

Caracterização das frações das substâncias húmicas de diferentes tamanhos moleculares

S. M. Sanches¹, S.X. de Campos², E. M. Vieira^{3*}

¹Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, EESC, USP- São Carlos – SP.

²Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR.

³Instituto de Química de São Carlos, USP, Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13560 -970, São Carlos - SP.

*eny@iqsc.usp.br

Resumo: Neste trabalho realizou-se a extração das substâncias húmicas (SH) provenientes da turfa coletada às margens do rio Mogi-Guaçu, segundo metodologia descrita por Rosa et al., 2000. As SH foram fracionadas em um equipamento de ultrafiltração em três faixas de tamanhos moleculares 30 – 100 KDa, <30 KDa e >100 KDa. As frações foram caracterizadas por diferentes técnicas analíticas, infravermelho (IV), análise elementar, espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Verificou-se que as frações de menor tamanho molecular (30 – 100 KDa e <30 KDa) possuem um maior número de moléculas com oxigênio ligados, enquanto que a fração de maior tamanho molecular (>100 KDa) apresentou um maior número de moléculas aromáticas. Através dos resultados das análises elementares e de ressonância paramagnética eletrônica, constatou-se que a fração <30 KDa apresentou uma menor porcentagem de carbono, nitrogênio e hidrogênio e uma menor quantidade de radicais livres em relação as demais, indicando que esta fração possui um menor número de anéis aromáticos conjugados. Já nas análises por IV foram observadas bandas características das SH.

Palavras-chave: substâncias húmicas; caracterizações; turfa.

Introdução

A turfa é um material geologicamente antigo, rico em matéria orgânica, formado pela decomposição lenta, tanto química como microbiológica, de materiais de origem vegetal em ambientes úmidos, ácidos, de pouca oxigenação como pântanos e várzeas de rios e lagos. No Brasil estima-se existir cerca de 1,6 bilhões de metros cúbicos de material turfoso, distribuídos em mais de duzentas turfeiras ao longo do território nacional [1].

A prospecção geológica no Estado de São Paulo, executada pelo Instituto de Pesquisas

Tecnológicas (IPT), determinou a localização e caracterizou os principais depósitos sendo, os mais expressivos os situados nos vales dos rios Mogi-Guaçu, Ribeira do Iguape e Jacaré-Pepira [2]. Tradicionalmente, a turfa tem sido utilizada na agricultura como fertilizante e na manufatura de culturas em vasos ou estufas. Entretanto, nas últimas décadas, a turfa vem sendo estudada como uma alternativa de adsorvedor natural, aplicado ao tratamento de água e efluentes contaminados por metais pesados e outras substâncias tóxicas [3]. A turfa pode ser convertida para vários produtos, como álcool, ração animal, vita-

minas e outros produtos biologicamente ativos [4]. Na área medicinal a turfa vem sendo utilizada como uma nova ferramenta no combate a acnes, dermatites e artrites, sendo seus benefícios amplamente estudados no mundo todo [5].

Os principais constituintes da turfa são compostos conhecidos como substâncias húmicas (SH) (cerca de 80 %). As SH são formadas aleatoriamente a partir da decomposição de tecidos de plantas, do metabolismo ou do catabolismo de microrganismos ou de ambos, e são de fundamental importância para o crescimento de plantas e para o controle bioquímico do carbono orgânico no ecossistema global. Sua estrutura é de difícil definição, devido sua química heterogênea e sua variabilidade geográfica [6]. Apesar de até o momento não se ter uma estrutura definida para as SH, muitos pesquisadores tem-se utilizado de diferentes técnicas analíticas que de, alguma forma, possam trazer informações a respeito dessas moléculas. Dentre essas técnicas pode-se destacar: análise elementar, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), espectroscopia no infravermelho (IV), espectroscopia no ultravioleta visível (UV/Vis) [7-9].

O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar frações de SH extraídas de turfa de diferentes tamanhos moleculares utilizando-se técnicas químicas e espectroscópicas de análise.

