



*Laboratório de Química
Ambiental e Geoquímica*



**UFSC - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CFM - CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
QMC - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS DE DIFERENTES AMBIENTES.
AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA EMPREGADA.**

Andreia Neves Fernandes

Florianópolis-SC
2003



*Laboratório de Química
Ambiental e Geoquímica*



**UFSC - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CFM - CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
QMC - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS DE DIFERENTES AMBIENTES.
AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA EMPREGADA.**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do grau de Mestre em Química

Andreia Neves Fernandes

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria Marta de Souza Sierra

Florianópolis-SC
2003

**DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS DE DIFERENTES AMBIENTES.
AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA EMPREGADA.**

Apresentada por

ANDREIA NEVES FERNANDES

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pela orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores:

Prof. Dr^a Maria Marta de Souza Sierra

Prof. Dr. Nito Ângelo Debacher

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Prof. Dr. José Roberto Bertolino

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
(Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química)

Florianópolis, 17 de julho de 2003.

*Aos meus pais Antonio e Cristina, por tudo,
principalmente pela educação e amor que me deram.*

AGRADECIMENTOS

A professora Dr^a Maria Marta de Souza Sierra, pelo exemplo de orientação.

Ao professor Dr. Bruno Szpoganicz, pelos materiais emprestados.

Ao Professor Carlyle Menezes por me fornecer algumas das amostras.

Ao Marcelo Giovanela por ceder algumas das amostras utilizadas e pelo apoio na execução desse trabalho.

Aos colegas dos laboratórios 216 e 214: Thalita, Rafael, Sandro, Marcelo Rosa, Fabrício, Inês, Deise, Edson, Luciana, Carlos, Eduardo, Carla, Adriana, Byung.

Aos colegas do laboratório 310: Denise, Marlon, Nicolas, Ana Paula.

Aos meus amigos: Eliandra, Lilian, Annelise, Rusiene, Fernando, Anildo, Ana Karina, Marcelo, Janaína, Fábio, Cristiano, Rodrigo, Adriana.

A meus pais e familiares, pela atenção integral, muito carinho e apoio.

Ao meu namorado Cleber.

A Deus por ter me orientado e iluminado em todas as horas.

Ao NEMAR pelo fornecimento das amostras.

A UFSC e ao Departamento de Química.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ii |
| ÍNDICE DE TABELAS | iii |
| RESUMO | iv |
| ABSTRACT | v |
| 1 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS | 01 |
| 1.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO | 01 |
| 1.2 IMPORTÂNCIA PARA O MEIO AMBIENTE | 02 |
| 1.3 COMPOSIÇÃO ELEMENTAR E ESTRUTURA | 03 |
| 1.4 REATIVIDADE DAS SH: GRUPOS FUNCIONAIS | 06 |
| 1.5 MÉTODOS DE ANÁLISES DE GRUPOS FUNCIONAIS | 08 |
| 1.5.1 Potenciometria | 09 |
| 1.5.2 Análise Química de Grupos Funcionais | 09 |
| 2 OBJETIVOS | 12 |
| 3 ÁREAS DE ESTUDO | 13 |
| 3.1 MANGUEZAL DE RATONES | 13 |
| 3.2 LAGOA DO PERI | 14 |
| 3.3 PRAIS DE UBATUMIRIM E ILHA DO MAR VIRADO | 15 |
| 3.4 TURFEIRA DO ARROIO DO SILVA | 16 |
| 4 PARTE EXPERIMENTAL | 17 |
| 4.1 REAGENTES E SOLVENTES | 17 |
| 4.2 RESINAS | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3 EQUIPAMENTOS..... | 17 |
| 4.4 AMOSTRAGEM..... | 18 |
| 4.4.1 <i>Coleta dos Sedimentos.....</i> | 18 |
| 4.4.2 <i>Preparo e Secagem dos Sedimentos.....</i> | 19 |
| 4.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS..... | 19 |
| 4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE ÁCIDO FÚLVICO E ÁCIDO HÚMICO..... | 20 |
| 4.6.1 <i>Análise Elementar.....</i> | 20 |
| 4.6.2 <i>Espectroscopia no Infravermelho.....</i> | 21 |
| 4.6.3 <i>Teor de Cinzas.....</i> | 21 |
| 4.7 ANÁLISE DE GRUPOS FUNCIONAIS..... | 21 |
| 4.7.1 <i>Determinação da Acidez Carboxílica.....</i> | 21 |
| 4.7.2 <i>Determinação da Acidez Total.....</i> | 22 |
| 4.7.3 <i>Determinação da Acidez Fenólica.....</i> | 23 |
| 4.7.4 <i>Propriedades da Mistura Modelo.....</i> | 23 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 25 |
| 5.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ESPECTRAIS..... | 25 |
| 5.1.1 <i>Análise Elementar – CHNS.....</i> | 25 |
| 5.1.2 <i>Espectroscopia no Infravermelho - IV.....</i> | 27 |
| 5.2 ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS DAS SH..... | 31 |
| 5.3 ACIDEZ DAS MISTURAS-MODELO..... | 34 |
| 5.3.1 <i>Ácidos Benzenocarboxílicos.....</i> | 34 |
| 5.3.2 <i>Peptídeos.....</i> | 37 |
| 5.3.3 <i>Misturas de Peptídeo com Ácido benzenocarboxílico.....</i> | 38 |
| 5.3.4 <i>Aspectos Cinéticos.....</i> | 41 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 43 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 45 |
| 8 BIBLIOGRAFIA..... | 48 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--|--|
| MO | matéria orgânica |
| SH | substâncias húmicas |
| DDT | 2,2-di(4-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano |
| PCBs | bifenilos policlorados |
| AF | ácido fúlvico |
| AH | ácido húmico |
| AC | acidez carboxílica |
| AT | acidez total |
| AFL | acidez fenólica |
| meq g⁻¹ | miliequivalente por grama |
| PVC | cloreto de polivinila |
| RME | Manguezal de Ratoles |
| PLN | Lagoa do Peri |
| ASP | Turfeira do Arroio do Silva |
| UBM | Praia de Ubatumirim |
| MVI | Ilha do Mar Virado |
| NEMAR | Núcleo de Estudos do Mar |
| IPAT | Instituto de Pesquisa Ambiental Tecnológica |
| IHSS | Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas |
| eq H⁺ mol⁻¹ | equivalente de H ⁺ por mol |
| IV | Infravermelho |
| T | Transmitância |
| UNESC | Universidade do Extremo Sul Catarinense |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1 – Mecanismo de formação das SH..... | 02 |
| 2 – Estrutura proposta por Schulten e Schnitzer para AH..... | 04 |
| 3 – Modelo tridimensional de uma estrutura de AH..... | 05 |
| 4 – Modelo de um “building block” de AH..... | 06 |
| 5 – Pontos de amostragem no Manguezal de Ratonés..... | 13 |
| 6 – Pontos de amostragem na Lagoa do Peri..... | 14 |
| 7 – Pontos de amostragem na região de Ubatuba (litoral paulista)..... | 15 |
| 8 – Pontos de amostragem na Turfeira do Arroio do Silva..... | 16 |
| 9 – Esquema simplificado da extração das SH..... | 20 |
| 10 – Espectros no infravermelho das AF estudados..... | 28 |
| 11 – Espectros no infravermelho dos AH estudados..... | 29 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| 1 – Composição elementar média e variação dos elementos nos AF e AH..... | 03 |
| 2 – Quantidade de grupos funcionais (meq g ⁻¹) de AF e AH..... | 10 |
| 3 – Valores de pK _a relativos a desprotonação dos dois peptídeos..... | 24 |
| 4 – Valores de pK _a relativos a desprotonação dos três ácidos benzenocarboxílicos estudados..... | 24 |
| 5 – Análise elementar e razão atômica das SH estudadas..... | 26 |
| 6 – Atribuições das principais bandas de absorção no infravermelho de SH.... | 27 |
| 7 – Quantidade de grupos funcionais das SH estudadas medidas pelo método de Schnitzer e Gupta (1965)..... | 31 |
| 8 – Valores de acidez dos três ácidos benzenocarboxílicos estudados medidos pelo método de Schnitzer e Gupta (1965)..... | 35 |
| 9 – Valores de acidez dos dois peptídeos estudados medidos pelo método de Schnitzer e Gupta (1965)..... | 37 |
| 10 – Valores de acidez das diferentes misturas com os ácidos benzenocarboxílicos e o peptídeo DL-alanil-DL-alanina, medidos pelo método de Schnitzer e Gupta (1965)..... | 39 |
| 11 – Valores de acidez a diferentes tempos para o peptídeo DL-alanil-DL-alanina sozinho e misturado com o ácido ftálico..... | 42 |

RESUMO

Grupos funcionais ácidos (carboxílicos e fenólicos) de Substâncias Húmicas – SH (ácidos fúlvicos – AF e ácidos húmicos – AH) de diferentes ambientes (estuarinos, marinhos, água doce, terrestres) foram quantificados através do método de Schnitzer e Gupta (1965). Neste método a acidez carboxílica (AC) é medida por meio da reação de uma amostra com o $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ e a acidez total (AT) pela reação com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$. A diferença entre esses dois valores é atribuída à acidez fenólica (AFL). As SH foram previamente caracterizadas por análise elementar (CHNS) e por espectroscopia no infravermelho (IV). Os resultados refletiram características que estavam de acordo com o sítio de coleta, ou seja, as amostras terrestres mostraram sinais de matéria orgânica (MO) derivada de lignina e as amostras marinhas de MO planctônica, mais proteinácea. Diferentemente dos dados de análise elementar e espectral, os resultados de AC e AFL não mostraram as tendências esperadas para cada tipo de material, com as SH aquáticas apresentando valores excessivamente altos de AFL, por exemplo. Assim, uma série de experimentos, usando compostos modelo, foi realizada para testar possíveis interferências na determinação da acidez de SH. Como modelo de SH foram utilizadas diferentes misturas contendo três ácidos benzenocarboxílicos (ácido 2,4-dihidroxibenzoico; ácido 3,5-dihidroxibenzoico; ácido ftálico) e dois peptídeos (DL-alanil-DL-alanina; glicil-L-leucina). Os resultados mostraram que, na ausência de peptídeos, grupos fenólicos com valores de pK_a muito altos não são detectados na reação com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$ e os resultados obtidos não representam a concentração real dos grupos ácidos. Para as misturas contendo peptídeo, os resultados relativos à AT, são distorcidos principalmente porque nas condições severas da reação com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ocorre a hidrólise do peptídeo, consumindo um grupo hidroxila extra, aumentando artificialmente a AFL. Tais condições não são minimizadas pela redução do tempo de reação. Assim, os valores de acidez obtidos para as amostras reais não têm um significado absoluto, mas devem ser usados somente em comparações com amostras que tenham sido analisadas pelo mesmo método.

ABSTRACT

Acidic functional groups (carboxylic and phenolic) of humic substances – HS (fulvic, FA and humic, HA acids) of distinct environments (estuarine, marine, freshwater, terrestrial) were classified by the Schnitzer e Gupta (1965) method. In this method the carboxylic acidity (CA) is measured via the reaction with the Ca-acetate and the total acidity (TA) via the reaction with the Ba-hydroxide. The difference between these two values is attributed to the phenolic acidity (PhA). The HS were previously characterized by elemental analysis (CHNS) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The results reflected characteristics that were in agreement with the collection site, with terrestrial samples showing lignine signals and marine samples showing proteinaceous organic matter signals. Differently of the data of elemental and spectral analysis the results of CA and PhA did not show the expected trends for each type of material, with aquatic HS presenting excessively high PhA values, for example. Thus, a set of experiments, using model-compounds, was carried out in order to evaluate interferences on acidity measurements of HS. As a model of HS a few different mixtures containing three benzene carboxylic acids (2,4-dihydroxybenzoic acid; 3,5-dihydroxybenzoic acid and phthalic acid) and two peptides (DL-alanyl-DL-alanine and glycil-L-leucine) were used. The results showed that, in absence of peptides, phenolic groups with high pK_a values are not detected in the $Ba(OH)_2$ reaction and the data so obtained do not represent the real concentrations of the acidic groups. For the mixtures containing peptides, the results relative to the TA are distorted, mainly because under the extreme conditions of the reaction with $Ba(OH)_2$ the hydrolysis of the peptide occurs, consuming extra hydroxyl groups and increasing artificially the PhA. Such a condition is not minimized by the reduction of the reaction time. Hence, the acidity values measured for real samples don't have absolute significance, and must be used only in comparisons among HS that had been treated in the same way.

1 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

1.1 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO

A matéria orgânica (MO) encontrada nos solos, sedimentos e águas naturais é uma mistura de compostos em diferentes estágios de decomposição, resultantes da degradação biológica de resíduos vegetais e animais bem como da atividade sintética de microorganismos.¹ Essa massa traz incorporada uma variedade imensa de microorganismos, que para sobreviverem, decompõe-na, retirando da mesma, energia e elementos que lhe são necessários tanto à sua formação e sobrevivência, quanto à sua multiplicação. E são precisamente a MO e a sua constante decomposição, que imprimem aos sistemas naturais, características químicas e biológicas de extrema importância para a vida.²

A MO pode ser dividida em dois grupos fundamentais: as substâncias não húmicas e as substâncias húmicas (SH). O primeiro é constituído pelos produtos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano. Estão presentes neste grupo as substâncias com características químicas bem definidas como os carboidratos, as proteínas, os aminoácidos, os ácidos graxos e os ácidos orgânicos de baixa massa molar, os quais são facilmente atacados pelos microorganismos. O segundo grupo é considerado como sendo o principal componente da MO em diferentes tipos de ambientes. Elas são os componentes majoritários (70%) do carbono orgânico e estão presentes em águas, solos e sedimentos.^{1, 2, 3} Essas substâncias originam-se (**Figura 1**) da degradação oxidativa e subsequente polimerização da MO animal e vegetal.⁴ Esse material consiste de misturas de macromoléculas com diferentes massas molares e grupos funcionais distintos, sendo responsáveis por inúmeros processos físicos, químicos e geoquímicos nos ambientes naturais.² Apresentam uma coloração escura, uma estrutura complexa com propriedades físicas e químicas não definidas, caráter hidrofílico, alta massa molar e alta estabilidade, isto é, sendo mais estável ao ataque pelos microorganismos.^{1, 3}

As SH são classificadas, operacionalmente, de acordo com sua solubilidade

Capítulo I - Introdução

em solução aquosa em: ácidos fúlvicos (AF), solúveis em meio ácido e básico; ácidos húmicos (AH), solúveis em meio básico e insolúveis em meio ácido e humina, insolúvel em água em qualquer faixa de pH.¹

