UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS ISOLADAS DE VERMICOMPOSTO. PROPRIEDADES ÁCIDO-BASE E
DE COMPLEXAÇÃO COM ÍONS Cu(II).**

Sandro de Miranda Colombo

Dissertação de Mestrado

Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

SÃO PAULO
02/09/2005

“Isolamento, purificação e caracterização de substâncias húmicas isoladas de vermicomposto. Propriedades ácido-base e de complexação com íons Cu(II).”

**SANDRO DE MIRANDA
COLOMBO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química – Área: Química Analítica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. JORGE CÉSAR MASINI
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. NINA COICHEV
IQ – USP

Prof. Dr. ANDRÉ HENRIQUE ROSA
UNESP - Sorocaba

SÃO PAULO
11 DE NOVEMBRO 2005

Dedico essa dissertação a:

Ambrósio e Leonor (meus pais), Alfredo e Cecília (meus padrinhos de batismo) por todo amor, valores transmitidos na minha vida e apoio nesta etapa;
minha noiva Cibele, minhas irmãs Patrícia e Daniela, minha avó Maria e meu sobrinho Pedro pelo amor, apoio e compreensão;
Prof. Dr. Jorge C. Masini pela amizade, paciência, oportunidade e por sua inestimável contribuição científica a mim permitida.

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Orlando Guarilha Junior pelo apoio;

À Prof^ª. Dr^a Silvia H. P. Serrano;

À Prof^ª. Dr^a. Nina Coichev;

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate;

À Prof. Dr^a Luciana Bagdeve pela amizade e grande auxílio;

Ao Carlos Martin Infante Cordova;

Aos colegas de laboratório;

Aos técnicos da Química Analítica;

Aos amigos Maurício de Mange, Rodrigo, Marcos, Gustavo, Francisco, Guilherme e suas respectivas famílias;

Aos Professores Nilton, Edílson e Vera Lúcia, Marcos Müller, Cecília, Estela,

Vanderlei, Celso, Sandra Célia, Sylvio, Wladimir, Lenice, Marco Venício,

Bernadete, Leide, Marlene, Penha, Eliana, Izabel, Silvia, Dalma, Mauro, Nancy,

Vivian e Roseli;

Aos amigos Dona Eva, Marli, Ernani, Cláudio, Laércio e Vagner.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Estudos.

RESUMO

Estudaram-se as propriedades ácido base e de complexação com íons Cu(II) dos ácidos húmico (AH) e fúlvico (AF) extraídos de vermicomposto. O isolamento e a purificação foram realizados de acordo com o método descrito pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Estudaram-se as propriedades ácido-base por titulação potenciométrica em meio de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ utilizando-se funções de Gran modificadas. Caracterizaram-se cinco classes de grupos ionizáveis, constatando-se predominância de grupos carboxílicos sobre grupos fenólicos e amínicos, especialmente para o AF, cuja acidez total foi maior do que a do AH.

Estudaram-se as propriedades complexantes com íons Cu(II) nos pH 4, 5 e 6 por titulação potenciométrica com um eletrodo íon-seletivo para Cu(II), adotando-se os métodos de Scatchard e de regressão não linear com a equação de Langmuir para tratamento de dados. Em pH 5 e 6 caracterizaram-se duas classes de sítios de complexação, enquanto em pH 4, apenas uma classe foi caracterizada. De maneira geral, a estabilidade e a capacidade de complexação aumentaram com o pH, indicando a competição de prótons pelos sítios de complexação. Os resultados indicam maior estabilidade e capacidade para a complexação com AH em relação ao AF. Esta tendência foi verificada por funções diferenciais de equilíbrio diferenciais aplicadas em baixos graus de ocupação de sítios.

ABSTRACT

Acid base and complexation with Cu(II) ions were studied for humic (AH) and fulvic (AF) acids extracted from vermicompost. The isolation and purification was performed according the procedure described by the International Humic Substances Society (IHSS). The acid base properties were studied by potentiometric titration in 0,10 mol L⁻¹ KNO₃ using modified Gran functions. Five classes of ionizable sites were characterized, showing a predominance of carboxylic over phenolic and aminic groups, especially for AF, which has total acidity larger than the one determined for AH.