Material e Métodos

Procedimento

Coleta e preparo das amostras

As amostras de turfa utilizadas neste trabalho foram coletadas em uma turfeira às margens do Rio Mogi-Guaçu, no Km 40 da rodovia SP-255, no município de Luís Antônio, Estado de São Paulo. Foram coletadas a uma profundidade de 45 cm, por intermédio de um amostrador Hiller, armazenadas em sacos de polietileno e secas ao ar livre, trituradas em um equipamento tipo mandíbula e peneirada em malha 2 mm para posterior extração das SH.

Extração das SH

Na extração das SH foi utilizado o método desenvolvido por Rosa et al., 2000 [10, 11]. Os

parâmetros utilizados foram: extração em solução 0,5 mol L⁻¹ de hidróxido de potássio (KOH); tempo de agitação de 4 horas; razão turfa/extrator 1:20 (m/v); temperatura ambiente; decantação pôr 48 horas. A decantação, foi realizada com a finalidade de separar-se a humina insolúvel em pH básico das SH (ácido fúlvico e húmico), solúvel neste pH. Após a decantação, coletou-se o sobrenadante (ácido húmico e fúlvico) para a realização da diálise, com a finalidade de retirar-se o excesso de sais. Nesta etapa adicionou-se o sobrenadante em saquinhos feito com papel celofani, os quais foram colocadas em solução de ácido clorídrico (HCl) 1%, para redução do pH. Após esta etapa os saquinhos foram transferidos para uma caixa de água e cobertos com água não clorada. O fluxo de entrada e saída da água foi controlado. Este processo foi realizado por 15 dias, até teste negativo de íons cloretos, empregando para tanto nitrato de prata (AgNO₃). Após esta etapa as SH foram retiradas dos saquinhos, guardadas em recipientes apropriados e armazenadas no freezer a uma temperatura em torno de -4°C para posterior fracionamento.

Fracionamento das SH em diferentes tamanhos moleculares

As SH, depois de extraídas, foram filtradas em papel de filtro grosseiro (3 µm), e depois em membranas de 0,45 µm da marca Millipore com diâmetro de 90 mm. A amostra foi fracionada nas faixas de tamanhos moleculares >100 KDa, 30 - 100 KDa, <30 KDa, no equipamento de Ultrafiltração (Vivaflow 50) equipado com bomba peristáltica e duas membranas em paralelo de polyethersulfone, o que aumenta a capacidade de filtração. Para o fracionamento em diferentes tamanhos moleculares foi adotado o método de concentração da amostra, já que se consegue um maior volume de amostra fracionada [12]. A vazão máxima utilizada foi de até 300 mL min⁻¹ com 1,5 bar de pressão. Uma alta vazão é importante por que promove o deslocamento de compostos acumulados sobre a superfície das membranas devido ao fluxo tangencial do filtrado e evita possível obstrução dos poros [13].

Liofilização das frações

Para a realização das caracterizações foram liofilizados cerca de 200 mL de cada

fração em um liofilizador da marca Edwards, modelo F101-02-000.

Caracterização das frações das SH

Espectroscopia no infravermelho (IV)

O espectrômetro de IV por transformada de Fourier utilizado foi o da marca Bomem MB-102 do Instituto de Química de São Carlos. Para análise foram feitas pastilhas do material liofilizado na proporção de 1 - 100 (1mg de amostra e 100 mg de KBr). Foram realizadas 16 varreduras com 4 cm^{-1} de resolução nos espectros obtidos.

Espectroscopia na região do ultravioleta/ visível (UV/Vis)

Pesou-se 2,0 mg das substâncias húmicas, a qual foi dissolvida em 100 mL de solução de bicarbonato de sódio $0,005\text{ mol L}^{-1}$. Foi obtido um espectro no UV/Vis dessas soluções, anotando-se as absorvâncias obtidas nos comprimentos de onda de 465 nm e 665 nm. Utilizou-se um Espectrofotômetro de UV/Visível Hitachi modelo U3501.

Análise elementar

As análises elementares foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos, utilizando-se o aparelho CE Instruments EA 1110 CHNS – O da marca Fisons, com detector de condutividade térmica. Quantificou-se carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre (em porcentagem em massa). O teor de oxigênio foi obtido pela diferença $[100 - (\%C + \%H + \%N + \%S)]$ [14].

