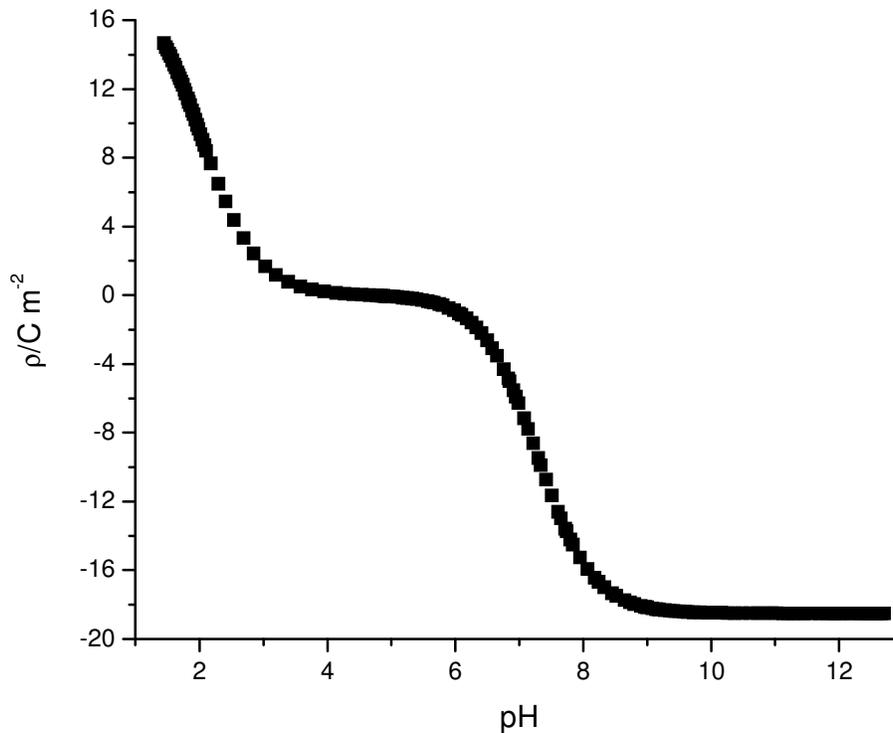


Figura 12. Variação da densidade de carga superficial (■) em função do pH.

4.3 Determinação da capacidade tampão

Devido à grande variedade de grupos funcionais, as substâncias húmicas podem ser consideradas como um agregado complexo de vários ligantes heterogêneos. Também, a distribuição de constantes de afinidade distintas pode ser usada para descrever a ligação do próton.^{66,67} A ionização dos grupos ácidos produz cargas variáveis e, conseqüentemente, gera um campo elétrico ao redor das moléculas húmicas, o que influencia diretamente na interação com íons. Portanto, o conhecimento do comportamento da interação do próton e da hidroxila com o AH é muito importante para entender suas propriedades físicas e químicas no solo e nas águas. Neste sentido, então, a interação do AH com o H⁺ e OH⁻ foi acompanhada potenciometricamente e calorimetricamente.

O valor do pH natural da suspensão deste ácido húmico foi de 5,99. O comportamento tampão deve ser analisado frente a ação de ácido e base sobre a solução tampão. Por isso, o estudo potenciométrico foi realizado em duas titulações distintas. Inicialmente, uma suspensão de AH (pH = 5,99) foi titulada com HNO₃, 0,05 mol/L, e, em seguida, outra suspensão de AH (pH = 5,99) foi titulada com NaOH, 0,05 mol/L. As curvas da titulação com ácido e com base são apresentadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

A Figura 13 mostra que a adição de ácido em pequenas quantidades em água resulta em uma imediata redução no valor do pH, como era esperado. Enquanto na presença de AH a diminuição do valor do pH é bloqueada, caracterizando o efeito tampão do AH. A Figura 14 mostra a presença de AH mantendo o valor do pH a sucessivas adições de base forte. Este comportamento indica uma ação tamponante muito melhor à presença de base.