Complexing properties with Cu(II) ions were studied by potentiometric titration at pH 4, 5 and 6 using Cu(II) ion-selective electrode. Data treatment was performed using the Scatchard method, as well as non-linear regression with the Langmuir equation. At pH 5 and 6, two classes of binding sites were characterized, but at pH 4 only a single complexing site was characterized. Stability and capacity increased with pH, suggesting competition of protons by the binding sites. The results indicate larger stability and capacity for complexation with AH in comparison with AF. This trend was also verified by differential equilibrium functions at low degree of site occupation.

Índice:

I – Texto

1.1 Substâncias Húmicas:.....	15
1.1.1 Histórico:	17
1.1.2 Classificação das Substâncias Húmicas (SH):.....	19
1.1.3 Mecanismos propostos para formação das substâncias húmicas:	21
1.1.4 Estruturas propostas para as substâncias húmicas:.....	23
1.1.5 Aplicações das substâncias húmicas:	27
1.1.6 Vermicomposto:	28
1.2 O cobre:	30
1.2.1 – O ciclo biogeoquímico:	30
1.2.2 Principais usos e aplicações:	32
1.2.3 Transporte e distribuição ambiental:	33
1.2.3.1 Ar:.....	33
1.2.3.2 Água e sedimento:	34
1.2.3.3 Solo:.....	35
1.2.3.4 Resíduos sólidos e esgoto:.....	37
1.2.4 Bioacumulação:	38
1.2.4.1 – Microrganismos:.....	38
1.2.4.2 – Plantas e animais aquáticos:.....	38
1.2.4.3 – Plantas e animais terrestres:.....	39
1.2.4.4 Síndrome tóxica:.....	40
1.3 Complexação:	41
1.3.1 Técnicas analíticas:.....	41
1.3.2 Potenciometria:	41
1.3.2.1 Princípio das titulações potenciométricas:	42
1.3.2.2 Eletrodos no estado sólido:.....	42
1.3.2.3 Características de eletrodos íon-seletivos:.....	43

2.0 OBJETIVOS:	44
3.0 PARTE EXPERIMENTAL:	45
3.1 Equipamentos e materiais:	45
3.2 Soluções e reagentes:	45
3.2.1 Soluções de NaOH:	45
3.2.2 Soluções de Cu(II):	46
3.3 Amostra:	46
3.4 Procedimento de extração e purificação:	47
3.4.1 Ácidos húmicos:	47
3.4.2 Ácido fúlvico do húmus de minhoca:	48
3.4.3 Determinação do teor de cinzas:	48
3.5 Caracterização ácido-base:	49
3.5.1 Procedimento de calibração dos eletrodos:	49
3.5.2 Titulação das amostras:	53
3.5.2.1 Curvas de titulação de ácidos húmico e fúlvico:	53
3.6 Método das Funções de Gran Modificadas:	53
4.0 Potenciometria de Complexação:	55
4.0.1 Procedimentos:	56
4.1 Métodos de cálculo:	59
4.1.1 Cálculo de concentração:	59
4.1.1.1 Método de Scatchard:	59
4.1.1.2 Regressão não linear:	62
4.1.2 Funções de Equilíbrio Diferenciais (DEF):	62
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO:	66
5.1 Composição elementar e teor de cinzas:	66

5.2 Caracterização ácido-base:	67
5.3 Complexação de Cu(II) por AF e AH:	82
5.4 Obtenção de K_{DEF} :.....	99
6.0 CONCLUSÕES:	103
7.0 PROPOSTAS FUTURAS:	105
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	106

II – Figuras:

Figura 1: Diagrama demonstrativo dos componentes da matéria orgânica do solo (MOS).	20
Figura 2: Modelo de estrutura de ácido fúlvico proposto por Fuchs [24]	23
Figura 3: Modelo de estrutura de ácido fúlvico proposto por Schnitzer [19].....	24
Figura 4: Modelo de estrutura de ácido húmico proposto por Dragunov [33].....	25
Figura 5: Modelo de estrutura de ácido húmico proposto por Kleinhempel [34]	26
Figura 6: Fotografia da malaquita [60].....	30
Figura 7: Fotografia da calcopirita [60].....	31
Figura 8: Fotografia da calcocita [60]	31
Figura 9: Aplicação do método de Gran para determinação do volume do ponto estequiométrico de uma titulação de 27,00 mL de HCl $7,4 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ com NaOH 0,1000 mol L ⁻¹ , ambos em KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ , a 25°C	51
Figura 10: Determinação dos parâmetros E_a^0 e J_H sob as mesmas condições experimentais para as descritas na Figura 9.....	52
Figura 11: Determinação dos parâmetros E_b^0 e J_{OH} sob as mesmas condições experimentais para as descritas na Figura 9.....	52
Figura 12: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meio não complexante (KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹) e complexante, (ácido húmico 30,0 mg L ⁻¹ em KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹), ambos em pH $6,00 \pm 0,05$, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$	57
Figura 13: Sistema utilizado para a titulação potenciométrica dos ácidos húmico e fúlvico, com destaque para os dois potenciômetros, um para monitorar íons Cu(II) e outro para pH	57
Figura 14: Destaque para a cela de titulação, juntamente com: (a) eletrodo íon seletivo de cobre; (b) eletrodo de referência; (c) eletrodo combinado para monitoração de pH; (d) umidificador de N ₂ ; (e) bureta contendo solução de NaOH $2,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ /KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹	58
Figura 15: Esquemas dos eletrodos utilizados para a titulação potenciométrica dos ácidos húmico e fúlvico, sendo: (A): eletrodo combinado Ag/AgCl; (B): eletrodo de referência Ag/AgCl e (C): eletrodo íon seletivo.....	58

Figura 16: Gráfico de Scatchard elaborado com os dados de uma titulação de suspensão 30 mg L ⁻¹ de ácido húmico com solução de Cu(II) 4,70 mmol L ⁻¹ em meio de KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ e pH 6,00±0,05, a 25,0±0,1°C.....	61
Figura 17: Gráfico de ln C _{Cu(II)} em função de ln α para determinação da função diferencial d ln CCu(II)/d ln α.....	64
Figura 18: Curva de titulação segmentada e linearizada utilizando funções de Gran modificadas. Condições: CHA = 0,5000 g L ⁻¹ ; volume inicial = 25,0 mL; força iônica = 0,10 mol L ⁻¹ em KNO ₃ ; T = 25,0 ± 0,1°C; eletrodo de referência = Ag/AgCl – KCl 3 mol L ⁻¹ ; FHAn = funções de Gran modificadas (n = 1-5, representam cada grupo de sítios ionizáveis)	74
Figura 19: Curva de titulação segmentada e linearizada utilizando funções de Gran modificadas. Condições: CAF = 0,5000 g L ⁻¹ ; volume inicial = 25,00 mL; força iônica = 0,10 mol L ⁻¹ KNO ₃ ; T = 25,0 ± 0,1°C; eletrodo de referência = Ag/AgCl – KCl 3 mol.L ⁻¹ ; FAHn = funções de Gran modificadas (n = 1-5, representam cada grupo de sítios ionizáveis)	79
Figura 20: Resposta do eletrodo íon-seletivo a Cu(II) em meio não complexante de KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ , 25,0±0,1°C, em diferentes condições de pH.....	83
Figura 21: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meios complexantes e não complexante, em KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ , pH = 4,00±0,05, a 25,0±0,1°C. Os meios complexantes são constituídos por suspensão 30,0 mg L ⁻¹ de ácido húmico ou solução 30,0 mg L ⁻¹ de ácido fúlvico.....	85
Figura 22: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meios complexantes e não complexante, em KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ , pH = 5,00±0,05, a 25,0±0,1°C. Os meios complexantes são constituídos por suspensão 30,0 mg L ⁻¹ de ácido húmico ou solução 30,0 mg L ⁻¹ de ácido fúlvico.....	85
Figura 23: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meios complexantes e não complexante, em KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ , pH = 6,00±0,05, a 25,0±0,1°C. Os meios complexantes são constituídos por suspensão 30,0 mg L ⁻¹ de ácido húmico ou de solução 30,0 mg L ⁻¹ de ácido fúlvico	86
Figura 24: Relações existentes entre as concentrações de CuL e Cu(II) total obtidas no decorrer das titulações de suspensões 30 mg L ⁻¹ de ácido húmico em meio iônico	

KNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , temperatura 25,0±0,1°C em intervalos de pH 4,00±0,05, 5,00±0,05 e 6,00±0,05	88
Figura 25: Relações existentes entre as concentrações de CuL e Cu(II) total obtidas no decorrer das titulações de soluções 30 mg L ⁻¹ de ácido fúlvico em meio iônico KNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , temperatura 25,0±0,1°C, intervalos de pH 5,00±0,05 e 6,00±0,05	88
Figura 26: Gráficos de Scatchard obtidos em pH 4,0 (A), 5,0 (B) e 6,0 (C) para titulações de suspensões 30 mg L ⁻¹ de ácido húmico com solução de Cu(II) 4,72 mmol L ⁻¹ em meio KNO ₃ 0,10 mol.L ⁻¹ a 25,0±0,1°C	90
Figura 27: Gráficos de Scatchard obtidos em pH 5,0 (A) e 6,0 (B) para titulações de soluções 30 mg L ⁻¹ de ácido fúlvico com solução de Cu(II) 4,72 mmol L ⁻¹ em meio KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ a 25,0±0,1°C	91
Figura 28: Isotermas de adsorção de Cu(II) em ácido húmico em diferentes valores de pH, em KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ e a 25,0°C. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas representam as curvas ajustadas por regressão não linear considerando um sítio (pH 4,0) e dois sítios (pH 5,0 e 6,0) de adsorção. Em todos os casos o coeficiente de correlação (r ²) foi maior que 0,98.....	93
Figura 29: Isotermas de adsorção de Cu(II) em ácido fúlvico em diferentes valores de pH, em KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ e a 25,0°C. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas representam as curvas ajustadas por regressão não linear considerando um sítio (pH 4,0) e dois sítios (pH 5,0 e 6,0) de adsorção. Os coeficientes de correlação (r ²) foram maiores que 0,99 para pH 5,0 e 6,0 e maiores do que 0,94 para pH 4,0	94
Figura 30: Gráficos de log K _{DEF} em função do log θ obtidos para suspensões 30 mg L ⁻¹ de ácido húmico (A) e soluções 30 mg L ⁻¹ de ácido fúlvico (B) com solução de Cu(II) 4,72 mmol L ⁻¹ ambas em meio KNO ₃ 0,10 mol L ⁻¹ a 25,0±0,1°C	101

III – Tabelas:

Tabela 1: Definições para constituintes da matéria orgânica natural	19
Tabela 2: Composição elementar média de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de solos ..	23
Tabela 3: Ingestão Diária Recomendada para o Cobre (mg), segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária	39
Tabela 4: Percentagens em massa dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio encontradas nos ácidos húmico e fúlvico	66
Tabela 5: Teor em cinzas dos ácidos húmico e fúlvico representados em %.....	66
Tabela 6: Modelo de listagem de conversão dos potenciais em p ^c H para uma titulação de ácido húmico	69
Tabela 7: Segmentação e linearização dos dados da Tabela 5 para obtenção das concentrações e pKa de cada grupo de sítios ionizáveis	72
Tabela 8: Modelo de listagem de conversão dos potenciais em p ^c H para uma titulação de ácido fúlvico	75
Tabela 9: Segmentação e linearização dos dados de titulação potenciométrica ácido base para obtenção das concentrações e pKa de cada grupo de sítios ionizáveis.....	76
Tabela 10: Concentração dos cinco grupos ionizáveis presentes nos ácidos húmico e fúlvico	80
Tabela 11: Valores de pKa ajustados para os grupos ionizáveis descritos na Tabela 10	80
Tabela 12: Percentagens dos grupos carboxílicos, fenólicos e aminos encontradas nas SH's analisadas.....	82
Tabela 13: Faixa de concentração (em mmol g ⁻¹) de grupos ácidos em ácidos húmicos e fúlvicos isolados de solos tropicais (Adaptado de Stevenson)	82
Tabela 14: Parâmetros de resposta do eletrodo íon-seletivo para Cu(II)	84
Tabela 15: Dados experimentais e calculados para uma típica titulação da suspensão de ácido húmico 30 mg L ⁻¹	89
Tabela 16: Resultados referentes aos logaritmos das constantes de estabilidade médias e capacidades de complexação nos pH 4, 5 e 6.....	92
Tabela 17: Resultados referentes aos logaritmos das constantes de estabilidade médias e capacidades de complexação nos pH 4, 5 e 6 obtidos por regressão não linear usando o programa Origin 6.0	95

Tabela 18: Conjunto de dados experimentais e de resultados de cálculo para a determinação de K_{DEF} em função do grau de ocupação dos sítios de complexação de uma suspensão de ácido húmico.....	100
Tabela 19: Parâmetros de heterogeneidade e $\log K^{\circ}_{DEF}$ obtidos para ácidos húmico e fúlvico	102