Análises de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

As análises feitas por EPR para quantificar os radicais livres semiquinonas foram realizadas usando o espectrômetro de EPR da Bruker- EMX cavidade retangular, banda X ($\approx 9,0\text{ GHz}$) em temperatura ambiente da, Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) de São Carlos. Para a quantificação dos radicais livres tipo semiquinona, foi utilizado o método do padrão secundário [15], com um cristal de rubi (Al_2O_3) contendo 0,5% de Cr^{+3} por peso. Seu fator g é de 1,263 e, portanto, não interfere com o sinal do radical livre semiquinona, cujo valor de g está em torno de 2,003 [16].

Foram colocados cerca de 20 mg de cada fração de SH em tubos de quartzo. As quantidades de radicais livres foram determinadas. A potência de microondas (P) utilizada foi de 0,08 mW e a amplitude de modulação de 2 G_{pp} (Gauss pico a pico). Foram utilizadas 9 varreduras para as medidas de radicais livres. Foi feita uma curva de saturação para obtenção das condições ótimas de análise dos radicais livres. Para isto foram realizadas 6 medidas em potência baixa com passo de 2dB variando a potência de 3,173 nW a $50,29\text{ }\mu\text{ W}$, 3 medidas em potência média com passo de 2dB variando a potência de $79,7\text{ }\mu\text{ W}$ a 0,797 mW e 1 medida em potência alta com passo de 6 dB variando a potência de 3,181 mW a 50,41 mW. Foi feita uma varredura de 5000 Gauss para verificar íons paramagnéticos nas amostras, utilizando uma potência de 1 mW e amplitude de modulação de 10 G_{pp} . Calculou-se o fator g para verificar se o radical encontrado nas frações é do tipo semiquinona. Para este cálculo foi utilizado o padrão de DPPH (α' difenil β picril hidrozil) com valor conhecido de g (2,0036) e o software Winer Sinfonia para simulação de espectros.

Resultados e Discussão

Análise de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia no IV tem sido utilizada para caracterizar as SH fornecendo informações

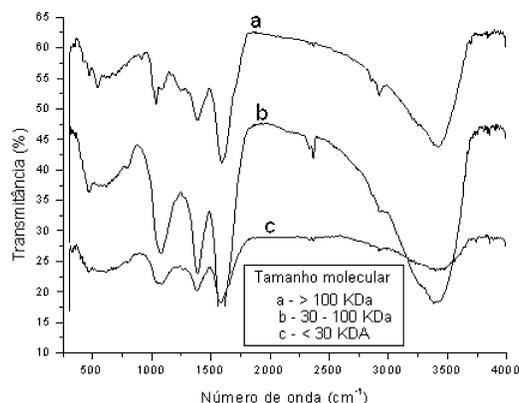


Figura 1. Espectros de infravermelho para todas as frações das SH.

estruturais e funcionais das moléculas que as compõem. Na Figura 1 estão apresentados os espectros de IV para todas as frações das SH.

Analisando-se os espectros apresentados na Figura 1 observaram-se alguns picos característicos das SH. Todas as frações apresentaram uma banda larga e intensa, em torno de 3419 cm^{-1} , que é atribuída a uma superposição de bandas, que estão relacionadas com estiramento de O-H de grupamentos carboxílicos, fenólicos, álcoois e da água ligada [12]. Já na região de 3000 a 2900 cm^{-1} observa-se o aparecimento de duas bandas, que são atribuídas respectivamente aos estiramentos anti-simétrico e simétrico de C-H dos grupos alifáticos [17]. A banda intensa na região de 1600 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ do anel, e as vibrações do esqueleto aromático. Esta banda também pode ser atribuída ao estiramento anti-simétrico do grupo carboxilato $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ e ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ do grupo COOH, devido ao H ligado ao grupo OH em posição orto, como no ácido salicílico [18]. Em todas as frações de diferentes tamanhos moleculares das SH verificou-se uma banda na região 1380 cm^{-1} que pode ser atribuída tanto à deformação $\delta(\text{OH})$, quanto ao estiramento $\nu(\text{C}-\text{O})$ de grupos fenóis e também ao estiramento anti-simétrico de COO^- . Na região de 1250 cm^{-1} , tem-se uma banda característica de $\nu(\text{C}-\text{O})$ de alcóois, fenóis e grupos carboxílicos [19].