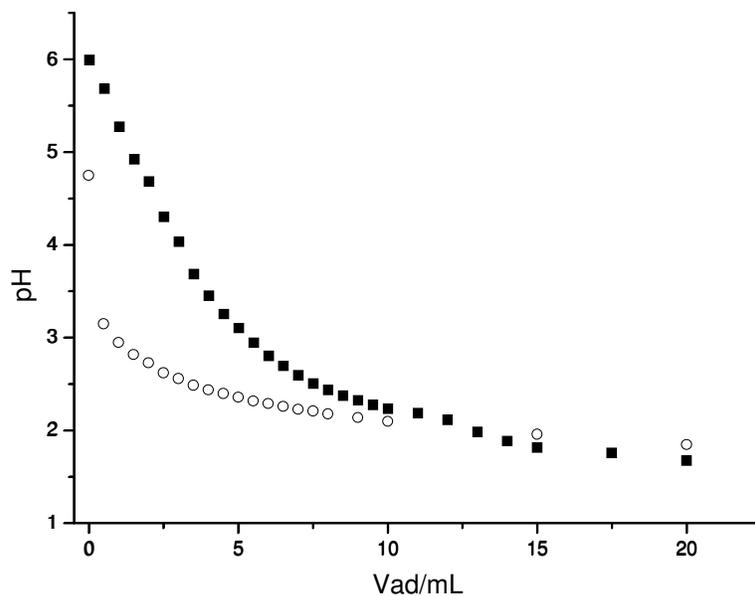


Figura 13. Curva de titulação para adição de ácido na presença (■) e na ausência (○) de ácido húmico.

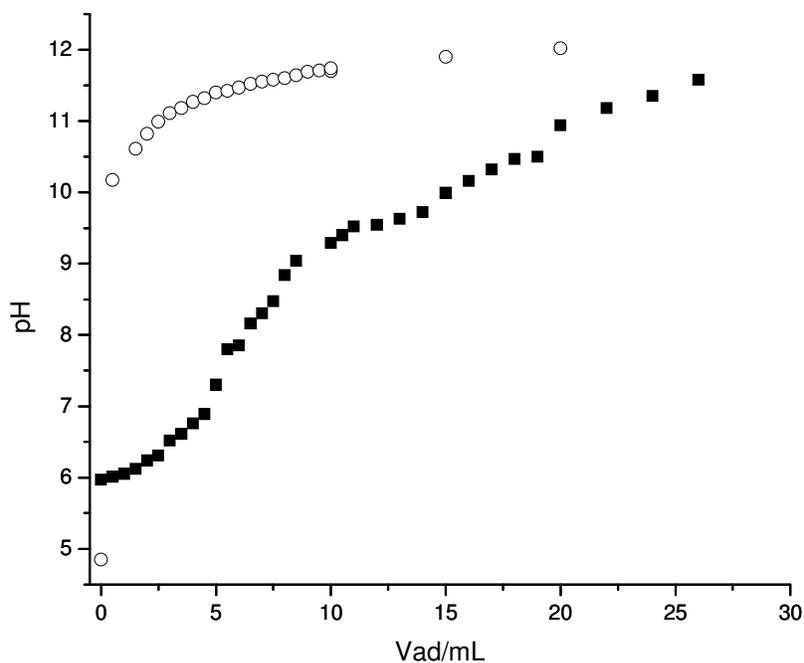


Figura 14. Curva de titulação para adição de base na presença (■) e na ausência (○) de ácido húmico.

Os valores experimentais da capacidade tampão são mostrados na Figura 15. O gráfico confirma que o ácido húmico apresenta comportamento de tampão, além disso, uma capacidade tampão muito melhor para a adição de base que para ácido. Esta figura também mostra que o AH resiste a variações bruscas de pH entre os valores 5,5 e 8,0 e perde sua ação tampão acima de pH = 8,0 ou abaixo de pH = 5,5, caracterizando um excelente capacidade tampão na região de pH fisiológico.