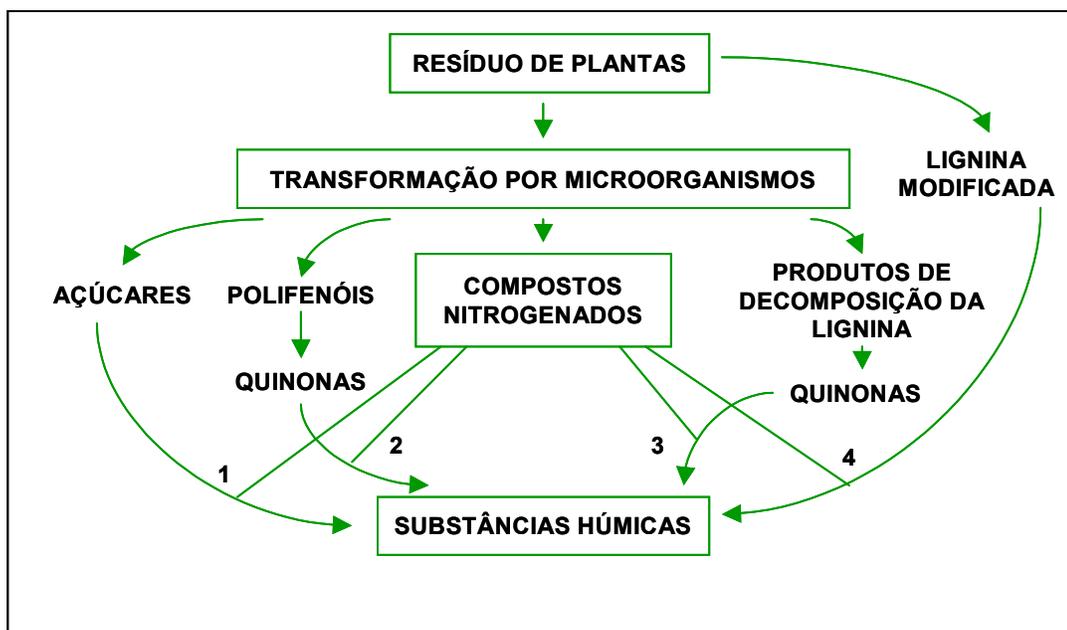


Figura 1 – Mecanismo de formação das SH.⁴

1.2 IMPORTÂNCIA PARA O MEIO AMBIENTE

As SH desempenham um papel importante no meio ambiente devido a várias características. Uma delas é ajudar na germinação de sementes, pois fazem aumentar a retenção de calor pelo solo, graças à coloração tipicamente escura que possuem. Devido à sua alta capacidade de retenção de água (até vinte vezes a sua massa) as SH evitam o escoamento sendo, portanto, importantes na conservação do solo contra a erosão.⁵ Uma outra propriedade importante das SH é a habilidade de interagir com íons metálicos para formar complexos de diferentes estabilidades e características estruturais.^{6,7}

A presença de grupos funcionais contendo oxigênio, tais como carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas, faz com que as SH assumam um comportamento

Capítulo I - Introdução

polieletrólítico e atuam como agentes tamponantes de íons metálicos.⁸ Em ambientes tipicamente aquáticos, as SH podem ainda alterar a partição dos metais passíveis de complexação, seqüestrando ou liberando estes íons para a coluna d'água. Além da complexação com metais, as SH podem ainda interagir com xenobióticos orgânicos, tais como o DDT, PCBs e outros.⁹

1.3 COMPOSIÇÃO ELEMENTAR E ESTRUTURA

A composição elementar das SH, bem como suas propriedades podem variar de acordo com a fonte de MO e local de sua formação. Fatores como a vegetação, o clima e o tipo de ambiente influenciam na humificação, determinando de certa forma as características das SH. O alto grau de alifaticidade do húmus marinho, por exemplo, é resultante da contribuição de lipídios de origem microbiana, particularmente alga; enquanto que a abundância de substituintes policarboxílicos e fenólicos tem correlação com insumo terrestre, indicando que ligninas e, provavelmente, taninos são importantes na formação de húmus em ambientes continentais.^{10, 11} A composição elementar média, bem como a variabilidade dos principais elementos em AF e AH de solos, são apresentados de forma resumida na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Composição elementar média e variação dos elementos nos AF e AH.

| Elemento | AF | | AH | |
|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Média (%) | Faixa (%) | Média (%) | Faixa (%) |
| Carbono | 45,7 | 40,7 – 50,6 | 56,0 | 53,0 – 58,7 |
| Hidrogênio | 5,4 | 3,8 – 7,0 | 3,2 | 3,0 – 6,5 |
| Nitrogênio | 2,1 | 0,9 – 3,3 | 4,7 | 0,8 – 5,5 |
| Oxigênio | 44,8 | 39,0 – 50,1 | 35,5 | 32,0 – 38,5 |
| Enxofre | 1,9 | 0,1 – 3,6 | 0,8 | 0,1 – 1,5 |

Fonte: adaptado de Schnitzer.¹²

Capítulo I - Introdução

As estruturas das SH são descritas, comumente, como tendo um certo número de unidades de ácidos orgânicos. Técnicas químicas como a degradação oxidativa são utilizadas para a investigação, sendo que a maioria dos produtos obtidos são ácidos carboxílicos, benzenocarboxílicos e ácidos fenólicos.¹⁰

Através da análise conjunta de diversas técnicas, Schulten e Schnitzer¹³ propuseram uma estrutura-modelo para AH (**Figura 2**). Esta estrutura consiste de um extenso esqueleto de carbono com átomos de O, H e N presentes nas proporções indicadas por dados analíticos. O oxigênio está presente na forma de carboxilas, hidroxilas fenólicas e alcoólicas, carbonilas, éster, éter e em anéis de cinco membros. Contudo, a exata combinação molecular e estrutural desses compostos dinâmicos é ainda objeto de discussão. Muito pouco se conhece, por exemplo, sobre a interação entre os grupamentos funcionais.

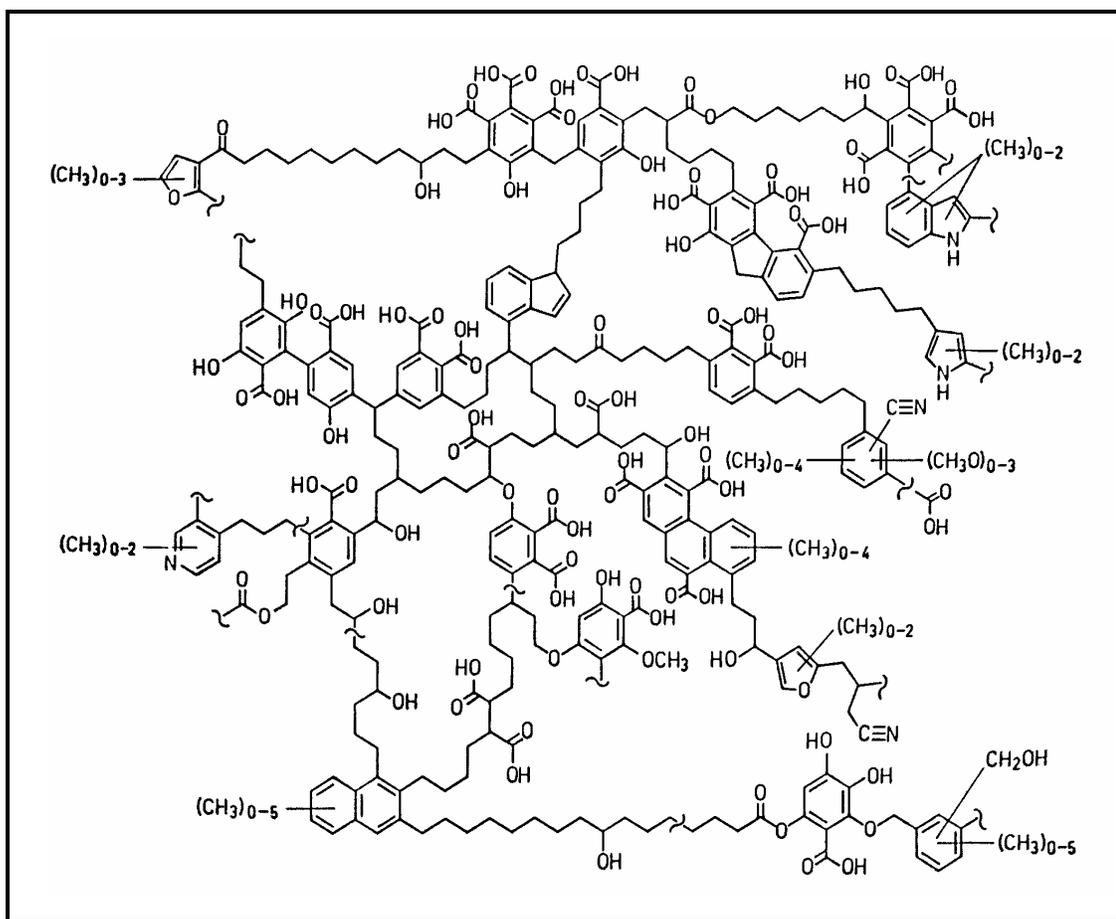
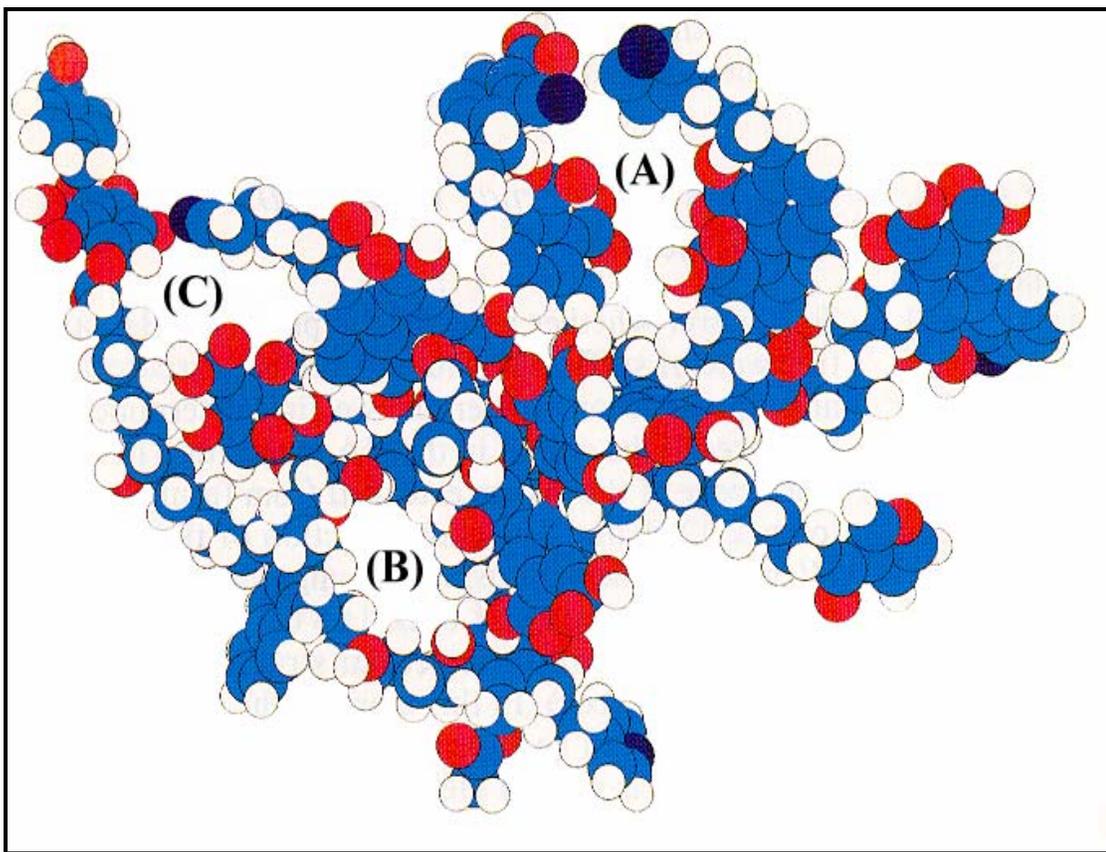


Figura 2 – Estrutura proposta por Schulten e Schnitzer para AH.¹³

Capítulo I - Introdução

Em 1997, estes mesmos pesquisadores apresentaram um modelo de estrutura tridimensional (**Figura 3**).¹⁴ Neste modelo é possível observar a presença de cavidades de diferentes tamanhos, onde poderiam se alojar outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, como carboidratos e proteínas, lipídios, agrotóxicos e outros poluentes. Poderiam também estar presentes elementos inorgânicos, como argilas, óxidos-hidróxidos e metais.



●carbono; ●oxigênio; ●nitrogênio; ●hidrogênio. As letras A, B e C indicam as cavidades presentes no modelo estrutural de AH.

Figura 3 – Modelo tridimensional de uma estrutura de AH.¹⁴

Estudos mais recentes, entretanto, têm levado a acreditar que as SH consistem de agregados de moléculas menores apresentando uma espécie de "fórmula unitária média universal" (**Figura 4**).¹⁵ A incidência de unidades de carbono do tipo C-6+3 nestas estruturas é uma consequência do trabalho de Steelink¹⁶ em

Capítulo I - Introdução

um estudo detalhado sobre as características elementares de AH de solo. Assim, as misturas húmicas, contrariamente aos modelos postulados anteriormente, podem ser formadas por agregados de estruturas menores chamados "building blocks"¹⁵, como àquele mostrado na **Figura 4**, interligado por interações supramoleculares.

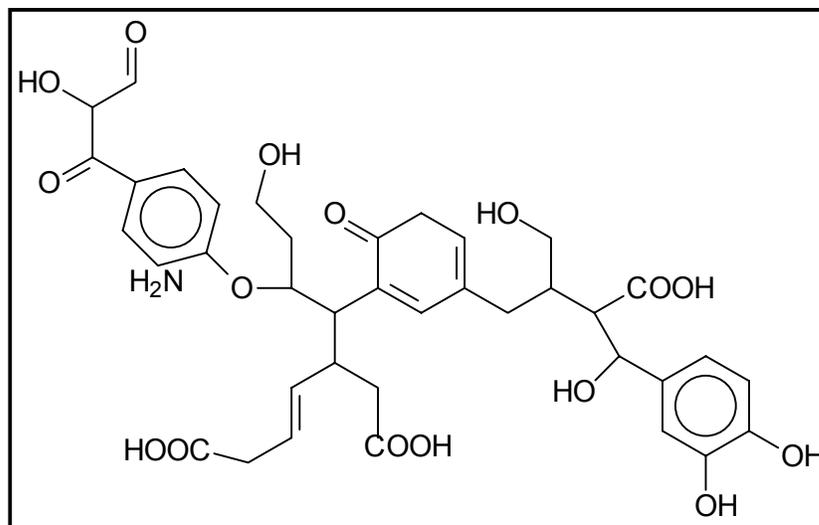


Figura 4 – Modelo para um "building block" de AH.¹⁵

1.4 REATIVIDADE DAS SH: GRUPOS FUNCIONAIS

As substâncias adicionadas aos solos, sedimentos e águas naturais, produtos da decomposição dos resíduos orgânicos, ou agroquímicos, como herbicidas, fungicidas e inseticidas, interagem com a MO destes ambientes. A dinâmica e os mecanismos das interações entre SH e as substâncias adicionadas ao solo dependem das propriedades físico-químicas dos primeiros; tais como: caráter ácido, básico ou neutro; solubilidade; polaridade; distribuição de cargas; dimensão, forma e configuração molecular; características físico-químicas, estruturais e funcionais. Além destas, as interações são também influenciadas pelas condições do sistema, como pH, temperatura, potencial redox, umidade e força iônica.¹⁷

De qualquer modo, todos os trabalhos realizados neste sentido têm sido unânimes em concluir que uma avaliação precisa da persistência e dos efeitos dos

Capítulo I - Introdução

xenobióticos orgânicos e/ou metálicos nos ambientes aquáticos passa necessariamente pela compreensão do mecanismo de suas interações com as SH.

A principal dificuldade em estudar as interações SH-metal, está no fato de as SH representarem uma mistura de moléculas distintas contendo um diferente número de sítios de variadas forças. Sabe-se que cada grupo presente pode complexar com um íon metálico definido. Sítios em material húmico contendo ligante doador O “duro” tal como os grupos carboxílicos, por exemplo, interagem preferencialmente com metais mais “duros” tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , enquanto que sítios com ligantes doadores N e S “moles” reagem com íons “moles” como Au^+ , Cu^+ e Fe^{2+} .¹⁸ É possível, então, que de acordo com suas características funcionais uma SH seja mais seletiva em relação a um determinado metal do que a outro. O tipo e a concentração desses sítios são, em geral, dependentes da origem de MO, do grau de humificação e das condições ambientais sob as quais as SH foram geradas.¹⁰ De qualquer modo, o conhecimento dos equilíbrios ácido-base das SH fornece informações importantes no que concerne a discussão da complexação desses compostos tanto com metais como com poluentes orgânicos, na natureza.¹⁹

As interações SH-metal acontecem através de adsorção na superfície, reações de troca catiônica e pelo fenômeno de quelação. As reações de quelação são as mais importantes, pois afetam profundamente a geoquímica dos íons metálicos. Estas reações alteram a solubilidade, mudam a valência e afetam o potencial redox dos metais, influenciando em sua biodisponibilidade, transporte e migração no ambiente.