As bandas na região de 1000 a 1100 cm^{-1} são referentes a estiramentos de C-O de carboidratos e alcóois e ainda as vibrações de ligações C-C de alifático ou CH de anéis aromáticos [19]. Apesar de a magnitude das absorções dos espectros de IV não poderem ser comparados diretamente [20], eles podem dar uma indicação

de mudanças no material, para as diferentes frações estudadas, como também ser útil para comparações com as outras técnicas de caracterização empregadas.

Ultravioleta Visível e Razão E_4/E_6

A razão E_4/E_6 corresponde à razão entre as absorvâncias em 465 e 665 nm . É freqüentemente utilizada por muitos cientistas para as caracterizações das SH [15]. Esta razão está diretamente relacionada à condensação estrutural, podendo ser indicativo do grau de humificação, aromaticidade, massa molar e conteúdo ácido das SH [15]. Um baixo valor da razão E_4/E_6 , indica alto grau de condensação estrutural, enquanto que um alto valor de E_4/E_6 resulta em baixa condensação estrutural. A razão E_4/E_6 é influenciada pelo tamanho da molécula, pH do meio, conteúdo de oxigênio, carbono, grupos carboxílicos, origem e idade [7]. Na Tabela 1 são apresentados os valores das razões E_4/E_6 para todas as frações das SH.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se que a fração de maior tamanho molecular ($>100\text{ KDa}$) apresentou o menor valor para razão E_4/E_6 (3,09). Este valor (3,09) indica que esta fração de SH apresenta uma maior condensação estrutural, ou seja, maior número de estruturas aromáticas em comparação a estruturas alifáticas, em decorrência de um alto grau de humificação, [18]. Já a fração de SH de tamanho molecular $<30\text{ KDa}$ apresentou um alto valor da razão E_4/E_6 (9,00), indicando que esta fração possui uma menor condensação estrutural. Este alto valor (9,00) indica uma maior presença de estruturas alifáticas do que aromáticas devidas esta apresentar uma alta absorvância no comprimento de onda 465 nm em relação ao de 665 nm ,

Tabela 1. Valores das absorvâncias em 465 e 665 nm e valores da razão E_4/E_6 .

Frações	Absorvâncias		Razão E_4/E_6
	465 nm	665 nm	
>100 KDa	0,179	0,058	3,09
.30-100 KDa	0,190	0,025	7,60
<30 KDa	0,81	0,09	9,00

que é a região de absorbância dos compostos aromáticos [19]. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores que estudaram SH de diferentes matrizes e concluíram que a razão E_4/E_6 decresce com o aumento do tamanho molecular e do grau de condensação [20].

Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é uma técnica utilizada para medir a quantidade de radicais livres em uma amostra de SH. Um parâmetro que pode influenciar altamente as propriedades e reatividades redox, da matéria orgânica natural, com muitos substratos orgânicos e inorgânicos em diferentes ambientes [21-22]. As Figuras 2 e 3 apresentam os espectros de EPR das frações de SH. A Tabela 2 apresenta os valores da quantidade de radicais livres por grama de amostra.

Observou-se por meio dos espectros de EPR (Figs. 2 e 3) e pelos valores da Tabela 2 que a forma do sinal, e os valores do fator g encontrados são devido a presença dos radicais livres semiquinonas.

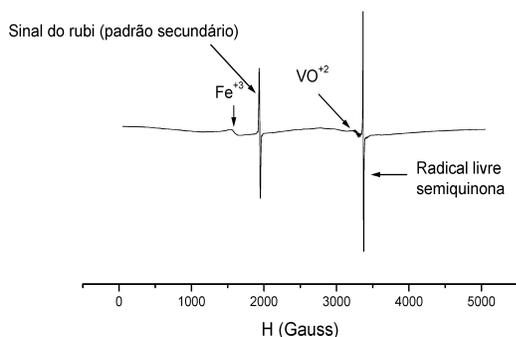


Figura 2. Espectro de EPR para a fração de >100 KDa.