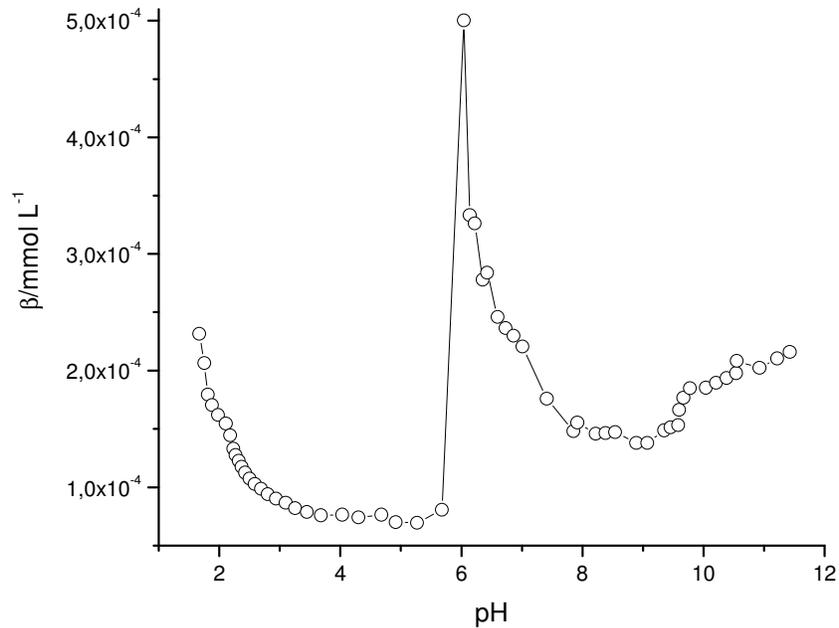


Figura 15. Capacidade tampão β do ácido húmico em função do pH.

4.4 Estudo calorimétrico da capacidade tampão

A adição de próton e hidroxila na solução aquosa de ácido húmico foi acompanhada calorimetricamente para entender o efeito tampão causado pela interação físico-química entre o AH e H⁺/OH⁻.

As interações H⁺/AH e OH⁻/AH apresentam comportamentos distintos (Figura 16). O AH é uma macromolécula com muitos sítios de adsorção ácidos e básicos. Os resultados calorimétricos sugerem que o comportamento de tampão do AH deve ser causado pela quimiossorção do OH⁻ (-38.49 kJ mol⁻¹) e pela fisiossorção do H⁺ (-402 J mol⁻¹).⁶⁸ Estes efeitos podem ser explicados pelo grande

número de grupos ácidos dispersos na estrutura macromolecular do ácido húmico. Na quimiossorção, o OH^- liga-se à superfície pela formação de ligações químicas com os grupos ácidos fracos resultando em uma entalpia muito maior que aquela para a fisiossorção do H^+ , que está baseada em interações eletrostáticas fracas entre o próton e os grupos básicos fracos sobre a superfície do AH. Além disso, o estudo calorimétrico corrobora com o resultado observado que a ação tamponante do ácido húmico é muito mais eficiente para a adição de base.

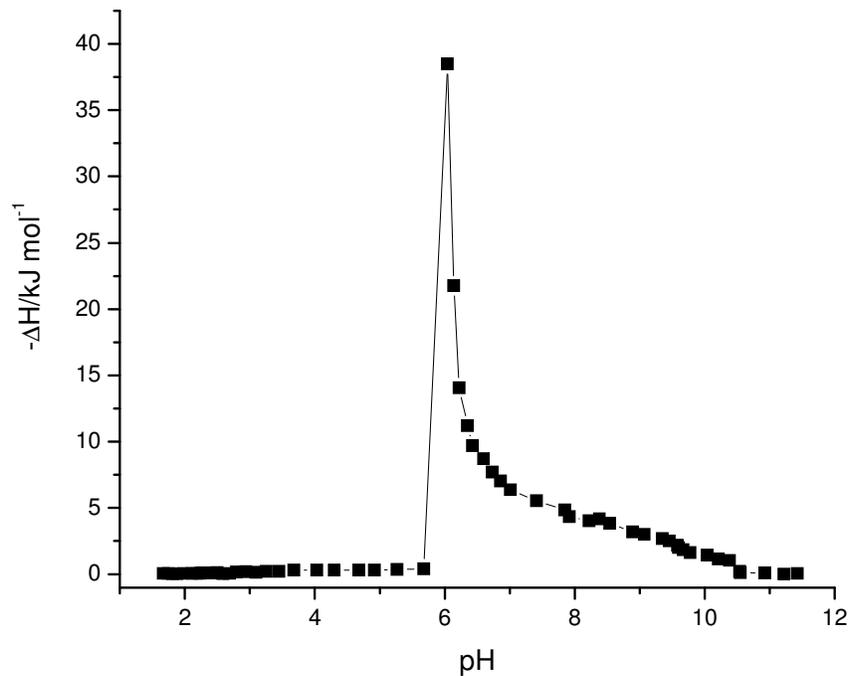


Figura 16. Entalpia para a reação de tamponamento do ácido húmico em função do pH.