Diferentes técnicas têm sido empregadas para estudar as interações SH-metal, tanto no que concerne a modelização com AF padrão, como com amostras naturais de águas e sedimentos. Não há ainda um consenso sobre o qual seria a metodologia mais adequada, mas é evidente que para realizar uma avaliação qualitativa e quantitativa das interações SH-metal, é necessário, numa primeira instância, conhecer as propriedades ácido-base e o número médio de sítios disponíveis por unidade estrutural destes compostos.

A capacidade tamponante de solos, sedimentos e águas naturais pode ser atribuída à presença dos grupos funcionais nas moléculas húmicas. As propriedades

Capítulo I - Introdução

hidrofílicas e hidrofóbicas das SH são devidas à natureza e à concentração desses grupos funcionais. Os principais grupos encontrados são carboxílicos alifáticos e aromáticos, hidroxilas alcoólicas e fenólicas, grupos amino, quinonas, carbonilas e metoxilas. Sendo que as hidroxilas fenólicas e os grupos carboxílicos são os mais significativos, sendo os últimos os mais reativos. Sua concentração depende de vários fatores, como origem da MO, grau de humificação, massa molar e parâmetros ambientais.

SH de ambientes aquáticos, em geral, apresentam mais grupos carboxílicos, enquanto o material de origem terrestre é mais rico em grupos fenólicos.¹⁰ A concentração de grupos funcionais também aumenta à medida que a massa molar das SH decresce.¹⁰

1.5 MÉTODOS DE ANÁLISES DE GRUPOS FUNCIONAIS

Devido à complexidade das SH, os valores de acidez podem variar muito de uma amostra para outra. A ausência de uma estrutura definida, a variedade de métodos de isolamento e extração, bem como a ausência de um método específico susceptível somente para estas substâncias têm dificultado bastante a avaliação das propriedades das SH. Por isto, resultados obtidos por métodos dependentes da troca iônica ou pelos valores de pK_a devem ser interpretados com cautela.

Ácidos policarboxílicos, por exemplo, exibem uma série de constantes de dissociação que diminuem com a sucessiva dissociação dos prótons. Por outro lado, grupos fenólicos substituídos são freqüentemente mais fortemente dissociados do que qualquer composto não substituído.⁴ Alguns grupos podem não ser reativos devido a ligações de hidrogênio ou por impedimento estérico. Outros problemas na determinação quantitativa de grupos funcionais incluem a insolubilidade do material (especialmente os AH) em água e solventes orgânicos, oxidação, redução, interações com reagentes usados formando derivados, e a natureza não estereoquímica das reações.⁴

Atualmente vários métodos estão sendo utilizados para a determinação das propriedades ácidas e complexantes das SH^{20, 21}, como o método de titulação direta^{22, 23, 24}, e titulação indireta^{24, 25, 26}, entre outros.

Capítulo I - Introdução

1.5.1 Potenciometria

A titulação potenciométrica tem sido uma técnica muito utilizada para o estudo das características ácidas ligantes, bem como para os estudos de medidas de parâmetros de equilíbrio de complexos metálicos em solução. Neste tipo de titulação adiciona-se, em incrementos conhecidos, uma base padronizada a um sistema contendo ligante, quer na ausência ou na presença de íon metálico.

Através dos valores das constantes de estabilidade ou das constantes de equilíbrio de formação de complexos metálicos é possível verificar a tendência de complexação de um determinado ligante por um íon metálico em solução. Para o caso de estruturas complexas como as SH, consideradas ligantes multidentados, geralmente utilizam-se misturas de moléculas-modelo para avaliar o grau de confiabilidade do método utilizado.

Titulações potenciométricas têm sido empregadas para avaliar a acidez de SH^{21, 23, 24}, entretanto, a falta de pontos nítidos de inflexão nas curvas de titulação e a sobreposição de uma imensa gama de valores de pK_a dos grupos ácidos, dificultam uma quantificação precisa das diferentes contribuições dos grupos carboxílicos e fenólicos, nestes trabalhos. Além dessas fontes de imprecisão, em geral, o pH das soluções tende a baixar a cada adição de base, principalmente na faixa de pH alcalino, sugerindo a ocorrência de reações laterais geradoras de grupos ácidos.^{23, 27, 28}

Os dados potenciométricos podem ser tratados de diversas maneiras. Entre estes existe o método de Gran modificado²⁹, que é baseado na linearização da curva de titulação, e foi adotado por alguns autores para avaliar as características ácidas das SH^{20, 30}, assim como métodos de ajuste não linear das curvas de titulação.^{21, 24, 31}

1.5.2 Análise Química de Grupos Funcionais

Dentre os métodos classicamente utilizados para determinar a acidez das SH encontra-se aquele desenvolvido por Schnitzer e Gupta³² o qual emprega reações de troca iônica, com (CH₃COO)₂Ca, para determinar a acidez carboxílica (AC) e com Ba(OH)₂, para determinar a acidez total (AT). A diferença entre esses dois valores é

Capítulo I - Introdução

então atribuída à acidez fenólica (AFL).

Tabela 2 – Quantidade de grupos funcionais (meq g⁻¹) de AF e AH.

| Ambiente | Método | AC | AFL |
|-------------------------|--|-------------|-------------|
| ÁCIDOS FÚLVICOS | | | |
| Solo ³² | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 6,1 – 9,1 | 12,4 – 14,2 |
| Solo ³⁵ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 2,2 – 6,9 | 1,1 – 6,9 |
| Solo ²⁵ | Titulação direta | 14,1 | 0,7 |
| Sedimento ³⁶ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 3,2 – 4,5 | 1,0 – 1,9 |
| Sedimento ²⁴ | Titulação direta | 1,8 – 2,7 | 3,2 – 5,2 |
| Sedimento ²⁴ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 2,0 – 6,6 | 4,6 – 7,4 |
| Turfa ²⁵ | Titulação direta | 14,2 – 16,2 | 0,7 – 1,3 |
| Marinha ²¹ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 4,4 – 8,9 | 0,9 – 4,5 |
| Marinha ²³ | Titulação direta | 4,7 – 5,6 | - |
| Marinha ²⁵ | Titulação direta | 12,0 – 12,9 | 1,4 – 1,6 |
| Água doce ²⁵ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 4,6 – 10,1 | 0,9 – 3,4 |
| ÁCIDOS HÚMICOS | | | |
| Solo ³² | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 2,2 – 3,0 | 5,7 – 8,9 |
| Solo ³⁷ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 4,0 – 5,5 | 2,7 – 5,3 |
| Solo ²⁵ | Titulação direta | 8,1 – 8,9 | 0,8 – 1,1 |
| Sedimento ²¹ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 1,8 – 3,9 | 0,9 – 1,9 |
| Sedimento ²⁴ | Titulação direta | 2,7 – 3,2 | 4,6 – 4,8 |
| Sedimento ²⁴ | Ba(OH) ₂ /(CH ₃ COO) ₂ Ca | 2,7 – 4,8 | 4,6 – 6,1 |
| Turfa ²⁵ | Titulação direta | 9,5 – 9,6 | 0,9 – 1,0 |
| Marinha ²⁵ | Titulação direta | 10,7 | 2,3 |

A grande vantagem deste método é a simplicidade. Entretanto, algumas desvantagens têm sido citadas. A determinação da AC é reprodutível e não exige maior cuidado, porém a determinação da AT não é reprodutível podendo resultar em valores muito altos. Como esta reação não é específica, outros grupos além dos carboxílicos e fenólicos podem interferir no cálculo de AFL. Schnitzer e Gupta³² sugeriram, inclusive, que se colocasse a palavra “fenólico” entre aspas sempre que

Capítulo I - Introdução

esse método fosse usado para quantificar grupos fenólicos em SH. Outras limitações desse método têm sido periodicamente discutidas.^{24, 26, 33, 34}

A **Tabela 2** mostra alguns dados relativos à quantificação de grupos funcionais, por diferentes métodos, de amostras de AF e AH de diferentes ambientes. As vantagens e desvantagens dos diferentes métodos têm sido apontadas em inúmeros trabalhos.^{21, 24, 26, 32, 33, 34} Apesar das limitações já citadas sobre o método de Schnitzer e Gupta^{21, 24, 32, 35}, entre os trabalhos publicados até o presente este tem sido o método mais utilizado. Por esta razão, no presente trabalho utilizou-se esta mesma técnica, de modo a poder comparar os dados obtidos com aqueles encontrados na literatura.

Capítulo II – Objetivos

2 OBJETIVOS

O presente trabalho foi realizado em duas etapas. Os resultados obtidos na primeira etapa de trabalho geraram algumas dúvidas com respeito a validade da metodologia empregada e das possíveis interferências ocasionadas pelas características das amostras. Assim, numa segunda etapa de trabalho, os objetivos se direcionaram em investigar as causas destas interferências.

→ Extrair e purificar SH (AF e AH) sedimentares provenientes do Manguezal de Ratores (litoral catarinense), Lagoa do Peri (litoral catarinense), Praia de Ubatumirim (litoral paulista), Ilha do Mar Virado (litoral paulista) e Turfeira do Arroio do Silva (litoral catarinense). Parte das amostras foram extraídas e purificadas por Marcelo Giovanela.

→ Analisar as características estruturais das SH através de análise elementar (CHNS) e espectrais, por Espectroscopia no Infravermelho.

→ Avaliar as características ácido-base (acidez total, carboxílica e fenólica), das SH extraídas por meio do método de Schnitzer e Gupta.³²

→ Testar a reprodutibilidade e exatidão do método de Schnitzer e Gupta³² usualmente empregado para medir a acidez de SH, por meio de uma mistura de compostos com propriedades ácido-base conhecidas e que simulem as características funcionais das SH. Estes compostos incluem três ácidos benzenocarboxílicos (ácido 2,4-dihidroxibenzoico; ácido 3,5-dihidroxibenzoico; ácido ftálico) e dois peptídeos (DL-alanil-DL-alanina; glicil-L-leucina).

3 ÁREAS DE ESTUDO

3.1 MANGUEZAL DE RATONES

O Manguezal do Rio Ratonés (Figura 5) localiza-se ao norte da Ilha de Santa Catarina. É o manguezal mais preservado e mais heterogêneo da Ilha, apesar de ter perdido perto de 50% da sua área original. Atualmente seus 6,25 km² de área fazem parte da Estação Ecológica dos Carijós e os principais rios que o atravessam são, em ordem de importância, Rio Ratonés e o Rio Veríssimo.

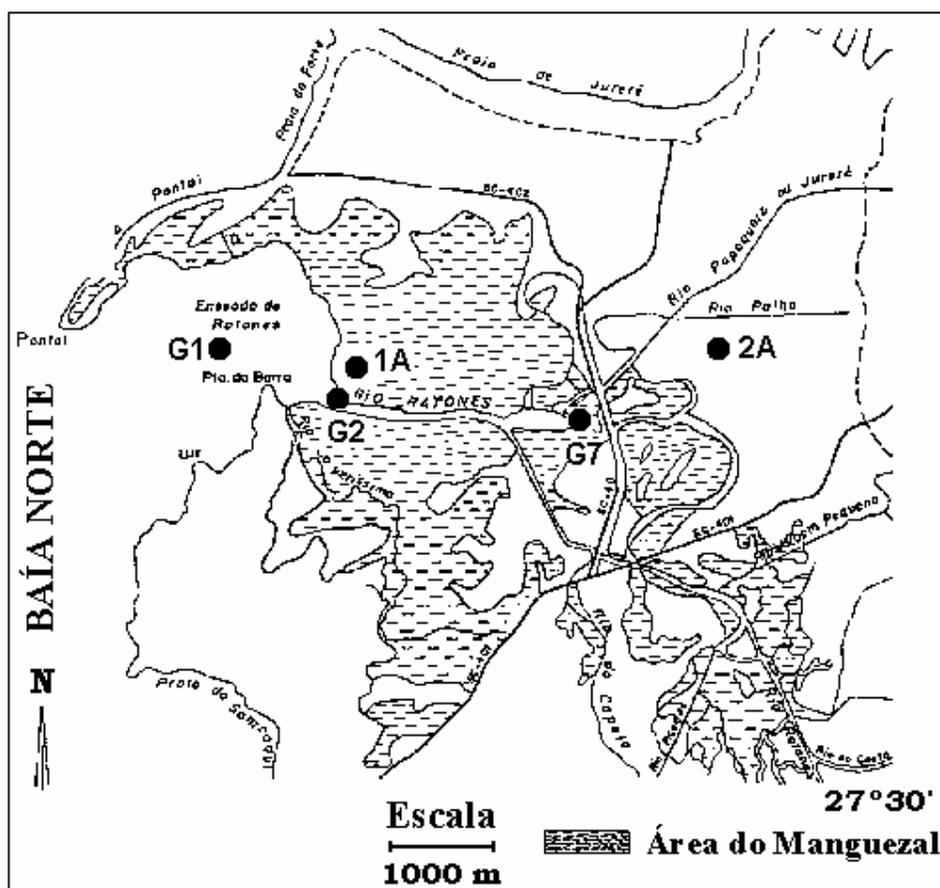


Figura 5 – Pontos de amostragem no Manguezal de Ratonés.

Capítulo III – Áreas de Estudo

3.2 LAGOA DO PERI

A Lagoa do Peri (**Figura 6**) está situada ao sul da Ilha de Santa Catarina e ocupa uma área de aproximadamente 5,1 km².³⁸ Estando a superfície da lagoa ligeiramente acima do nível do oceano, suas águas não são afetadas pelas oscilações da maré.³⁹

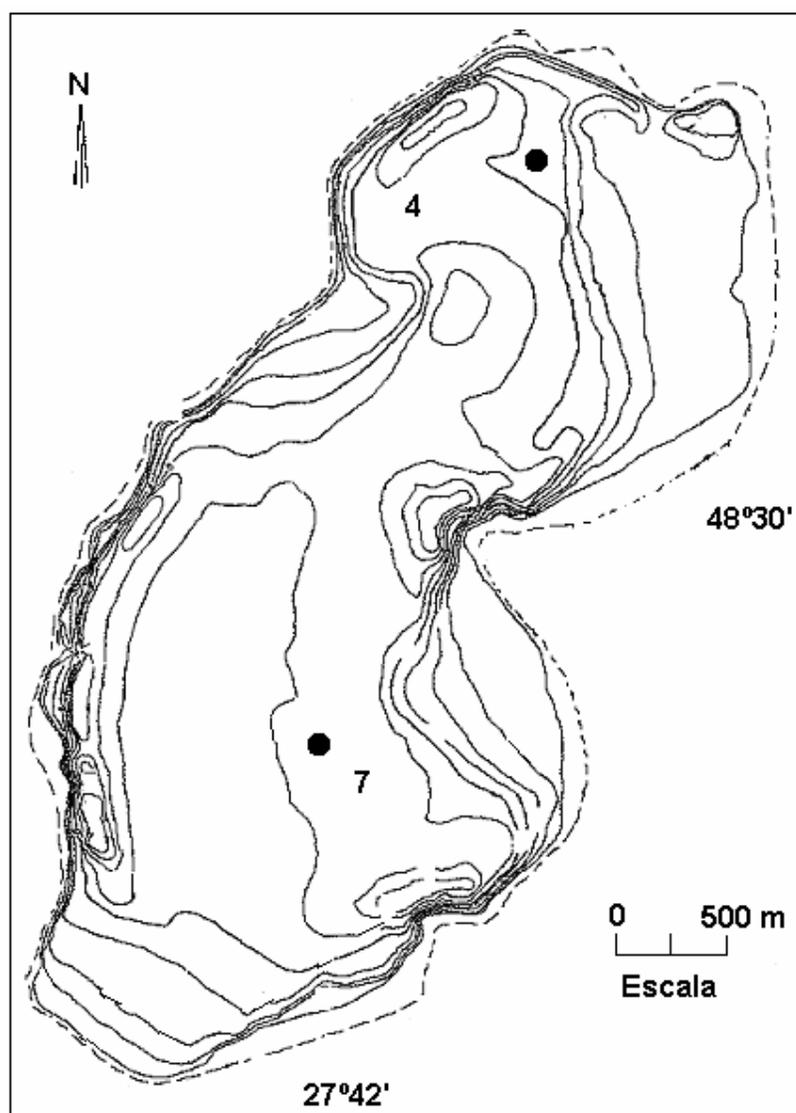


Figura 6 – Pontos de amostragem na Lagoa do Peri.