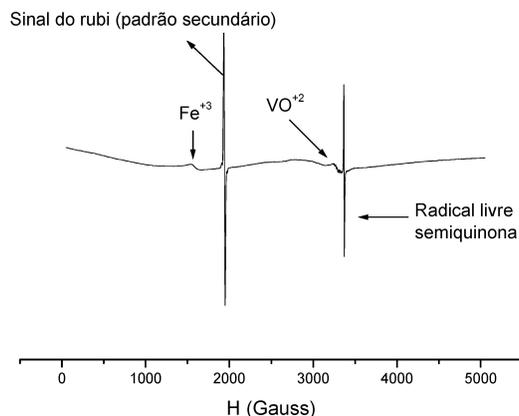


Figura 3. Espectro de EPR para a fração 30 - 100 KDa.

Essas características estão relacionadas com a presença de radicais livres semiquinonas naturais conjugados em um extenso sistema aromático.

Em todas as frações aparecem os sinais característicos das espécies Fe^{+3} com spin alto 5/2 e $g= 4,3$ e do VO^{+2} com spin 7/2, ligados a grupos funcionais das SH. A quantidade de radicais livres encontrados diminui das frações de maior tamanho molecular (>100 KDa) para a de menor (<30 KDa). Isso pode ser uma indicação de que a fração de menor tamanho molecular possui um menor número de anéis aromáticos conjugados do que as de maior tamanho molecular. Outra indicação do nível de condensação do material e assim a sua maior maturidade, é o número do fator g [23]. Em SH com maior grau de humificação e desta forma com maior número de grupos condensados, os valores de g são menores, como o valor encontrado para a fração >100 KDa. O número de radicais livres também

Tabela 2. Valor da quantidade de radicais livres semiquinonas por massa (g) de cada fração.

Fração	Quantidade de radicais livres spins/g	Fator g
>100 KDa	$2,87 \times 10^{18}$	2,0033
30-100 KDa	$1,40 \times 10^{18}$	2,0042
<30 KDa	$1,29 \times 10^{18}$	2,0043

está diretamente relacionado com a quantidade de grupos fenólicos contidos, ou seja, quanto maior o número de spins maior o número de grupos fenólicos [24]. O conhecimento e a quantificação dos radicais livres semiquinonas é importante em pesquisas com SH, sendo estes radicais um dos responsáveis pela coloração de águas provocada pela presença de SH [25], influenciando ainda nas condições redox e ciclagem de metais no corpo aquático [5]

Análise elementar

A análise elementar foi realizada com o objetivo de se conhecer as porcentagens de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S) que fazem parte da macromolécula de SH. A Tabela 3 apresenta os valores da composição elementar nas diferentes frações de diferentes tamanhos moleculares das SH e as razões atômicas H/C, O/C e C/N.

Observa-se na Tabela 3 que os valores da composição elementar e das razões atômicas foram diferentes em todas as frações. Verifica-se que ocorre uma diminuição das porcentagens de C, N e H da maior fração (> 100 KDa), para a menor (<30 KDa), enquanto que para a porcentagem de O ocorreu o inverso. BUTLER [26] sugeriu que ocorre um aumento da porcentagem de N, com o aumento do tamanho molecular das SH, o que é claramente observado nos resultados apresentados na Tabela 3.

Em trabalhos realizados por Francioso [8,9] foi fracionado por meio da UF, os ácidos

húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) extraídos de turfa e observaram que as menores frações (10 - 20 KDa e 1-5 KDa) apresentaram menores porcentagens de C e maiores de O, já para as frações maiores (>300 e 100-300 Kda) observou-se o contrário. Estes dados estão de acordo com os obtidos e encontram-se apresentados na Tabela 3.

Analisando-se a Tabela 3 observa-se que a razão O/C apresentou um aumento com a diminuição do tamanho molecular. Isto pode indicar que as frações de menor tamanho molecular (30 -100 KDa e <30 KDa) possuem uma concentração relativamente alta de O ligados a grupamentos alquílicos e de ácidos carboxílicos [27]. Nesse trabalho os autores verificaram também que AH de diferentes localidades possuíam uma razão menor de O/C do que os AF. E ainda, segundo IBARRA [28], uma diminuição na razão O/C significa um aumento no número de anéis condensados.