Um interessante aspecto sobre a interação do AH com íons metálicos é que a reação é espontânea e endotérmica, conseqüentemente, entropicamente favorável. Este comportamento é causado tipicamente pelo efeito quelato devido ao íon metálico ser complexado por mais de um sítio ligante do AH.^{54,69} Por outro lado, a interação do AH com o próton ou com a hidroxila é espontânea e exotérmica. As Figuras 15-17 sugerem que a adição de hidroxila na suspensão de AH (em seu pH natural) desloca um próton disperso na superfície ocorrendo, assim, uma reação de neutralização. Então o valor do pH não se altera e um efeito exotérmico é observado, caracterizando a capacidade tampão. Além disso, o alto valor desta

interação ($-38,49 \text{ kJ mol}^{-1}$) corrobora com o deslocamento do próton e com a reação de neutralização dos grupos carboxílicos e fenólicos do AH (como observado nos espectros de IV e ^{13}C -RMN). As Figuras 15-18, também mostram que o próton adicionado nas titulações potenciométricas e calorimétricas deve interagir com bases de Lewis ou Bronsted formando ligações de hidrogênio. Esta proposta está de acordo com o valor termodinâmico desta interação, -402 J mol^{-1} . Mais ainda, as Figuras 15-17 mostram que o ácido húmico apresenta uma excelente capacidade tampão no intervalo de pH entre 5,5 e 8,0 que engloba o pH fisiológico. Outra observação importante é que titulação calorimétrica pode prever a região de tamponamento do ácido húmico, pois como se observa na Figura 17 o aspecto da curva calorimétrica é similar ao da curva obtida na titulação potenciométrica.

Mais um aspecto a ser destacado, é que o máximo do valor entálpico de desprotonação coincide com o início da região de superfície carregada negativamente, como mostra a Fig. 18. Isso mostra claramente que o efeito tampão está intimamente ligado às cargas superficiais do ácido húmico, bem como a quimissorção dos íons hidroxila (Figuras 17 e 18).

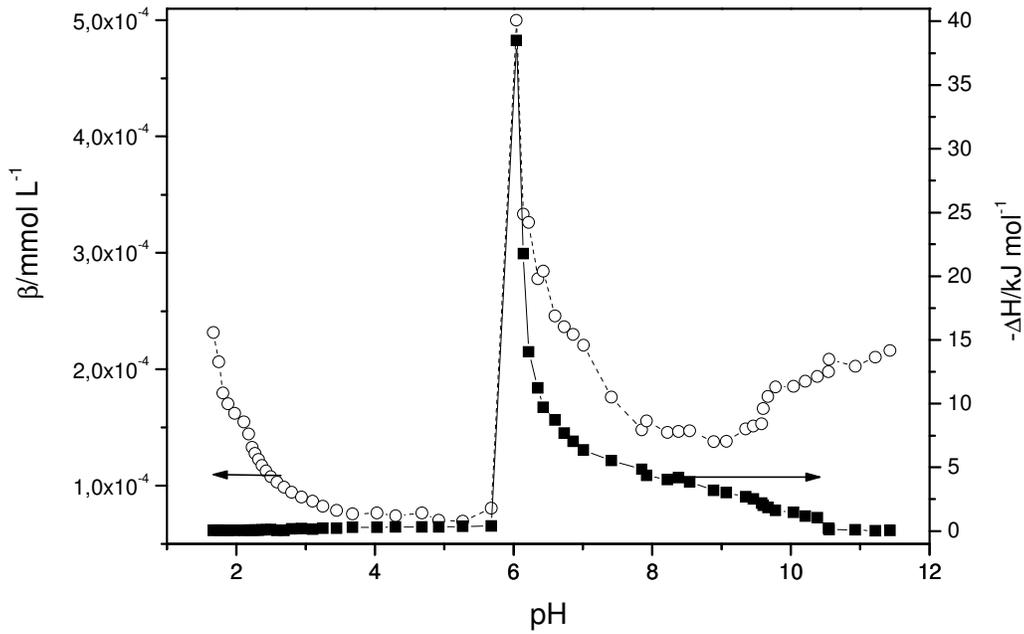


Figura 17. Capacidade tampão (\circ) e entalpia da reação de tamponamento (\blacksquare) em função do pH.