Capítulo III – Áreas de Estudo

3.4 TURFEIRA DO ARROIO DO SILVA

A turfa é uma mistura do material formado pela decomposição de restos vegetais e de material mineral acumulado no fundo de lagoas e depressões alagadas nas áreas ribeirinhas. Sob estas condições, o depósito de MO pode alcançar espessuras de vários metros e ocupar grandes áreas, constituindo a turfeira. Essas são formações geológicas recentes, desenvolvidas nos últimos 10 mil anos. Mais de 90% delas estão localizadas nas regiões temperadas e frias. No Brasil, são encontradas no litoral e em planícies alagadiças de rios, com reservas situadas na planície costeira dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A turfeira do Arroio do Silva (Figura 8) situa-se no município de Balneário Arroio do Silva, em Santa Catarina, e possui uma área de aproximadamente 40 km². Possui vários tipos de turfas, estando essas classificadas de acordo com seus diferentes graus de decomposição.



Figura 8 – Pontos de amostragem na Turfeira do Arroio do Silva.

Capítulo IV – Parte Experimental

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico. O ácido clorídrico, ácido fluorídrico, hidróxido de sódio e nitrato de prata foram adquiridos da Carlo Erba Reagenti. Acetato de cálcio e hidróxido de bário da Synth e o AH de origem terrigênica, assim como os ácidos benzenocarboxílicos: ácido 3,5-dihidroxibenzóico, ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido ftálico e os peptídeos: DL-alanil-DL-alanina, glicil-L-leucina foram da Aldrich.

Os solventes de grau analítico etanol e metanol foram adquiridos da Vetec Química LTDA. As soluções tampão com valores de pH igual a 4 e 7 foram adquiridas da Carlo Erba Reagenti.

A água utilizada foi bidestilada, fervida e descarboxilada.

4.2 RESINAS

A resina de troca iônica Amberlite[®] 200 foi adquirida da Supelco Inc. e previamente purificada, segundo a metodologia proposta por Collins *et al.*⁴⁰

A resina Supelite[™] DAX-8 foi adquirida da Supelco Inc. e previamente purificada, segundo a metodologia proposta por Thurman e Malcolm.⁴¹

4.3 EQUIPAMENTOS

Utilizou-se um agitador mecânico modelo MQAME 1000-MP da marca Microquímica, agitadores magnéticos modelos MQAMA 301 da Microquímica, Liofilizador Edwards, rotaevaporador de marca Fisatom e pHmetro modelo TEC-2 de marca Tecnal.

Capítulo IV – Parte Experimental

4.4 AMOSTRAGEM

4.4.1 Coleta dos Sedimentos

Manguezal de Ratoles

As amostras RME G1, RME G2 e RME 1A estão localizadas em uma zona inundada periodicamente por águas marinhas, e as amostras RME G7 e RME 2A estão localizadas em uma região que raramente recebe aporte marinho (**Figura 5**). As duas primeiras amostras foram coletadas por um mergulhador autônomo, através de testemunhos de PVC (um para cada estação). A amostra G7 foi coletada com uma espátula de teflon, por raspagem da superfície do solo. As amostras 1A e 2A foram coletadas por meio de tubos de PVC, na forma de testemunhos. Essas amostras correspondem à parte superior dos testemunhos (0 – 10 cm). Após a coleta as amostras de sedimento foram, armazenadas em uma câmara refrigerada e encaminhadas para o laboratório, onde foram processadas e preparadas para o processo de extração.

Lagoa do Peri

Os sedimentos de fundo da lagoa (**Figura 6**) foram coletados por mergulhadores em duas estações pré-definidas (PLN 4 e PLN 7).

Praia de Ubatumirim e Ilha do Mar Virado

As amostras de fundo da Praia de Ubatumirim (UBM) e da Ilha do Mar Virado (MVI) foram coletadas em duas estações pré-definidas e estão localizadas nas águas circundantes (**Figura 7**).

Turfeira do Arroio do Silva

As amostras de turfa (**Figura 8**) foram classificadas de acordo com seu grau de decomposição. Sendo aquela com o maior grau de decomposição designada como turfa decomposta (ASP D) e a outra com turfa fibrosa (ASP F), esta contendo um teor de decomposição um pouco abaixo do que a anterior. As amostras foram coletadas com uma espátula de teflon, por raspagem da superfície do solo.

Capítulo IV – Parte Experimental

Imediatamente após a coleta, todas as amostras de sedimentos foram armazenados em uma câmara refrigerada e encaminhados para o laboratório, onde foram processados e preparados para o processo de extração.

4.4.2 Preparo e Secagem dos Sedimentos

As amostras de sedimentos foram processadas no Laboratório de Sedimentologia do Núcleo de Estudos do Mar (NEMAR). As amostras de turfa foram processadas no laboratório do Instituto de Pesquisa Ambiental Tecnológica (IPAT). Todas as amostras de sedimento e turfa foram lavadas para a retirada de sais solúveis, secas em estufa, a temperaturas inferiores a 60°C. Em seguida foram desagregadas em almofariz de porcelana e pistilo, logo após, quarteadas manualmente para se obter uma fração representativa da amostra. Com os sedimentos procedeu-se a separação, por via úmida, dos sedimentos grosseiros e finos, utilizando-se uma peneira com abertura de 0,062 mm.

4.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As SH foram extraídas e purificadas a partir das amostras secas conforme protocolo recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). O fluxograma da **Figura 9** mostra de maneira simplificada, as etapas envolvidas no processo de extração das SH deste trabalho.

O AH Aldrich foi usado como representante de AH de solo. As análises foram feitas tanto com a amostra comercial como com a amostra submetida a um processo de purificação idêntico àquele aplicado aos AH extraídos no presente trabalho (**Figura 9**). O processo de purificação do AH Aldrich inicia-se a partir da etapa em que a solução de HCl – HF deve ser adicionada.

Capítulo IV – Parte Experimental

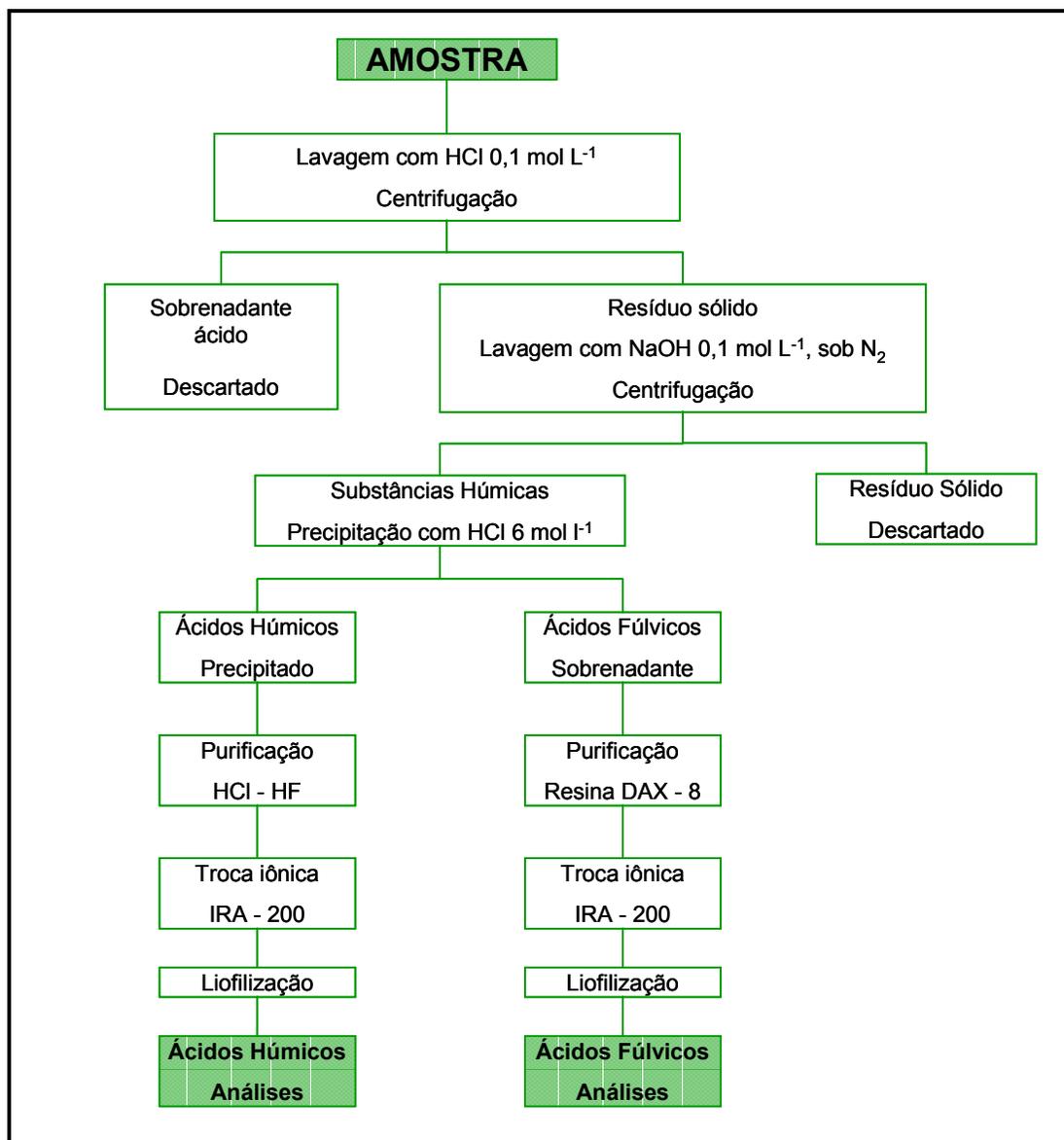


Figura 9 – Esquema simplificado da extração das SH.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE ÁCIDO FÚLVICO E HÚMICO

4.6.1 Análise elementar

A composição elementar dos AF e AH foi determinada usando um Analisador Elementar CHNS Carlo Erba 1100, da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

Capítulo IV – Parte Experimental

4.6.2 Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no Infravermelho (~ 2 mg da fração em pastilha de KBr) foram registrados em um espectrofotômetro FTIR da Perkin Elmer modelo 16 PC, da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

4.6.2 Teor de Cinzas

O teor de cinzas das frações de AF e AH foi obtido gravimetricamente, através da calcinação de aproximadamente 10 mg do material liofilizado a 750°C, em uma mufla QUIMIS, por um período de 4 horas.

4.7 ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS

4.7.1 Determinação da Acidez Carboxílica

A determinação de grupos carboxila foi feita através do método proposto por Schnitzer e Gupta³², que envolve a reação:



Onde o ácido acético liberado é quantificado, por titulação com uma solução básica padrão.

Inicialmente pesou-se uma amostra (10 mg para cada composto individual e 10 mg para cada composto, no caso das misturas; 10 mg para cada amostra de AF ou AH), que foi colocada em um erlenmeyer juntamente com 10 mL de solução de 0,2 mol L⁻¹ de (CH₃COO)₂Ca. Simultaneamente, um branco com 10 mL de solução de 0,2 mol L⁻¹ de (CH₃COO)₂Ca foi adicionado em outro frasco. O volume foi completado para 40 mL com água bidestilada, livre de CO₂. Manteve-se o sistema vedado em atmosfera inerte com fluxo de gás N₂ por 24 horas em temperatura ambiente. O resíduo foi lavado com água bidestilada e fervida, livre de CO₂. A mistura (filtrado + água de lavagem) foi titulada com solução padrão de NaOH 0,02

Capítulo IV – Parte Experimental

mol L⁻¹, sob atmosfera inerte. A titulação foi acompanhada com auxílio de um pHmetro até pH 9,8, garantindo, assim, que todo ácido acético estivesse desprotonado. A AC foi então determinada conforme a equação abaixo:

$$AC = \frac{(Va - Vb).M.1000}{m}$$

Onde AC significa acidez carboxílica, *Va* e *Vb* representam o volume de base padrão gasto para titular a amostra e o branco, respectivamente, *M* é a molaridade do hidróxido de sódio e *m* é a massa da amostra.

4.7.2 Determinação da Acidez Total

Para determinar a AT foi utilizado o método também proposto por Schnitzer e Gupta³², que consiste em reagir a amostra com um excesso de Ba(OH)₂:



O excedente de base é então titulado com solução padrão de ácido clorídrico.

Foi colocado em 25 mL de solução de 0,05 mol L⁻¹ de Ba(OH)₂, uma massa de amostra conhecida (10 mg, para cada composto individual e 10 mg para cada composto, no caso das misturas; 10 mg para cada amostra de AF ou AH). A solução ficou sob agitação durante 24 horas, com fluxo de gás N₂ em temperatura ambiente. Da mesma maneira foi feito o preparo do branco, constituído por 25 mL de solução 0,05 mol L⁻¹ de Ba(OH)₂. A suspensão foi filtrada em papel de filtro. O resíduo foi lavado com água bidestilada e fervida, livre de CO₂. A mistura (filtrado + água de lavagem) foi titulada com solução padrão de HCl 0,1 mol L⁻¹, sob atmosfera inerte. A titulação foi acompanhada com auxílio de um pHmetro até pH 8,4, neutralizando assim todo o hidróxido presente na solução. A AT foi então determinada conforme a equação:

$$AT = \frac{(Vb - Va).M.1000}{m}$$

Capítulo IV – Parte Experimental

Onde AT significa acidez total, V_b e V_a representam o volume de ácido padrão gasto para titular o branco e a amostra respectivamente, M é a molaridade do ácido clorídrico e m é a massa da amostra.

4.7.3 Determinação da Acidez Fenólica

A quantidade de grupos OH ácidos foi calculado pela diferença entre a AT e a AC, conforme a equação:

$$AFL = AT - AC$$

Onde AFL representa a acidez fenólica.

Os valores de acidez experimentais, para os compostos modelo, apresentados nas tabelas, foram todos convertidos em eq H^+ mol⁻¹ pela multiplicação da quantidade de AC, AFL e AT determinados em meq g⁻¹ pelas massas molares de cada composto. No caso das misturas, o somatório das massas molares de cada composto foi considerado.

Os valores de acidez teóricos representam o número de hidrogênios ionizáveis (eq H^+) por mol de cada composto ou, dos compostos das misturas, dependendo do caso.

4.7.4 Propriedades da Mistura Modelo

Para simular uma solução contendo os principais grupos funcionais presentes nas SH foram utilizados dois peptídeos: DL-alanil-DL-alanina e glicil-L-leucina (**Tabela 3**) e três ácidos benzenocarboxílicos: ácido 3,5-dihidroxibenzóico, ácido 2,4-dihidroxibenzóico e ácido ftálico (**Tabela 4**).