Outra confirmação do grau de condensação dos anéis aromáticos é a razão H/C [27]. Quanto menor for essa razão, maior a porcentagem desses anéis. Assim observa-se que a fração com maior massa molar (>100 KDa) possui uma maior quantidade desses anéis, como já verificado pelos valores da razão O/C.

A razão C/N é um indicativo da origem das SH em ambientes naturais. Razões C/N abaixo de 20 podem indicar que o processo de humificação foi mais favorecido pela atividade microbiana, como é verificado para SH extraídas de solos [29]. Para razões C/N acima de 20 acre-

Tabela 3. Composição elementar das frações de tamanhos moleculares >100KDa, 30 – 100 KDa e <30 KDa de substâncias húmicas, e as razões atômicas H/C, O/C e C/N.

Frações	Massa %					Razões atômicas		
	C	H	N	O*	S	H/C	O/C	C/N
>100 KDa	42,98	4,52	1,97	50,52	0,00	1,26	0,89	25,57
30 – 100 KDa	31,89	5,92	1,83	60,35	0,00	2,22	1,42	27,54
< 30 KDa	23,39	3,87	0,94	71,80	0,00	1,99	2,31	28,91

A porcentagem de O foi calculada por diferença

ditase que a maior contribuição para a humificação do material seja à predominância de plantas vasculares [30]. Assim, por meio dos resultados apresentados na Tabela 3 acredita-se que as SH empregadas neste estudo sejam provenientes da decomposição de plantas vasculares.

Conclusões

Conclui-se por meio dos resultados das caracterizações que a fração da SH de tamanho molecular (>100 KDa) possui uma maior concentração de grupos aromáticos. Já as frações de tamanho molecular (30 – 100 KDa e <30 KDa), apresenta uma maior porcentagem de grupos com oxigênio ligados, tais como ésteres, fenólicos, carboxílicos e oxigênios ligados em cadeias

alifáticas (grupos metoxi), os quais foram constatados pelos resultados de EPR, análise elementar e IV. A maior presença desses grupos oxigenados nessas frações de menor tamanho molecular, significa que essas poderiam ter um grande poder de complexação ou quelação o que resultaria em amostras com maior poder de remoção de compostos inorgânicos e orgânicos, para uso como extrator de poluentes ambientais.

Agradecimentos

S. M. Sanches agradece a CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Recebido em: 23/01/2007

Aceito em: 14/03/2007

Sérgio M. Sanches, Eny M. Vieira. Characterization of the fractions of humics substances of different molecular sizes.

Abstract: In this work have been realized the extraction of húmic substances (SH) proceeding from the peat collected to the edges of the river Mogi-Guaçu, according to described methodology for Rosa et al., 2000. The SH had been fractions in an equipment of ultrafiltration in three molecular sizes: between molecular sizes 30 -100 KDa, less than 30 KDa molecular sizes and more than 100 KDa. The fractions had been characterized by different analytical techniques such electron paramagnetic resonance (EPR), infrared spectroscopy, elemental analysis and spectroscopy in the region visible (UV/Vis). It was verified that the fractions of lesser molar mass between 30 – 100 KDa molecular sizes and less than molecular sizes presented a bigger number of molecules with oxygen while that the fraction of bigger molar mass more than 100 KDa molecular sizes presented a bigger number of aromatic molecules. Through the results of the elementary analyses and electronic paramagnetic resonance, the fraction evidenced less than 30 KDa showing smaller percentages of carbon, nitrogen and hydrogen and a smaller amount of free radicals in relation to the others, indicating that this fraction possess a smaller number of conjugated aromatic rings. Already in the analyses for IV characteristic bands of the SH had been observed.

Keywords: humics substances; characterizations; peat.