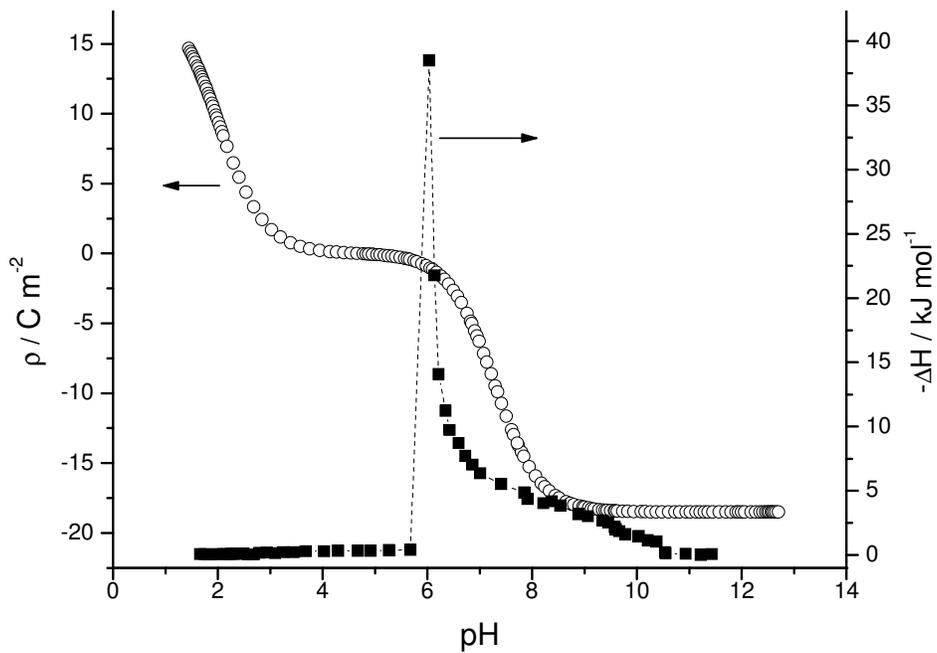


Figura 18. Variação da densidade superficial de carga (\circ) e entalpia da reação de tamponamento (\blacksquare) em função do pH.

5 Considerações Finais

Os ácidos húmicos apresentam inegável importância ao meio ambiente e apesar da sua complexidade estrutural, as similaridades (composição elementar, grupos funcionais, acidez, massa molecular) são mais significativas que as diferenças. Técnicas espectroscópicas são os métodos de caracterização de AH mais importantes, pois fornecem informações valiosas sobre a estrutura molecular e sobre as propriedades funcionais.

Substâncias húmicas atuam nos ecossistemas possibilitando efeitos benéficos a solos, sedimentos e águas naturais. Influenciam a biodisponibilidade, transporte, acúmulo, concentração e toxicidade de metais e compostos orgânicos hidrofóbicos, desempenham importante papel no desenvolvimento das plantas, são fertilizantes naturais, e auxiliam a conservação dos solos.

Este ácido húmico apresenta um grande grau de agregação em meio ácido formando estruturas supramoleculares enoveladas.

O ácido húmico apresenta uma excelente capacidade tampão, principalmente a interações com base.

Esta excelente capacidade tampão frente à base, ocorre devido à quimiossorção dos íons hidroxila pela superfície do AH

Este ácido húmico apresenta uma região neutra com densidade de carga superficial próxima de zero entre os valores de pH 3,5 e 6,0.

A quimiossorção dos íons hidroxila é evidenciada na diminuição drástica da densidade de carga superficial do AH.