Capítulo IV – Parte Experimental

Tabela 3 – Valores de pK_a relativos à desprotonação dos peptídeos estudados.⁴²

| Peptídeo | pK_a | Equação de Equilíbrio |
|---|--------------|---|
| <u>DL-alanil-DL-alanina</u> | | |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$ | 3,05 8,16 | $\text{H}_2\text{A}^+ \rightleftharpoons \text{HA} + \text{H}^+$ $\text{HA} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$ |
| <u>Glicil-L-leucina</u> | | |
| $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ | 3,13 8,20 | $\text{H}_2\text{A}^+ \rightleftharpoons \text{HA} + \text{H}^+$ $\text{HA} \rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+$ |

Tabela 4 – Valores de pK_a relativos à desprotonação dos três ácidos benzenocarboxílicos estudados.³⁰

| Ácidos | pK_a | Equação de Equilíbrio |
|---|-----------------------|--|
| <u>Ácido 3,5-dihidroxibenzoico</u> | | |
| $\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2 \end{array}$ | 3,90 9,03 10,30 | $\text{H}_3\text{A} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{A}^- + \text{H}^+$ $\text{H}_2\text{A}^- \rightleftharpoons \text{HA}^{2-} + \text{H}^+$ $\text{HA}^{2-} \rightleftharpoons \text{A}^{3-} + \text{H}^+$ |
| <u>Ácido 2,4-dihidroxibenzoico</u> | | |
| $\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2 \end{array}$ | 3,12 8,82 - | $\text{H}_3\text{B} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{B}^- + \text{H}^+$ $\text{H}_2\text{B}^- \rightleftharpoons \text{HB}^{2-} + \text{H}^+$ $\text{HB}^{2-} \rightleftharpoons \text{B}^{3-} + \text{H}^+$ |
| <u>Ácido ftálico</u> | | |
| $\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ | 2,78 5,08 | $\text{H}_2\text{C} \rightleftharpoons \text{HC}^- + \text{H}^+$ $\text{HC}^- \rightleftharpoons \text{C}^{2-} + \text{H}^+$ |

Capítulo V – Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E ESPECTRAIS DAS SH

5.1.1 Análise Elementar – CHNS

A **Tabela 5** apresenta os dados referentes à análise elementar e às razões atômicas dos AF e AH estudados neste trabalho. Os valores aqui encontrados estão dentro da faixa esperada, correlacionando-se bem com os dados normalmente apresentados na literatura.⁴³

Usualmente, as relações atômicas (C/H e C/N) têm sido empregadas para estabelecer a fonte de MO, o grau de condensação, as transformações diagenéticas e as condições ambientais sob as quais as SH foram formadas.^{43, 44, 45} Sedimentos marinhos, por exemplo, sendo menos aerados do que solos superficiais e tendo uma fonte de MO mais alifática e rica em nitrogênio, produzem SH com baixas razões de C/H e C/N.^{10, 43} Amostras terrestres, devido à contribuição das plantas superiores são, em geral, ricas em ligninas e celulose, apresentando conseqüentemente, altas razões C/H e C/N.⁴⁴

Na **Tabela 5** pode-se observar que os AF e AH pertencem a grupos distintos, sendo que as razões de C/H e C/N são menores para os últimos, para o caso de amostras vindas de um mesmo sedimento. Essas características são definidas pelos procedimentos de extração⁴⁶, pois os AF são purificados com uma resina macrorreticular não iônica (DAX-8) que serve como um filtro para algumas espécies de impurezas.

Comparando-se as SH de diferentes sítios, os dados mostram as tendências esperadas, isto é, amostras de ambientes aquáticos (marinhos ou não) neste caso as amostras: MVI, UBM, PLN e as amostras estuarinas próximas do mar RME 1A, G1 e G2 apresentam os valores mais baixos de C/H e C/N. As outras amostras do Manguezal de Ratonés (RME 2A e G7) ocupam posições intermediárias enquanto que as amostras terrestres (Aldrich e Turfa) apresentam os maiores valores.

Capítulo V – Resultados e Discussão

Tabela 5 – Análise elementar e razões atômicas das SH estudadas.

| Amostra ^a | C (%) | H (%) | N (%) | S (%) | C/H ^b | C/N ^b | Cinzas(%) ^c |
|----------------------------|-------|-------|-------|-----------------|------------------|------------------|------------------------|
| ÁCIDOS FÚLVICOS | | | | | | | |
| MVI | 42,54 | 4,89 | 2,11 | 2,35 | 0,72 | 23,52 | 3,1 ± 0,3 |
| UBM | 41,72 | 4,69 | 1,97 | 1,86 | 0,74 | 24,70 | 3,3 ± 0,2 |
| PLN 4 | 34,90 | 3,83 | 2,06 | 1,25 | 0,76 | 19,76 | 5,1 ± 0,2 |
| PLN 7 | 36,11 | 4,04 | 2,25 | 1,44 | 0,74 | 18,72 | 6,9 ± 0,4 |
| RME 1A^d | 47,04 | 4,81 | 2,03 | 2,14 | 0,81 | 27,03 | 2,0 ± 0,1 |
| RME 2A^e | 45,65 | 4,37 | 1,35 | 2,41 | 0,87 | 39,45 | 3,5 ± 0,3 |
| ASP D^h | 45,41 | 4,32 | 1,14 | nd ^j | 0,88 | 46,47 | 20,8 ± 0,5 |
| ÁCIDOS HÚMICOS | | | | | | | |
| MVI | 47,16 | 5,78 | 3,69 | 1,67 | 0,68 | 14,91 | 5,3 ± 0,2 |
| UBM | 46,23 | 5,55 | 3,25 | 1,53 | 0,69 | 16,59 | 5,8 ± 0,3 |
| PLN 4 | 46,30 | 5,41 | 3,76 | 1,35 | 0,71 | 14,36 | 7,5 ± 0,4 |
| PLN 7 | 44,90 | 5,30 | 3,98 | 1,56 | 0,70 | 13,16 | 7,2 ± 0,2 |
| RME G1^f | 44,46 | 4,76 | 3,90 | 1,74 | 0,78 | 13,29 | nd ^l |
| RME 1A^d | 48,21 | 5,36 | 3,23 | 1,85 | 0,75 | 17,41 | 6,2 ± 0,3 |
| RME G2^e | 48,65 | 4,83 | 2,98 | 1,54 | 0,84 | 19,04 | nd ^l |
| RME G7^g | 45,71 | 4,51 | 2,29 | 2,15 | 0,84 | 23,28 | nd ^l |
| RME 2A^g | 48,54 | 5,00 | 2,02 | 1,85 | 0,81 | 28,03 | 7,5 ± 0,2 |
| ASP D^h | 47,67 | 4,09 | 2,26 | nd ^j | 0,97 | 24,60 | 22,5 ± 0,3 |
| ASP Fⁱ | 45,26 | 4,25 | 1,32 | nd ^j | 0,89 | 40,00 | 24,6 ± 0,6 |
| Aldrich^m | 52,10 | 4,90 | 1,10 | 1,10 | 0,88 | 55,30 | 15,2 ± 0,3 |
| Aldrich | 37,70 | 4,70 | 0,70 | nd ^j | 0,67 | 62,83 | 24,6 ± 0,3 |

^a Abreviações: MVI = Ilha do Mar Virado; UBM = Praia de Ubatimirim; PLN = Lagoa do Peri; RME = Manguezal de Ratonas; ASP = Turfeira do Arroio do Silva; ^b C/H = [%C/12.01]/[%H/1.00]; C/N = [%C/12.01]/[%N/14.01]; ^c desvio padrão para três medidas; ^d próximo do mar; ^e sob a coluna d'água, na desembocadura do Rio Ratonas; ^f dentro da baía, sob a coluna d'água; ^g longe do mar; ^h decomposta; ⁱ fibrosa; ^j não detectado; ^l não determinado; ^m amostra purificada.

Capítulo V – Resultados e Discussão

5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho – IV

A espectroscopia no IV tem sido amplamente utilizada na análise de SH, existindo na literatura uma quantidade razoável de informações e dados resultantes desta técnica. Sua importância reside no fato de através dela, ser possível obter informações sobre a natureza, a reatividade, o tipo de grupos funcionais presentes na estrutura, estabelecer a presença ou ausência de impurezas inorgânicas e ainda, analisar as interações entre SH-metal. As **Figuras 10** e **11** mostram, respectivamente, os espectros de alguns dos AF e AH estudados. O restante das amostras mostrou espectros semelhantes aos aqui apresentados, porém não seria possível apresentar todos os resultados neste espaço. As atribuições das bandas encontram-se relacionadas na **Tabela 6**.

Os espectros no IV das amostras de AF e AH são ligeiramente diferentes uns dos outros. Além das bandas relativas a carbono alifático (aproximadamente 2920 cm^{-1}) que são mais evidentes nos espectros dos AH do que naqueles dos AF, por volta de $1600\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$ uma outra diferença sistemática entre os espectros dos dois tipos de SH é observada.

Tabela 6 – Atribuições das principais bandas de absorção no infravermelho de SH.

| Número de onda (cm^{-1}) | Atribuições |
|-------------------------------------|--|
| 3400 – 3300 | Estiramentos O-H e N-H inter e intramolecular (traço) |
| 2940 – 2900 | Estiramento C-H alifático |
| 1725 – 1718 | Estiramento C=O de ácido carboxílico e cetonas (traço) |
| 1660 – 1630 | Estiramentos C=O de grupos amida (banda de amida I) e C=O de quinonas |
| 1620 – 1600 | Estiramento C=C aromático |
| 1600 – 1585 | Estiramento C=C dentro do anel ⁴⁷ |
| 1590 – 1520 | Estiramento COO ⁻ simétrico, estiramento C=N (banda amida II) |
| 1500 – 1400 | Estiramento C=C dentro do anel ¹ |
| 1400 – 1390 | Deformação OH e estiramento C-O de OH fenólico, deformação C-H de CH ₂ e CH ₃ , estiramento COO ⁻ simétrico |
| 1280 – 1200 | Estiramento C-O e deformação de ácido carboxílico |
| 1170 – 950 | Estiramento C-O de estruturas tipo polissacarídeos |
| 1031 | Estiramento Si-O (impurezas inorgânicas) |

Fonte: Adaptado de Stevenson.⁴

Capítulo V – Resultados e Discussão

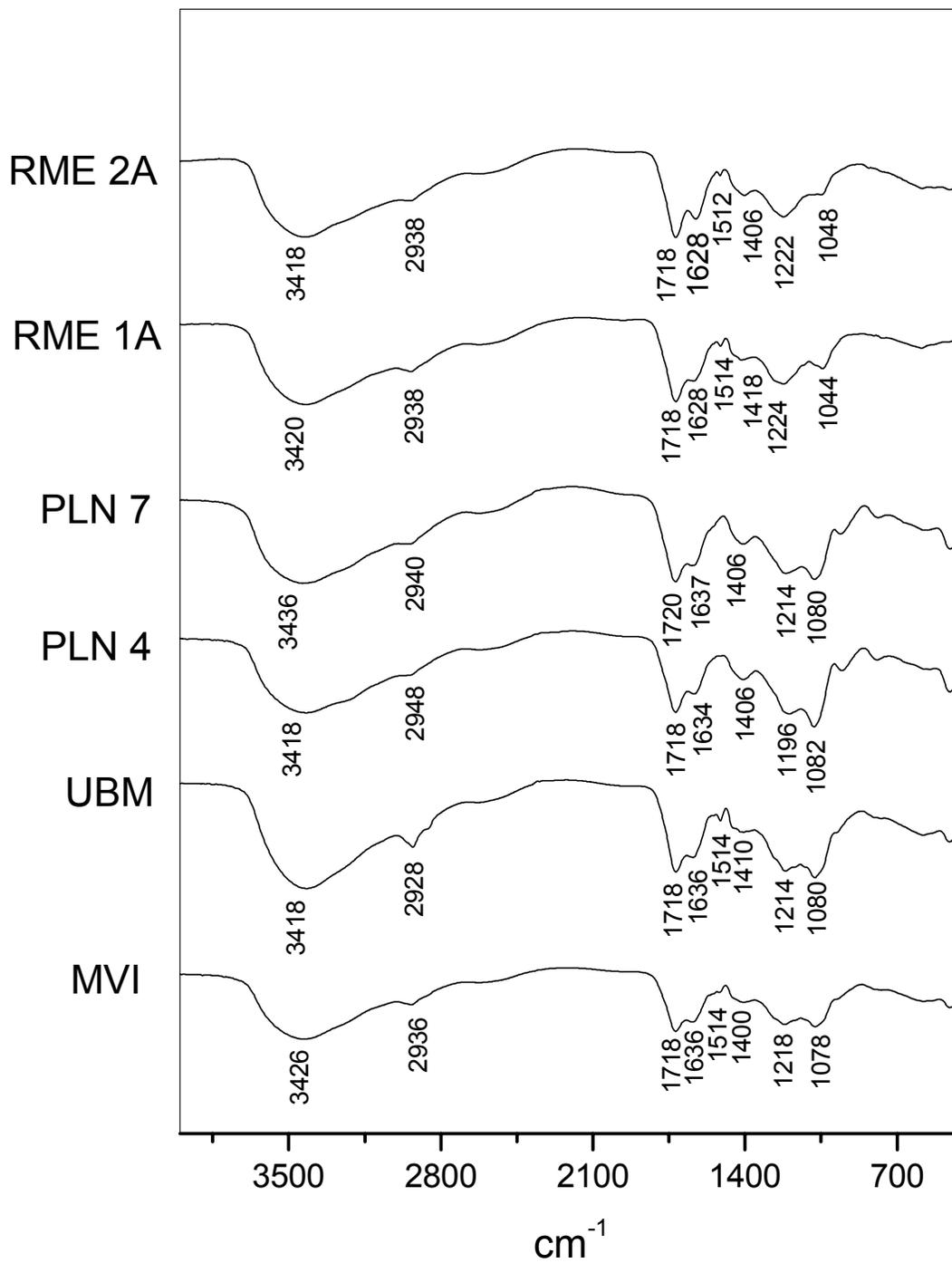


Figura 10 – Espectros no infravermelho dos AF estudados.

Capítulo V – Resultados e Discussão

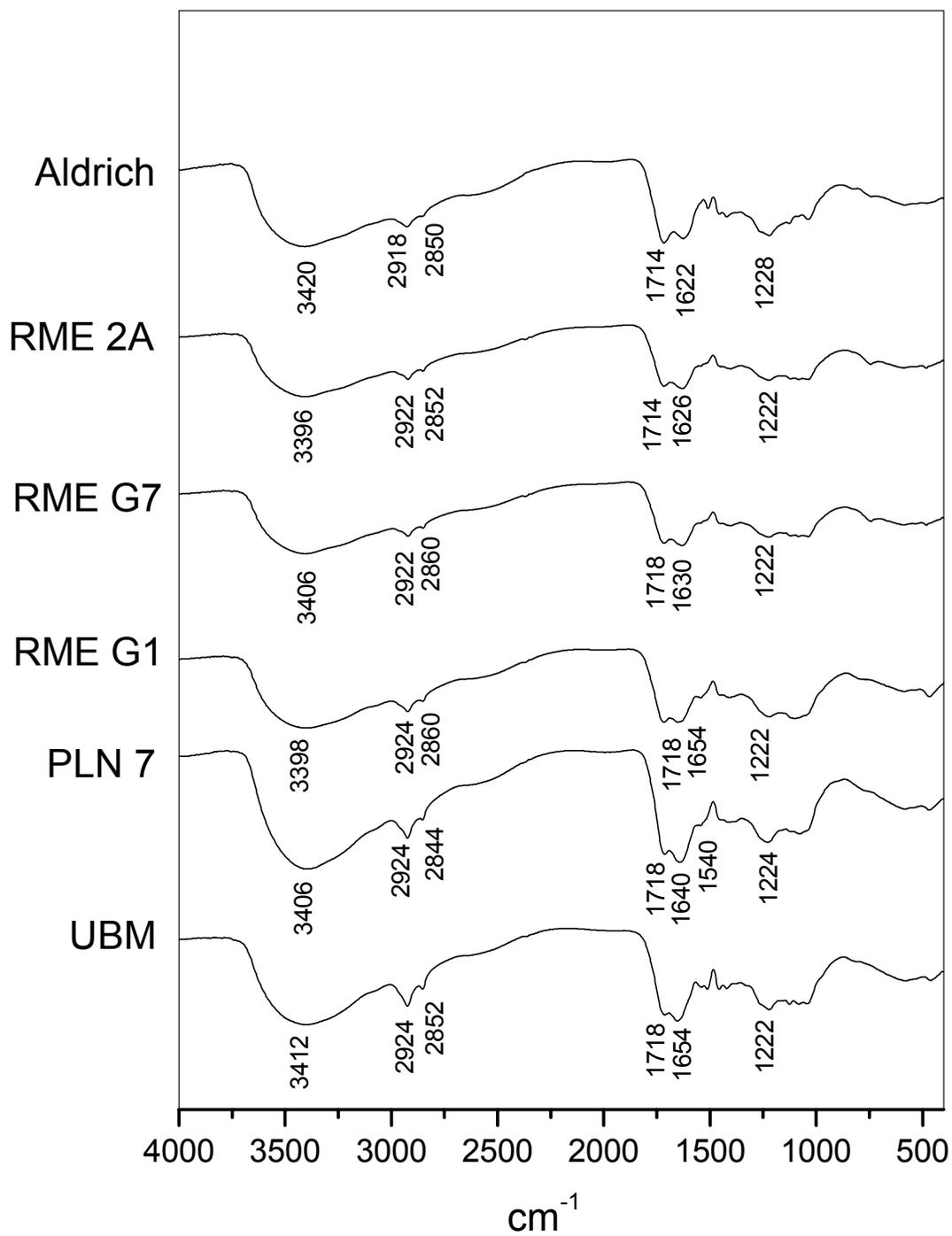


Figura 11 – Espectros no infravermelho dos AH estudados.