Referências

- [1] Plano 2015. Projeto 4, Oferta de energia elétrica, tecnologias, custos e disponibilidade, Eletrobrás, Rio de Janeiro, 1993.
- [2] S. M. Branco, *Natureza e agroquímicos*, Moderna, São Paulo, 1991, 56 p.
- [3] P. A. Brown, S. A. Gill, S. J. Allen, S. J. Wat. Res. 34 (2000) 3907.
- [4] S. X. Campos. *Influência das substâncias húmicas de diferentes massas molares na coagulação, floculação e sedimentação no tratamento de água*. São Carlos, 2004. 123p. Tese (Doutorado) - EESC – Escola de Engenharia de São Carlos, universidade de São Paulo.
- [5] V. Summa, F. Tateo, *Appl. Clay. Sci.* 15 (1999) 477.
- [6] A. Piccolo, *Humus and soil conservation*, Elsevier, Amsterdam, 1996.
- [7] F. J. Stevenson, *Humus chemistry: genesis, composition reactions*, John Wiley, New York, 1994, 496p.
- [8] O. Francioso, S. Sanchez-Cortez, V. Tugnoli, C. Ciavatta, L. Sitti, C. Gessa, *App. Spec.* 50 (1996) 1165.
- [9] O. Francioso, S. Sanchez-Cortez, V. Tugnoli, C. Ciavatta, L. Sitti, C. Gessa, *App. Spec.* 52 (1996) 270.
- [10] D. Garcia, J. Cegarra, M. Abad, *Proc. Technol.* 48 (1986) 51.
- [11] A. H. Rosa, J. C. Rocha, M. Furlan, *Quim. Nova*, 23 (2000) 472.
- [12] M. B. O. Duarte, E. P. H. Santos, A. P. Duarte, *Anal. Chim. Acta.* 442 (2002) 155.
- [13] J. C. Rocha, A. H. Rosa, *Substâncias húmicas aquáticas interação com espécies metálicas*, Unesp, São Paulo, 2003, 120 p.
- [14] S. M. Griffith, M. Schnitzer, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 39 (1975) 861.
- [15] E. Tombácz, *Soil Sci.* 164 (1999) 814.
- [16] L. Martín-Neto, R. Rossel, G. Sposito, *Geoderma* 81 (1998) 305.
- [17] G. S. Prado, M. O. Rezende, *Quim. Nova* 48 (1999) 186.
- [18] R. M. Silverstein, G. C. Basseler, T.C. Morril, *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1994, 387p.
- [19] O. Francioso, S. Sánchez-Cortés, D. Casarini, J. V. Garcia Ramos, C. Ciavatta, C. J. Gessa, *Mol. Struct* 609 (2002) 137.
- [20] J. B. Christensen, D. L. Jensen, C. Gron, Z. Filip, T. H. Christensen, *Wat. Res.* 32 (1998) 152.
- [21] D. T. Scott, D. M. Mcknight, E. I. Blunt-Harris, S. Kolesar, D. R. Lovley, *Sci. Technol.* 32 (1998) 2984.
- [22] J. Chen, B. Gu, E.J. Leboeuf, H. Pan, S. Daí, *Chemosphere* 48 (2002) 59.
- [23] A. Jezierski, F. Czechowski, M. Jerzykiewicz, J. Drozd, *Appl. Magn. Reson.* 18 (2000) 127.
- [24] M. H. B. Hayes, P. Maccarthy, R. L. Malcolm, S. S. SWIFT, *Humic substances II: in search of structure*. Chichester: John Wiley, 1989.
- [25] R. P. Schwarzenbach, P. M. Gschwend, D. M. Imoden, *Environmental organic chemistry*, New York, 1993, p.445.
- [26] J. H. A. Butler, J. N. Ladd, *Aust. J. Soil Res.* 7 (1969) 229.
- [27] N. Belzile, H. A. Joly, H. Li, *J. Spectrosc.* 75 (1997) 14.
- [28] J.V. Ibarra, R. Juan, *Fuel* 64 (1985) 650.
- [29] P.N. Nelson, M.C. Dictor, G. Soulas, *Biol. Biochem.* 26 (1994) 1549.
- [30] P. A. Meyers, R. Ishiwatari, *Org. Geochem.* 20 (1993) 867.