6 Referências

1. MacCarthy, P.; *Soil Science* **2001**, 166, 738.
2. Klavis, M.; Eglite, L.; *Colloids Surf. A* **2002**, 203, 47.
3. Schnitzer, M.; Khan, S.U.; *Humic Substances in the Environment*; Dekker, New York, 1972.
4. Kononova, M. M.; *Soil Organic Matter*; Pergamon Press, Elmsford, 1966.
5. Stevenson, F.J.; *Humus Chemistry*, Wiley & Sons, New York, 1982.
6. Zanini, G.P.; Avena, M.J.; Fiol, S.; Arce, F.; *Chemosphere* **2006**, 63, 430.
7. Hayes, M.H.B.; Clapp, C.E.; *Soil Science* **2001**, 166 11 723.
8. Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; Cardoso, A.A.; *Introdução à Química Ambiental*; Bookman: Porto Alegre, 2004.
9. Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; *Substâncias Húmicas Aquáticas*; Editora UNESP: São Paulo, 2003.
10. Almeida R.N.H.M.; Mozeto, A.A.; Zara, L.F.; Rosa, A.H.; Rocha, J.C.; Romão, L.P.C.; Sargentini Jr, E.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 208.
11. Miretzky, P.; Bisinoti, M.C.; Jardim, W.F.; Rocha, J.C.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 438.
12. Sargentini Jr, E.; Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; Zara, L.F.; Santos, A.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 339.
13. Piccolo, A.; *Soil Science* **2001**, 166, 810.
14. Schulten, H.-R.; Schnitzer, M.; *Naturwissenschaften* **1991**, 78, 311.
15. Schulten, H.-R.; Schnitzer, M.; *Biol Fertil Soils* **1998**, 26, 1.
16. Landgraf, M.D.; Silva, S.C.; Rezende, M.O.O.; *Analytica Chimica Acta* **1998**, 368, 155.
17. Liu, A.; Gonzalez, R.D.; *Langmuir* **2000**, 16, 3902.
18. Narkis, N.; Rebhun, M.; *Am. Water Works Assoc. J.* **1975**, 67, 101.

19. Mota, A.M.; Rato, A.; Brazia, C.; Goncalves, M.L.S.; *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 1970.
20. Rocha, J.C.; Toscano, L.A.S.; Burba, P.; *Talanta* **1997**, 44, 69.
21. Romão, L.P.C.; Castro, G. R.; Rosa, A. H.; Rocha, J.C.; Padilha, P.M.; Silva, H.C; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375, 1097.
22. Prado, A.G.S.; Torres, J.D.; Martins, P.C.; Pertusatti, J.; Bolzon, L.B.; Faria, E.A.; *J. Hazard. Mat.* **2006**, 136, 585.
23. Pandey, A.K.; Pandey, S.D.; Misra, V.; *Ecotoxic. Environ. Safety* **2000**, 47, 195.
24. Pinheiro, J.P.; Mota, A.M.; Benedetti, M.F.; *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 5137.
25. Sargentini Jr, E.; Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; Zara, L.F.; Santos, A.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 339.
26. Prado, A.G.S.; Souza, S.M.; Silva, W.T.L.; Rezende, M.O.O.; *Quim. Nova* **1999**, 22, 894.
27. Kim, H.J.; Baek, K.; Kim, B.K.; Yang, J.W.; *J. Hazard. Mater.* **2005**, 122, 31.
28. Pertusatti, J.; Prado, A.G.S.; *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *in press*.
29. Guanshu, Y.; Xing, B.; *Soil Science* **2001**, 166, 107.
30. Moore, J.W.; Ramamoorthy, S.; *Heavy Metals in Natural Waters. _Aplied Monitoring and Impact assessment*, Springer-Verlag, New York, 1984.
31. Stumm, W.; *Chemistry of the Solid-Water interface: processes at the mineral-water and particle-water interface in natural systems*, John Wiley & Sons, New York, 1992.
32. Prado, A.G.S.; Airoidi, C.; *Termochim. Acta* **2003**, 405, 287.
33. Santos, A.; Bellin, I.C.; Corbi, P.P.; Cuin, A.; Rosa, A.H.; Rezende, M.O.O.; Rocha, J.C.; Melnikov, P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004** 15, 437.
34. de Wit, J.C.M.; van Riemsdijk, W.H.; Koopal, L.K.; *Environ. Sci. Technol.* **1993**, 27, 2005.
35. Plaza, C.; Senesi, N.; Polo, A.; Brunetti, G.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 7141.