Capítulo V – Resultados e Discussão

Primeiro, a banda de absorção referente ao estiramento C=O da carboxila (próximo de 1718 cm^{-1}) é mais intensa nos espectros de AF do que nos de AH. Para as amostras de AH, por outro lado, é a segunda banda (por volta de 1640 cm^{-1}) que, em geral, é a mais evidenciada. Nos AH essa segunda banda é ainda deslocada para a direita ou para a esquerda dependendo da amostra. Por exemplo, na amostra de AH marinho (UBM) ela está localizada por volta de 1654 cm^{-1} , enquanto nas amostras mais terrestres (Aldrich e RME 2A) ela situa-se em torno de 1622 cm^{-1} no primeiro caso e 1626 cm^{-1} , no segundo caso. Na **Tabela 6** pode-se observar que nesta região do espectro concentram-se os sinais de absorção de estiramento C=O de grupos amida e quinonas, e estiramento de C=C aromático. Nas SH espera-se encontrar todas estas funções, sendo que os deslocamentos para a direita ou para a esquerda devem ser resultantes da influência relativa de cada grupo. A absorção C=C aromática, por exemplo, deve ser responsável por essa banda em MO terrestre em geral, derivada de lignina, enquanto que a banda de amida I deve prevalecer para MO aquática (mais proteínica). O AH Aldrich mostra a menor frequência para esta banda. Sendo um material de origem terrestre derivado de lignina⁴⁸, o estiramento C=C conjugado deve ser responsável por esta absorção. Para AH aquáticos os estiramentos típicos de amida I devem prevalecer considerando-se a alta quantidade de nitrogênio nessas amostras. Os AH estuarinos mostram as tendências esperadas sendo altamente influenciados pelos sítios de coleta, isto é, para as amostras coletadas cerca do mar (1A, G1 e G2) essa banda aparece em maiores frequências do que para amostras coletadas longe do mar (2A e G7). Para as SH da Lagoa do Peri os sinais de amida I são ainda mais perceptíveis. Nesse caso, a banda de amida I aparece quase independentemente por volta de 1640 cm^{-1} para ambos, AF e AH. As amostras de AH da Lagoa do Peri exibem, em adição, a banda de amida II (cerca de 1540 cm^{-1}). Essa banda é resultante da interação entre a ligação N-H e o estiramento C-N do grupo C-N-H nas amidas de cadeia aberta.⁴⁷ Para as amostras marinhas e estuarinas (próximas do mar), a banda de amida II é quase sobreposta à banda do estiramento de C=C de anel (cerca de 1512 cm^{-1}).⁴⁷ Tais dados permitem associar as bandas de amida em SH marinhas e principalmente da Lagoa do Peri à presença polipeptídios.

Capítulo V – Resultados e Discussão

Uma vez que a troca iônica foi usada no procedimento de extração, o material protéico que permanece deve ser estrutural, e não simplesmente associado.

Diferenças entre AF e AH podem também ser observadas entre 1000-1300 cm^{-1} . Para os AF, a banda relativa ao estiramento C-O de polissacarídeos está acerca de 1080 cm^{-1} e aparece livremente, enquanto que para AH a distribuição das bandas nessa região não é muito clara, provavelmente devido à presença de impurezas inorgânicas (Si-O). A intensidade dessa banda também muda de amostra para amostra de acordo com a seqüência: lago > marinho > estuarino marinho > estuarino terrestre. O AH Aldrich que é uma amostra terrestre não exhibe esse pico. Finalmente, a banda por volta de 1220 cm^{-1} (estiramento C-O e deformação de OH de grupos COOH) é exibida por todas as amostras de AF e AH. Resultados como esses mostram que desde que as amostras tenham recebido o mesmo tratamento de extração e purificação, as razões atômicas assim como as propriedades espectrais no IV podem efetivamente ser usadas para identificar a origem de MO nas SH.

5.2 ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS DAS SH

Os valores de acidez das SH estudadas, medidos pelo método de Schnitzer e Gupta³², são apresentados na **Tabela 7**. Apesar da natureza heterogênea do material, os valores dos desvios padrão são relativamente baixos, atestando a reprodutibilidade do método.

Os valores AT para as amostras estudadas são, em geral, maiores do que aqueles usualmente encontrados na literatura para SH de ambientes distintos.^{10, 20, 21, 32, 35} Ritchie e Perdue²¹ compilaram os dados referentes à acidez de centenas de amostras de SH medidas pelo método de Schnitzer e Gupta³², e mostraram que ambos, os valores de AC e de AFL situam-se entre 1 a 10 meq g^{-1} em todas as determinações. Os valores de AC para as amostras aqui estudadas variam de 3.7 a 7.2 meq g^{-1} para os AF e de 3.1 a 4.8 meq g^{-1} para os AH, sendo considerados, portanto, valores médios. Os valores de AFL, por outro lado, ficaram na faixa de 7.7 a 15.3 meq g^{-1} para AF e de 7.3 a 14.7 meq g^{-1} para os AH sendo, na maioria dos

Capítulo V – Resultados e Discussão

casos, mais altos do que os valores mostrados na literatura.²¹ Os valores de AT relativamente altos parecem, portanto, ser uma consequência do alto valor de AFL.

Tabela 7 – Quantidade de grupos funcionais^a das SH estudadas medidas pelo método de Schnitzer e Gupta.³²

| Amostra ^b | AC ^c (meq g ⁻¹) | AFL ^c (meq g ⁻¹) | AT ^c (meq g ⁻¹) |
|------------------------|---|--|---|
| ÁCIDOS FÚLVICOS | | | |
| MVI | 4,63 ± 0,22 | 13,20 ± 0,79 | 17,83 ± 0,76 |
| UBM | 3,73 ± 0,04 | 15,27 ± 0,50 | 19,00 ± 0,50 |
| PLN 4 | 4,70 ± 0,08 | 12,80 ± 0,51 | 17,50 ± 0,50 |
| PLN 7 | 7,16 ± 0,01 | 7,72 ± 0,20 | 14,88 ± 0,20 |
| RME 1A ^d | 5,13 ± 0,20 | 11,37 ± 0,54 | 16,50 ± 0,50 |
| RME 2A ^e | 5,56 ± 0,02 | 13,11 ± 0,29 | 18,67 ± 0,29 |
| ASP D ^h | 6,21 ± 0,04 | 16,12 ± 0,29 | 22,33 ± 0,29 |
| ÁCIDOS HÚMICOS | | | |
| MVI | 3,68 ± 0,04 | 11,25 ± 0,49 | 14,93 ± 0,49 |
| UBM | 3,17 ± 0,02 | 12,83 ± 0,50 | 16,00 ± 0,50 |
| PLN 4 | 3,21 ± 0,06 | 12,29 ± 0,50 | 15,50 ± 0,50 |
| PLN 7 | 3,77 ± 0,07 | 14,73 ± 0,50 | 18,50 ± 0,50 |
| RME G1 ^f | 3,07 ± 0,40 | 8,13 ± 0,50 | 11,20 ± 0,30 |
| RME 1A ^d | 3,70 ± 0,06 | 9,63 ± 0,29 | 13,33 ± 0,29 |
| RME G2 ^e | 3,16 ± 0,40 | 7,34 ± 0,64 | 10,50 ± 0,50 |
| RME G7 ^g | 3,52 ± 0,16 | 14,48 ± 0,52 | 18,00 ± 0,50 |
| RME 2A ^g | 3,74 ± 0,18 | 12,76 ± 0,53 | 16,50 ± 0,50 |
| ASP D ^h | 4,76 ± 0,18 | 13,24 ± 0,53 | 18,00 ± 0,50 |
| ASP F ⁱ | 5,66 ± 0,05 | 20,34 ± 0,50 | 26,00 ± 0,50 |
| Aldrich ^l | 4,17 ± 0,03 ^m | 8,83 ± 0,50 ^m | 13,00 ± 0,50 ^m |
| Aldrich | 1,89 ± 0,20 ⁿ | 8,91 ± 0,50 ⁿ | 10,80 ± 0,50 ⁿ |

^a Exceto quando indicado os desvio padrão são relativos a três medidas. ^b Abreviações têm o mesmo significado que na Tabela 5; ^c AC = acidez carboxílica, AFL = acidez fenólica, AT = acidez total; ^{d, e, f, g, h, i, j, l} como na Tabela 5; ^m desvio padrão para 9 medidas; ⁿ desvio padrão para 6 medidas.

Capítulo V – Resultados e Discussão

Essas amostras provêm de ambientes de alta produtividade, com elevada taxa de sedimentação e, estes altos valores de acidez poderiam numa primeira interpretação ser atribuídos ao baixo grau de humificação do material. De fato, através das propriedades elementares e espectrais (**Tabela 5 e Figuras 10 e 11**) é visível que essas amostras apresentam porções significativas do seu material de origem. Entretanto, comparando amostras de ambientes distintos, os dados de acidez não seguem nenhum padrão observável. Em geral a biomassa planctônica é de natureza alifática e proteínácea e as SH dela originadas deveriam apresentar os menores valores de AFL quando comparadas com amostras terrestres (derivadas de lignina). Contrariamente ao esperado, as amostras terrestres (Aldrich, RME 2A e G7) apresentaram mais grupos carboxílicos do que as amostras aquáticas, marinhas e de lago, sendo que as últimas (UBM, PLN 4 e 7) apresentaram maior quantidade de grupos fenólicos. As amostras de turfa também apresentaram altos valores de AC e AFL. Para os AH, por exemplo, aquele com o maior valor de AFL foi uma amostra da Lagoa do Peri (PLN 7), sendo que esta amostra não apresenta sinais de fenóis no espectro de ^{13}C -RMN.⁴⁹

Considerando as informações obtidas até agora e a reprodutibilidade dos dados de acidez acredita-se que estas discrepâncias possam estar correlacionadas com as limitações já citadas da metodologia. Os valores de acidez obtidos pelo método de Schnitzer e Gupta³² têm sido freqüentemente desacreditados principalmente devido a suspeita da interferência de outros grupos além dos carboxílicos e fenólicos nas medidas de acidez.^{21, 33, 34}

As amostras aquáticas aqui estudadas apresentaram fortes evidências de presença de grupos amida em sua estrutura, assim suspeitou-se que as discrepâncias apresentadas poderiam estar relacionadas com a presença desses grupos. Um experimento foi idealizado, então, de modo a testar a validade da metodologia empregada e de que forma as possíveis interferências poderiam prejudicar a interpretação dos dados de acidez. Neste experimento foram utilizados três ácidos benzenocarboxílicos (ácido 2,4-dihidroxibenzóico; ácido 3,5-dihidroxibenzóico; ácido ftálico) e dois peptídeos (DL-alanil-DL-alanina; glicil-L-leucina) com grupos funcionais de diferentes valores de pK_a . Os três primeiros ácidos foram escolhidos por conterem grupos carboxílicos e fenólicos associados a

anéis aromáticos simulando uma solução com os principais grupos funcionais presentes em SH. Os peptídeos foram escolhidos para testar a interferência dos grupos amida nas possíveis reações laterais geradoras de grupos ácidos. Os resultados relativos a este experimento serão discutidos a seguir.

5.3 ACIDEZ DAS MISTURAS-MODELO

5.3.1 Ácidos Benzenocarboxílicos

Num primeiro grupo de experimentos foram determinados, os valores de acidez para os três ácidos benzenocarboxílicos cujas constantes de protonação, definidas pela equação $H_nL \rightleftharpoons H_{n-1}L + H^+$, são mostradas na **Tabela 4**. As reações foram feitas com os três compostos tanto, individualmente como misturados. Esses dados são mostrados na **Tabela 8**.

Os valores teóricos de acidez foram determinados considerando a desprotonação total e parcial dos grupos fenólicos. Os resultados mostraram que, para a mistura de ácidos, os valores de AC teóricos e experimentais são equivalentes, quando o desvio padrão é considerado. Os valores de AT, entretanto, são bem menores do que o esperado, resultando em um baixo valor de AFL. Na realidade, como se pode constatar ao observar os valores teóricos⁹, a mistura comporta-se como se três dos quatro grupos fenólicos não estivessem aptos a reagir com o Ba(OH)₂. Isto pode ser atribuído à baixa acidez desses grupos. Por exemplo, o pK_a do grupo fenólico em posição orto relativo ao grupo carboxilato do ácido 2,4-dihidroxibenzóico é alto demais mesmo para ser detectado por potenciometria.³⁰ Do mesmo modo, os dois grupos fenólicos em posição meta no ácido 3,5-dihidroxibenzóico têm baixo caráter ácido com valores de pK_a de 10,30 e 9,03 (**Tabela 4**).

Além desses efeitos, interações intermoleculares, que podem impedir a troca iônica, podem acontecer entre os grupos funcionais de moléculas distintas. Efeitos como esses são igualmente esperados em misturas complexas como as SH. Conclusões semelhantes podem ser obtidas analisando os dados concernentes aos valores de acidez dos ácidos benzenocarboxílicos individualmente (**Tabela 8**).

Capítulo V – Resultados e Discussão

Tabela 8 – Valores de acidez^a dos três ácidos benzenocarboxílicos estudados medidos pelo método de Schnitzer e Gupta.³²

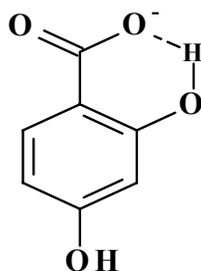
| | AC ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AFL ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AT ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) |
|--|---|--|---|
| MISTURA DE ÁCIDOS | | | |
| Experimental | 3,88 ± 0,22 | 0,90 ± 0,31 | 4,78 ± 0,22 ^c |
| Teórico^d | 4,00 | 4,00 | 8,00 |
| Teórico^e | 4,00 | 3,00 | 7,00 |
| Teórico^f | 4,00 | 2,00 | 6,00 |
| Teórico^g | 4,00 | 1,00 | 5,00 |
| ÁCIDOS BENZENOCARBOXÍLICOS | | | |
| <u>Ácido 3,5- dihidroxibenzóico</u> | | | |
| Experimental | 0,98 ± 0,08 | 0,91 ± 0,08 | 1,89 ± 0,08 |
| Teórico^d | 1,00 | 2,00 | 3,00 |
| Teórico^e | 1,00 | 1,00 | 2,00 |
| <u>Ácido 2,4- dihidroxibenzóico</u> | | | |
| Experimental | 0,84 ± 0,01 | 0,77 ± 0,04 | 1,61 ± 0,04 |
| Teórico^d | 1,00 | 2,00 | 3,00 |
| Teórico^e | 1,00 | 1,00 | 2,00 |
| <u>Ácido ftálico</u> | | | |
| Experimental | 1,79 ± 0,07 | 0,00 | 1,81 ± 0,08 |
| Teórico^d | 2,00 | 0,00 | 2,00 |

^a Exceto quando indicado os desvio padrão são relativos a três medidas; ^b as abreviações tem o mesmo significado que na Tabela 7; ^c desvio padrão para seis medidas; ^d considerando a desprotonação total; ^e não considerando a desprotonação de um grupo fenólico; ^f não considerando a desprotonação de dois grupos fenólicos; ^g não considerando a desprotonação de três grupos fenólicos.