36. Ceppi, S.B.; Velasco, M.I.; De Pauli, C.P.; *Talanta* **1999**, 50, 1057.
37. Campitelli, P.A.; Velasco, M.I.; Ceppi, S.B.; *Talanta* **2006**, 69, 1234.
38. Garcia-Gil, J.C.; Ceppi, S.B.; Velasco, M.I.; Pólo, A.; Senesi, N.; *Geoderma* **2004**, 121, 135.
39. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.; *Fundamentos de Química Analítica*, Thomson, São Paulo, 2005.
40. Stumm, W.; Morgan, J.J.; *Aquatic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1981.
41. Russo, S.O.; Hanania, G.I.H.; *J. Chem. Educ.* **1987**, 64, 817.
42. Chiriac, V.; Balea, G.; *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 937.
43. Prado, A.G.S.; Souza, S.M.; da Silva, W.T.L.; Rezende, M.O.O.; *Quim. Nova* **1999**, 22, 894.
44. Sargentini Jr, E.; Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; Zara, L.F.; dos Santos, A.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 339.
45. Palladino, G.; Ferri, D.; Manfredi, C.; Vasca, E.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 582, 164.
46. Ussiri, D.A.N.; Johnson, C.E.; *Geoderma* **2003**, 111, 123.
47. Kucerík, J.; Kamenárová, D.; Válková, D.; Pekar, M.; Kislinger J.; *J. Therm. Anal. Cal.*, **2006**, 84, 715.
48. Negre, M.; Vindrola, D.; Spera, S.; Ferraris, L.; Gennari, M.; *Soil Science* **2002**, 167, 636.
49. Brunauer, S.; Deming, L.S.; Deming, W.S.; Teller, E. *J. Amer. Chem. Soc* **1940**, 62, 1723.
50. Teixeira, V.G.; Coutinho, F.M.B.; Gomes, A.S.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 808.
51. Chiou, C.T.; Kile, D.E.; Rutherford, D.W.; Sheng, G.Y.; Boyd, S.A.; *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 1254.
52. Chen, Y.; Senesi, N.; Schinitzer, M.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1977**, 41, 352.
53. Chen, J.; Gu, B.; LeBoeuf, E.J.; Pan H.; Dai S.; *Chemosphere* **2002**, 48, 59.
54. Kucerik, J.; Kovar, J.; Pekar, M. J.; *Therm. Anal. Calorim.* **2004**, 76, 55.

55. Zara, L.F.; Rosa, A.H.; Toscano, I.A.; Rocha, J.C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, 17, 1014.
56. Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; Furlan, M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 51.
57. Spaccini, R.; Mbagwu, J.S.C.; Conte, P.; Piccolo, A.; *Geoderma* **2006**, 132, 9.
58. Saab, S.C.; Martin-Neto, L.; *Quím. Nova*, **2007**, 30, 260.
59. Forte, C.; Piazzzi, A.; Pizzanelli, S.; Certini, G.; *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2006**, 30, 81.
60. Malcolm, R.L.; Em, *Humic substances in soil and crop sciences*, American Society of Agronomy, Madison, 1990.
61. Griffith, S.M.; Schnitzer, M.; *Soil Sci., Soc. Amer. Proc.* **1975**, 39, 861.
62. Christman, R.F.; Gjessing, E.T.; *Use of Ultraviolet Spectroscopy, Gel Filtration, Pyrolysis/Mass Spectrometry and Numbers of Benzoate-Metabolizing Bacteria in the Study of Humification and Degradation of Aquatic Organic Matter, Aquatic and Terrestrial Humic Materials*, Ann Arbor Science, Michigan, 1983.
63. Guo, M.X.; Chorover, J.; *Soil. Sci.* **2003**, 168, 108.
64. Kallay, N.; Madic, T.; Kucej, K.; Preocanin, T.; *Colloids Surf. A* **2004**, 230, 3.
65. Campos, A. F. C.; Tourinho, F. A.; Silva, G. J.; Lara, M. C. F. L.; Depeyrot, J.; *Eur. Phys. J. E*, **2001**, 6, 29.
66. López, R.; Fiol, S.; Antelo, J.M.; Arce, F.; *Colloid Surf. A* **2003**, 226, 1.
67. Kinniburgh, D.G.; van Riensdijk, W.H.; Koopal, L.K.; Barkovec, M.; Benedetti, M.F.; Arena, M.J.; *Colloids Surf. A* **1999**, 151, 147.
68. Figueiredo, J.L.; Ribeiro, R.F.; *Catálise Heterogênea*, 1st ed., Calouste, Gulbenkian, 1978.
69. Prado, A.G.S.; Miranda, B.S.; Zara, L.F.; *J. Hazard. Mater.* **2005**, 120, 243.

Anexos

- I J. Pertusatti, A.G.S. Prado, Buffer capacity of humic acid: Thermodynamic approach, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, in press.**

- II A.G.S. Prado, J.D. Torres, P.C. Martins, J. Pertusatti, L.B. Bolzon, E.A. Faria, Studies on copper(II)- and zinc(II)-mixed ligand complexes of humic acid, *J. Hazard. Mat.* **2006**, 136, 585.**