Capítulo V – Resultados e Discussão

Para os três compostos, os valores de AC experimentais são, em geral, similares aos dados teóricos. Para o ácido ftálico, que não possui grupos fenólicos, os valores de AC e AT obtidos com as duas reações distintas estão também de acordo com o esperado. Em ambos os casos, os valores experimentais são menores do que os valores teóricos provavelmente devido a algumas perdas de produto durante a etapa de filtração.

Para os ácidos que apresentam grupos fenólicos na estrutura, somente quando pelo menos uma desprotonação é ignorada (teórico^e), os valores medidos de AT aproximaram-se dos valores teóricos. De fato, todos os grupos fenólicos devem sofrer uma certa porcentagem de desprotonação, sendo essa contribuição dependente do seu respectivo valor de pK_a . O somatório dessas contribuições corresponde aproximadamente $0,91 \text{ eq H}^+ \text{ mol}^{-1}$ para o ácido 3,5-dihidroxibenzóico e aproximadamente $0,77 \text{ eq H}^+ \text{ mol}^{-1}$ para o ácido 2,4-dihidroxibenzóico. No segundo caso, os valores experimentais estão mais afastados dos valores teóricos do que no primeiro caso. Isto se deve à dificuldade de desprotonação do grupo fenólico adjacente ao grupo carboxílico, no ácido 2,4-dihidroxibenzóico. A desprotonação do grupo fenólico deve acontecer depois da desprotonação do grupo carboxílico fazendo com que o próton seja atraído pelo grupo carboxilato carregado negativamente, resultando num aumento do pK_a do grupo fenólico:



Assim, o grupo hidroxila em posição pára- em relação ao grupo carboxilato deve, contribuir sozinho com o valor detectado de $0,77 \text{ eq H}^+ \text{ mol}^{-1}$. O pK_a deste grupo, é inclusive menor do que aqueles dos dois grupos fenólicos no ácido 3,5-dihidroxibenzóico (**Tabela 4**). A reação com o acetato de cálcio é também menos completa no caso do ácido 2,4-dihidroxibenzóico, o que deve estar também relacio-

Capítulo V – Resultados e Discussão

nado às interações envolvendo o próton e os dois grupos funcionais adjacentes.

Com estes dados, fica evidente que a posição dos grupos funcionais bem como o grau de substituição do anel aromático interfere consideravelmente nas medidas de acidez das SH. Schnitzer e Gupta³², usando compostos modelo, chegaram a conclusões similares.

5.3.2 Peptídeos

O papel dos grupos amida na determinação de acidez de SH foi testado usando dois peptídeos: a DL-alanil-DL-alanina e a glicil-L-leucina. Os valores de pK_a relativos à desprotonação desses compostos são mostrados na **Tabela 3**. O primeiro valor é relativo ao próton carboxílico enquanto que o segundo, a pH mais alto, é relativo a desprotonação do grupo amida. Ambos os peptídeos foram submetidos à reação com o acetato de cálcio e com o hidróxido de bário. Os resultados dessas reações estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Valores de acidez^a dos dois peptídeos estudados medidos pelo método de Schnitzer e Gupta.³²

| | AC ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AFL (aparente) ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AT ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) |
|------------------------------------|---|---|---|
| <u>DL-alanil-DL-alanina</u> | | | |
| Experimental | 0,52 ± 0,03 ^c | 1,88 ± 0,08 | 2,40 ± 0,08 |
| Teórico | 1,00 ^d | 0,00 | 1,00 ^d |
| Teórico | 1,00 ^d | 0,00 | 2,00 ^e |
| <u>Glicil-L-leucina</u> | | | |
| Experimental | 0,56 ± 0,04 ^c | 1,73 ± 0,06 | 2,29 ± 0,05 |
| Teórico | 1,00 ^d | 0,00 | 1,00 ^e |
| Teórico | 1,00 ^d | 0,00 | 2,00 ^d |

^a Desvio padrão relativo a três medidas. ^b as abreviações têm o mesmo significado que na Tabela 7;

^c ponto de equivalência determinado com fenolftaleína; ^d considerando total desprotonação; ^e considerando a hidrólise do grupo amida mais uma desprotonação.

Capítulo V – Resultados e Discussão

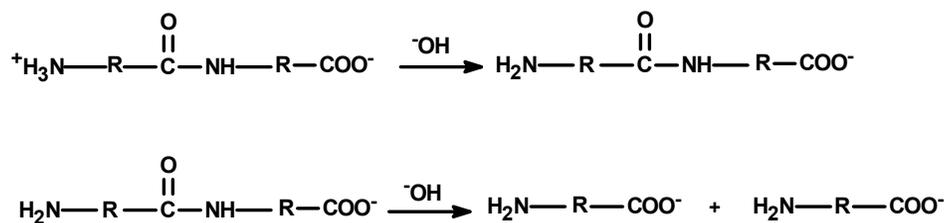
Para os dois peptídeos os valores de AC foram cerca de cinquenta por cento do valor teórico e os dados experimentais de AT foram cerca de o dobro do valor teórico, considerando-se o número de hidrogênios ionizáveis de cada estrutura.

Na realidade, em pHs neutros, as propriedades de amino ácidos e peptídeos levam a uma estrutura dipolar iônica⁵⁰ do tipo:



onde o grupo ácido é, de fato, o íon amônio. O íon acetato, em condições normais, não seria bastante básico para remover o próton desta estrutura e, um valor de AC em torno de 0,52 eq $\text{H}^+ \text{mol}^{-1}$ foi, na realidade, detectado devido ao excesso de íons acetato em relação aos peptídeos, em solução.

Por outro lado, nas medidas de AT, isto é, na reação com $\text{Ba}(\text{OH})_2$, os valores obtidos foram aproximadamente o dobro dos valores esperados, o que pode ser explicado pela hidrólise dos peptídeos em meio básico, consumindo um grupo hidroxila extra:



Finalmente, um valor maior que o dobro pode ser atribuído à reação paralela do $\text{Ba}(\text{OH})_2$ com o CO_2 atmosférico, durante a etapa de filtração, uma vez que nesse momento o sistema é exposto ao ar.⁵¹ Tal reação também pode estar presente nos resultados mostrados na **Tabela 8**, mas neste caso, como a troca iônica não foi completa este efeito não foi evidenciado.

5.3.3 Misturas de Peptídeo com Ácido Benzenocarboxílico

Os experimentos anteriores mostraram que grupos amida, quando presentes em SH podem, igualmente, sofrer hidrólise durante a reação com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$, aumentando artificialmente a quantidade de grupos fenólicos da amostra. Para che-

Capítulo V – Resultados e Discussão

car essa possibilidade, no caso de misturas complexas com as SH, titulações de soluções contendo ambos, peptídeos e ácidos benzenocarboxílicos foram realizadas (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Valores de acidez^a das diferentes misturas com os ácidos benzenocarboxílicos e o peptídeo DL-alanil-DL-alanina, medidos pelo método de Schnitzer e Gupta.³²

| | AC ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AFL (aparente) ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AT ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) |
|---|---|---|---|
| Ácido ftálico + DL-alanil-DL-alanina | | | |
| Experimental | 1,96 ± 0,02 | 1,46 ± 0,16 | 3,42 ± 0,16 |
| Teórico^c | 3,00 | 0,00 | 3,00 |
| Esperado^d | 2,31 | 1,90 | 4,21 ^e |
| Ácido 3,5- dihidroxibenzóico + DL-alanil-DL-alanina | | | |
| Experimental | 0,86 ± 0,02 | 2,70 ± 0,05 | 3,56 ± 0,05 |
| Teórico^c | 2,00 | 2,00 | 4,00 |
| Esperado^d | 1,50 | 2,79 | 4,29 ^e |
| Três ácidos benzenocarboxílicos + DL-alanil-DL-alanina | | | |
| Experimental | 4,02 ± 0,02 | 1,87 ± 0,05 | 5,89 ± 0,05 |
| Teórico^c | 5,00 | 4,00 | 9,00 |
| Esperado^d | 4,40 | 2,78 | 7,18 ^e |

^a Desvio padrão relativo a três medidas; ^b as abreviações tem o mesmo significado que na Tabela 7; ^c considerando a desprotonação de todos os hidrogênios ionizáveis; ^d valores estimados com base nos dados experimentais obtidos (isto é, somando-se os valores experimentais obtidos para os ácidos benzenocarboxílicos, na Tabela 8, e para os peptídeos, na Tabela 9); ^e a hidrólise do grupo amida é levada em conta nos cálculos dos valores de AT.

Comparando os dados da **Tabela 10** com aqueles para os ácidos benzenocarboxílicos sozinhos (**Tabela 8**) fica evidente que a hidrólise do peptídeo contribui para gerar uma quantidade artificial de grupos fenólicos em todas as mistu-

Capítulo V – Resultados e Discussão

ras. A solução do peptídeo mais o ácido ftálico, por exemplo, produziu uma AFL “aparente” de aproximadamente $1,46 \text{ eq H}^+ \text{ mol}^{-1}$ embora essa solução não contenha nenhum grupo fenólico. Os valores de AC e AT, por outro lado, não são tão altos como o esperado, considerando os resultados obtidos anteriormente para os compostos individualmente. Esse decréscimo na AT é provavelmente devido à presença simultânea, na solução, de um grande número de sítios básicos com muitas possibilidades de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, entre as espécies em solução, impedindo a retirada dos prótons. Efeitos como estes são também observados com a mistura de DL-alanil-DL-alanina e o ácido 3,5-dihidroxibenzoico (**Tabela 10**). Neste caso, mesmo que a AFL se aproxime do valor teórico, pode-se observar nos resultados de acidez individual (**Tabela 8**) que somente aproximadamente um grupo fenólico mol^{-1} pôde ser detectado para este ácido. Assim, fica notório que (**Tabela 10**) a AFL é artificialmente aumentada para $2,70 \text{ eq H}^+ \text{ mol}^{-1}$ pela presença do peptídeo.

Quando três ácidos benzenocarboxílicos são misturados com um peptídeo o número e as possibilidades de interações inter e/ou intramoleculares envolvendo os prótons em solução aumenta consideravelmente e as estimativas tornam-se impraticáveis. Contudo, tendências similares são observadas, isto é, os valores experimentais de AC e AT são menores do que os esperados e o valor de AFL é aumentado, como nos outros casos. Na **Tabela 8**, por exemplo, pode ser visto que aproximadamente, somente um grupo fenólico pôde ser detectado na mistura dos 3 ácidos. A inclusão do peptídeo aumentou esse valor para aproximadamente dois (**Tabela 10**). Assim pode-se deduzir que a presença dos grupos amida é uma característica que deve ser levada em conta na determinação dos valores de acidez em SH. Schnitzer e Gupta³² já haviam sugerido que o método do Ba(OH)_2 não é específico para grupos OH fenólicos. Reações laterais geradoras de grupos ácidos (ou que consomem hidroxilas), especialmente na faixa de pHs alcalinos, têm também sido detectadas em titulações diretas.^{21, 23} Estas discrepâncias podem, possivelmente, ser ignoradas em SH de solos, para as quais os grupos fenólicos e carboxílicos têm sido considerados como os principais sítios ionizáveis.³² Entretanto, esses efeitos devem ocorrer com maior frequência em SH aquáticas, as quais são originadas principalmente de MO proteinácea, alifática e rica em nitrogênio.¹⁰

Capítulo V – Resultados e Discussão

A hidrólise dos grupos ésteres tem também sido considerada como uma fonte de erro nas avaliações de acidez das SH^{15, 27} e a possibilidade de os dois efeitos ocorrerem simultaneamente não pode ser desconsiderada.

Portanto, se levarmos em consideração os resultados obtidos para a mistura de ácidos na ausência (**Tabela 8**) e presença de peptídeos (**Tabela 10**), os valores encontrados para a acidez das SH não devem refletir a real quantidade de grupamentos funcionais existentes nas estruturas. Entretanto, os grupos funcionais detectados são aqueles aptos a fazer a troca iônica com o acetato de cálcio e o Ba(OH)₂. Estes valores são muito importantes, pois eles podem dar uma estimativa da reatividade efetiva do material. Assim, os valores obtidos não devem ter um significado absoluto, mas devem ser usados somente em comparações com amostras que tenham sido tratadas da mesma maneira.

5.3.4 Aspectos Cinéticos

As reações ácido-base, em meio aquoso, em geral, ocorrem rapidamente enquanto que a hidrólise é uma reação mais lenta. De modo a encontrar um meio de distinguir entre essas duas reações e, eventualmente poder estancar a reação no momento adequado, alguns experimentos foram feitos em cinco frações de tempo diferentes. A **Tabela 11** mostra os dados relativos à solução do peptídeo DL-alanil-DL-alanina sozinho e misturado com o ácido ftálico e o ácido 3,5-dihidroxibenzóico.

Como o esperado, o tempo de equilíbrio influencia mais na determinação da AT do que na determinação da AC, sendo assim, a AFL é aumentada artificialmente com o tempo. Para o peptídeo sozinho, bem como para a mistura entre o peptídeo e o ácido ftálico (i.é. não apresentam grupos fenólicos em sua estrutura), a troca ácido-base com o Ba(OH)₂ ocorre aproximadamente na primeira hora de reação enquanto a hidrólise aparentemente está ocorrendo depois (6 horas ou mais). Quando grupos fenólicos estão presentes, como na mistura do peptídeo mais o ácido 3,5-dihidroxibenzóico, a troca iônica parece ocorrer gradativamente e assim ficaria difícil de se distinguir entre os dois processos. Para SH ricas em nitrogênio efeitos semelhantes podem também ocorrer.

Capítulo V – Resultados e Discussão

Tabela 11 – Valores de acidez^a a diferentes tempos para o peptídeo DL-alanil-DL-alanina sozinho e misturado com o ácido ftálico e o ácido 3,5-dihidroxibenzóico.

| Tempo de Reação | AC ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AFL (aparente) ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) | AT ^b (eq H ⁺ mol ⁻¹) |
|---|---|---|---|
| <u>DL-alanil-DL-alanina</u> | | | |
| 15 minutos | 0,42 ± 0,02 | 0,14 ± 0,21 | 0,56 ± 0,21 |
| 30 minutos | 0,45 ± 0,07 | 0,59 ± 0,21 | 1,04 ± 0,20 |
| 2 horas | 0,48 ± 0,06 | 0,64 ± 0,14 | 1,12 ± 0,13 |
| 6 horas | 0,48 ± 0,10 | 1,04 ± 0,17 | 1,52 ± 0,14 |
| 24 horas | 0,52 ± 0,03 | 1,88 ± 0,08 | 2,40 ± 0,08 |
| <u>Ácido ftálico + DL-alanil-DL-alanina</u> | | | |
| 15 minutos | 1,73 ± 0,07 | 0,63 ± 0,16 | 2,36 ± 0,15 |
| 30 minutos | 1,81 ± 0,02 | 1,04 ± 0,18 | 2,85 ± 0,18 |
| 2 horas | 1,86 ± 0,05 | 1,32 ± 0,22 | 3,18 ± 0,22 |
| 6 horas | 1,88 ± 0,03 | 1,41 ± 0,12 | 3,29 ± 0,12 |
| 24 horas | 1,96 ± 0,02 | 1,46 ± 0,16 | 3,42 ± 0,16 |
| <u>Ácido 3,5- dihidroxibenzóico + DL-alanil-DL-alanina</u> | | | |
| 15 minutos | 0,76 ± 0,12 | 0,73 ± 0,18 | 1,49 ± 0,14 |
| 30 minutos | 0,78 ± 0,14 | 1,18 ± 0,17 | 1,96 ± 0,10 |
| 2 horas | 0,80 ± 0,08 | 1,48 ± 0,17 | 2,28 ± 0,15 |
| 6 horas | 0,84 ± 0,10 | 1,51 ± 0,16 | 2,35 ± 0,12 |
| 24 horas | 0,86 ± 0,02 | 2,70 ± 0,05 | 3,56 ± 0,05 |

^a Desvio padrão relativo a três medidas; ^b as abreviações têm o mesmo significado que na Tabela 7.

Capítulo VI – Considerações Finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grupos funcionais ácidos de ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH) de diferentes ambientes (marinho, estuarino, terrestre, lago) foram determinados pelo método de Schnitzer e Gupta³². Enquanto as propriedades elementares e espectrais refletiram características que estavam de acordo com a origem das amostras, os dados de acidez medidos não mostraram a sistemática esperada, com amostras terrestres exibindo mais grupos carboxílicos e menos grupos fenólicos do que amostras aquáticas e marinhas, por exemplo. Essas discrepâncias foram atribuídas às peculiaridades da metodologia, que parece incluir outras funções, tais como os grupos amida, na determinação da acidez fenólica (AFL). Para testar esta possibilidade, misturas modelo foram analisadas através do mesmo procedimento. A aplicação do método para determinar a acidez de misturas contendo ácidos benzenocarboxílicos e peptídeos efetivamente, apresentou resultados que são dependentes das características estruturais das amostras.

Para os ácidos benzenocarboxílicos, grupos fenólicos com caráter muito básico e interações intermoleculares parecem interferir de forma definitiva nos resultados, produzindo valores de acidez menores do que os valores reais. Para misturas contendo peptídeos, a presença de grupos amida distorce os resultados de acidez total (AT) e, conseqüentemente, a quantidade de grupos fenólicos. A desprotonação do terminal amina do peptídeo parece não ocorrer na reação com $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$. Além disso, devido às severas condições da reação com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$ não somente essa desprotonação ocorre, como a hidrólise do peptídeo consome um grupo hidroxila extra. Como a AFL é calculada pela diferença entre a AT e a AC aca-

Capítulo VI – Considerações Finais

ba sendo artificialmente aumentada.

Apesar disso, o método de Schnitzer e Gupta³² parece ser bastante satisfatório. Primeiro, por ser rápido e reprodutível. Segundo, por poder ser realizado até mesmo em laboratórios modestos. Finalmente, porque apesar dos valores de acidez medidos não apresentarem um significado absoluto, os grupos ácidos detectados são importantes, pois são capazes de fazer a troca iônica com o $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ e com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$, refletindo assim a reatividade de cada amostra. Se os grupos ácidos detectados são realmente carboxílicos e fenólicos não chega a ser relevante. Inclusive, para se evitar discussões a respeito, poder-se-ia usar expressões como: “grupos ácidos fortes” e “grupos ácidos fracos” ao invés de “carboxílicos” e “fenólicos”. Uma outra questão que merece mais atenção refere-se a padronização do método com relação à detalhes experimentais tais como, o tipo de filtro²⁶ e a quantidade de amostra utilizada em cada determinação. Ainda assim, os valores de acidez obtidos por esta metodologia devem ter um significado operacional e não absoluto possibilitando somente a comparação com amostras que tenham sido tratadas da mesma maneira.

Capítulo VII – Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos geraram várias possibilidades de pesquisas visando uma melhor compreensão das interferências das ligações peptídicas e outros grupos como ésteres na determinação da acidez de SH. Uma breve descrição das motivações e dos tipos de estudos que serão realizados futuramente será feita a seguir.

Numa primeira etapa de trabalho, será dada continuidade à investigação sobre a interferência das ligações peptídicas e outros grupos como ésteres na determinação da acidez de SH. Para tal seria necessário conhecer o conteúdo de aminoácidos nas amostras estudadas. Devido à impossibilidade de determinar o conteúdo de aminoácidos das amostras de SH estudadas, um conjunto de amostras padrão do IHSS (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas), para as quais a quantidade de aminoácidos já foi determinada, será tomado como base de estudos posteriores. Assim, determinar-se-á a quantidade de grupos funcionais dessas amostras, pelo método de Schnitzer e Gupta³², correlacionando-os com a incidência dos aminoácidos. Além disso, a acidez dessas mesmas amostras será determinada por potenciometria para que se compare os dados obtidos com àqueles de Ritchie e Perdue²¹;

Capítulo VII – Perspectivas

A experiência adquirida com este trabalho também abriu novas possibilidades de estudo, entre as quais uma investigação mais detalhada sobre as turfas, que são um tipo de material rico em SH. Sabendo-se que a região sul catarinense possui expressivas reservas de turfa, inclusive situadas em uma região onde estão instaladas algumas minas de carvão, tornou-se ainda mais promissora essa nova possibilidade de trabalho. Através de um contato com o Professor Carlyle T. Bezerra de Menezes coordenador do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o qual também trabalha com esse tipo de material e que se dispôs a nos fornecer algumas de suas amostras de turfa, esses estudos poderão ser consolidados.

Em uma segunda etapa de estudo será feita a caracterização de amostras de turfa provenientes de uma turfeira localizada no município de Balneário Arroio do Silva (SC) através de espectroscopia no infravermelho, análise elementar de CHNS, microscopia eletrônica de varredura, análise por difração de raios X e extração das SH. Em colaboração com o Professor Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira da UFSC, far-se-á uma avaliação, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa, de forma qualitativa e quantitativa da composição das amostras de turfas e uma interpretação dos resultados obtidos com relevância biogeoquímica. E por fim, em colaboração com o Professor Dr. Nito Ângelo Debacher da UFSC, será avaliada a capacidade de adsorção de alguns metais em soluções aquosas, utilizando a turfa como adsorvente, permitindo assim o uso de turfas em sistemas de tratamento e ampliando as estratégias no controle de poluentes.

Capítulo VIII – Bibliografia

8 BIBLIOGRAFIA

- 1 – SCHNITZER, M., KHAN, S. U. **Humic substances in the environment**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1972. 1-55.
- 2 – SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. 69-90.
- 3 – KONOVA, M. M. **Soil organic matter, its nature, its role in soil formation and soil fertility**. Oxford: Pergamon Press, 1966. 124-151.
- 4 – STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, and reactions**. New York: John Willey and Sons, 1994.
- 5 – BARROS, M. C. P.; PAULA, J. R.; REZENDE, M. O. O. Caracterização físico-química do ácido húmico de solo da Ilha de Cananéia e de sua interação com Fé(III), Cu(II) e Cd(II). **Química Nova**, 1994. 17, 376-380.
- 6 – LOBARTINI, J. C.; TAN, K. H.; REMA, J. A.; GINGLE, A. R.; PAPE, C.; HIMMELSBACH, D. S. The geochemical nature and agricultural importance of commercial humic matter. **Science of the Total Environment**, 1992. 113, 1-15.
- 7 – KORDEL, W.; DASSENAKIS, M.; LINTELMANN, J.; PADBERG, S. The importance of natural organic matter for environmental processes in waters and soils. **Pure and Applied Chemistry**, 1997. 69, 1571-1600.
- 8 – SAAR, R. A.; WEBWER, J. H. Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. **Environmental Science and Technology**, 1982. 16, 866-872.
- 9 – MANAHAN, S. E. Interactions of hazardous-waste chemical with humic substances. In: SUFFET, I. H.; MacCARTHY, P. (Eds). **Aquatic humic substances: influence on fate and treatment of pollutants**. Washington, D. C. American Chemical Society, 1989. 83-92.

Capítulo VIII – Bibliografía

- 10 – RASHID, M. A. **Geochemistry of marine humic compounds**. New York: Springer-Verlag, 1985. 67-90.
- 11 – KILLOPS, S. D.; KILLOPS, V. J. **An Introduction Organic Geochemistry**. New York: John Willey and Sons, 1993. 95-106.
- 12 – SCHNITZER, M. **Humic substances: chemistry and reactions**. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1978. 1-64.
- 13 – SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, 1993. 80, 29-30.
- 14 – SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, 1997. 162, 115-130.
- 15 – SEIN, L. T.; VARNUM, J. M.; JANSEN, S. A. Conformational modeling of a new building block of humic acid: approaches to the lowest energy conformer. **Environmental Science and Technology**, 1999. 33, 546-552.
- 16 – STEELINK, C. Implications of elemental characteristics of humic substances. In: AIKEN, G. R.; MCKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MACCARTHY, P. **Humic substances in soil, sediments and water**. (Eds). New York: Wiley Interscience, 1985. 457-476.
- 17 – SENESI, N.; FELICI, M. **Interazioni tra sostanza organica e pesticidi**. In: NANNIPIERI, P. **Ciclo della sostanza organica nel suolo**. (Eds). Bologna: Patron Editore, 1993. 197-238.
- 18 – MARTELL, A. E. **The designs and synthesis of chelating agents**. New York: Elsevier, 1981.
- 19 – STEINBERG, C. E. W.; MARKUS, M.; BRÜGGEMANN, R.; PERMINOVA, I. V.; YASHCHENKO, N. Y.; PETROSYAN, V. S. **International Rev. Hydrobiology**, 2000. 85, 253-266.

Capítulo VIII – Bibliografía

- 20 – MASINI, J. C.; ABATE, G.; LIMA, E. C.; HAHN, L.C.; NAKAMURA, M. S.; LICHTIG, J.; NAGATOMY, H. R. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic substances. **Analytica Chimica Acta**, 1998. 364, 223-233.
- 21 – RITCHIE, J. D.; PERDUE, E. M. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 2003. 67, 85-96.
- 22 – MARSHALL, S. J.; YOUNG, S.D; GREGSON, K. Humic acid-proton equilibria: a comparison of two models and assessment of titration error. **European Journal of Soil Science**, 1995. 46, 471-480.
- 23 – SANTOS, E. B. H.; ESTEVES, V. I.; RODRIGUES, J. P. C.; DUARTE, A. C. Humic substances' proton-binding equilibria: assessment of errors and limitations of potentiometric data. **Analytica Chimica Acta**, 1999. 392, 333-341.
- 24 – SIERRA, M. M. D.; AREND, K.; FERNANDES, A. N.; GIOVANELA, M.; SZPOGANICZ, B. Application of potentiometry to characterize acid and basic sites in humic substances. Testing the BEST7 program with weak-acid mixture. **Analytica Chimica Acta**, 2001. 89-98.
- 25 – GILLAM, A. H.; RILEY, J. P. Microscale functional group analysis of marine and sedimentary humic substances. **Analytica Chimica Acta**, 1982. 141, 287-299.
- 26 – PERDUE, E. M. Acidic functional groups of humic substances. In: AIKEN, G. R.; et al. (Eds). **Humic substances in soil, sediment and, water: geochemistry, isolation, and characterization**. New York: John Wiley and Sons, 1985. 493-526.
- 27 – BOWLES, E. C.; ANTWEILER, E. C.; MacCARTHY, P. Acid-base titrations and hydrolysis of fulvic acid from Suwannee River, GA: Interaction, properties, and proposed structures. In: AVERETT, R. C.; et al. (Eds). **Humic substances in the Suwannee River**. USGS Open File Report, 1989. 209-229.

Capítulo VIII – Bibliografia

- 28 – LEENHEER, J. A.; WERSHAW, R. L.; REDDY, M. M. Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia. 1. Minor structures. **Environmental Science and Technology**, 1995. 29, 393-398.
- 29 – SEYMOR, M. D.; CLAYTON, J. W.; FERNANDO, Q. Determination of pK_a values of acid components in atmospheric condensates by linearization of segmented titration curves. **Analytica Chimica Acta**, 1977. 49, 1429-1432.
- 30 – AREND, K. Determinação de grupos funcionais e estudo das características de complexação de compostos húmicos sedimentares por métodos químicos e potenciométricos. **Dissertação de Mestrado em Química – UFSC**, 2001.
- 31 – MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **Determination and use of stability constants**. VCH Publishers, New York. 1992.
- 32 – SCHNITZER, M.; GUPTA, U. C. Determination of soil organic matter. **Soil Science**, 1965. 29, 74-277.
- 33 – HOLTZCLAW, K. M; SPOSITO, G. Analytical properties of soluble, metal-complexing fractions in sludge-soil mixtures: IV. Determinations of carboxyl groups in fulvic acid. **Soil Science American Journal**, 1979. 43, 318-323.
- 34 – SIERRA, M. M. D.; FERNANDES, A. N.; SZPOGANICZ, B. Influence of amide linkages on acidity determinations of humic substances. Testing with model-mixtures. **Talanta**, 2003. In Press.
- 35 – KERNDORFF, H.; SCHNITZER, M. Humic and fulvic acids as indicators of soil and water pollution. **Water, Air, Soil Polluted**, 1979. 12, 319-329.
- 36 – EL-SAYED, M. A.; NAGA, W. M. A.; BELTAGY, A. I.; HALIM, Y. Sedimentary humic substances isolated from a coastal lagoon of the Nile Delta: physical and chemical characteristics. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 1996. 43, 205-215.

Capítulo VIII – Bibliografia

- 37 – CEPPI, S. B.; CADILE, M. S.; VELASCO, M. I.; PAULI, C. P. Caracterización de ácidos húmicos de dos suelos (molisol y entisol) de la provincia de Córdoba, Argentina. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, 1994. 39, 289-297.
- 38 – LAPOLLI, E. M.; MOREIRA, J. C.; ZARDO, S. M.; VIEIRA, V. F. Carta dos elementos do meio ambiente – Parque da Lagoa do Peri. **Memorial descritivo e mapas**. Florianópolis: Laboratório Associado de Sensoriamento Remoto de Santa Catarina, 1998. 58.
- 39 – CABRAL, L. O. Bacia da Lagoa do Peri: sobre as dimensões da paisagem e seu valor. **Dissertação de Mestrado em Geografia – UFSC**, 1999. 7-25.
- 40 – COLLINS, C. H.; COLLINS, K. E.; ACKERHALT, R. E. Cation exchange separation of ^{51}Cr -labeled species in aqueous Cr(VI)-Cr(III) solution. **Journal of Radioanalytical Chemistry**, 1971. 8, 263-267.
- 41 – THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. Preparative isolation of aquatic humic substances. **Environmental Science and Technology**, 1981. 15, 463-466.
- 42 – LUIZ, M. T. B. Estudos dos equilíbrios de formação de complexos ternários formados entre o 1, 4, 7, 13, 16, 19-hexaza-10,20-dioxaciclotetracosano (obisidien) e os sistemas Cu(II)-dipeptídeos e Zn(II)-dipeptídeos. Hidrólise e deuteração da glicilglicina. **Tese de Doutorado em Química – UFSC**, 1996.
- 43 – RICE, J. A.; MacCARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. **Organic Geochemistry**, 1991. 17, 635-648.
- 44 – STUERMER, D. H.; PETERS, K. E.; KAPLAN, I. R. Source indicators of humic substances and protokerogen: stable isotope ratios, elemental composition and electron-spin resonance spectra. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 1978. 42, 989-997.
- 45 – MEYERS, P. A.; ISHIWATARI, R. Lacustrine organic geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. **Organic Geochemistry**, 1993. 26, 867-900.

Capítulo VIII – Bibliografia

- 46 – GIOVANELA, M.; SOLDI, M. S.; PARLANTI, E., SIERRA, E. J. S.; SIERRA, M. M. D. **Chemical Geological**, 2003. Aceito.
- 47 – SILVERSTEIN, R. M; BASSLER, C. G.; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley and Sons, 1974.
- 48 – MALCOLM, R. L.; MACCARTHY, P. Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. **Environmental Science and Technology**, 1986. 20, 904-911.
- 49 – SIERRA, M.M.D., GIOVANELA, M.; ESTEVES, V. I.; DUARTE, A. C.; FRANSOZO, A., SIERRA, E. J. S. **Organic Geochemistry**, 2003. Aceito.
- 50 – MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Organic chemistry**. New York: Allyn and Bacon, Inc., 1974
- 51 – PRADO, A. G. S.; SOUZA, S. M.; SILVA, W. T. L.; REZENDE, M. O. Desenvolvimento de um sistema de filtração e titulação para determinação da acidez de ácidos húmicos. **Química Nova**, 1999. 6, 894-896.