1.0 INTRODUÇÃO:

1.1 Substâncias Húmicas:

Fenômenos que envolvem a participação de **Substâncias Húmicas (SH's)** são conhecidos há muito tempo. Um exemplo é o possibilitado pelo Rio Nilo que nasce na região centro-oriental da África e escava seu leito na rocha, cruzando o deserto em busca do Mar Mediterrâneo. Ainda hoje ele condiciona o modo de vida e a economia dos países por onde passa. O regime de suas cheias e vazantes está ligado à estação de chuvas abundantes que ocorrem nas suas cabeceiras. No seu vale e delta, as cheias eram sinônimos de colheita e prosperidade. Esses ciclos do Nilo contribuíram decisivamente para a formação de uma civilização peculiar. O volume de água aumenta consideravelmente a partir de junho, carregando sedimentos que são depositados nas margens alagadas e fertilizam o solo, possibilitando grandes colheitas [1].

Assim como o Rio Nilo, no que se diz respeito à importância exercida à região em que se estende, o Pantanal é um dos mais valiosos patrimônios naturais do Brasil. Maior área úmida continental do planeta – com aproximadamente 210 mil km², sendo que 140 mil km² em território brasileiro, em parte dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul – destaca-se pela riqueza da fauna, onde dividem espaço 263 espécies de peixes, 122 espécies de mamíferos, 93 espécies de répteis, 1.132 espécies de borboletas e 656 espécies de aves. As chuvas fortes são comuns nesse bioma. Os terrenos, quase sempre planos, são alagados periodicamente por inúmeros córregos e vazantes entremeados de lagoas e leques aluviais. Na época das cheias estes corpos comunicam-se e mesclam-se com as águas do Rio Paraguai, renovando e fertilizando a região [2].

O equilíbrio desse ecossistema depende, basicamente, do fluxo de entrada e saída de enchentes que, por sua vez, está diretamente ligado à pluviosidade regional. De forma geral, as chuvas ocorrem com maior frequência nas cabeceiras dos rios que deságuam na planície. Com o início do trimestre chuvoso nas regiões altas (a partir de novembro), sobe o nível de água do Rio Paraguai, provocando as enchentes. O mesmo ocorre paralelamente com os afluentes que atravessam o território brasileiro, cortando uma extensão de 700 quilômetros. As águas se espalham e cobrem, continuamente, vastas extensões em busca de uma saída natural, que só é encontrada centenas de quilômetros adiante, no encontro do Rio

com o Oceano Atlântico, fora do território brasileiro. As cheias chegam a cobrir até 2/3 da área pantaneira [2].

A partir de maio inicia-se a "vazante" e as águas começam a baixar lentamente. Quando o terreno volta a secar permanece, sobre a superfície, uma fina camada de lama húmifera (mistura de areia, restos de animais e vegetais, sementes e húmus) propiciando grande fertilidade ao solo [2]. Nesta lama húmifera, pode-se destacar a coloração escura de muitos solos devido à presença das substâncias húmicas. Tal característica facilita o processo de retenção de calor da luz solar, auxiliando na germinação de sementes. Estudos levaram à constatação de que as substâncias húmicas são capazes de reter cerca de 20 vezes sua massa em água, o que mantém a umidade do solo e evita a erosão do mesmo. Através de sua decomposição, fornecem nutrientes, tais como CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} e SO_4^{-2} para o crescimento das plantas, possibilitando também a troca de cátions [3].

O grande número de sítios ionizáveis nas substâncias húmicas, principalmente grupos carboxílicos e fenólicos, permite uma habilidade apreciável de formar complexos estáveis com cátions de metais pesados. Material húmico também encerra partículas minerais, produzindo agregados com alta capacidade de adsorção ou complexação. A capacidade complexante das substâncias húmicas foi relatada principalmente em relação aos íons cobre, como o número de mol dos cátions metálicos que pode se ligar por grama de matéria húmica [4].

A formação de complexos entre substâncias húmicas e cátions metálicos, associada aos processos de adsorção dos complexos sobre partículas minerais, afeta de maneira significativa a biodisponibilidade do cátion metálico, bem como sua mobilidade geoquímica em solos, sedimento e sistemas aquáticos [5]. Em relação à potencial toxicidade dos metais pesados, acredita-se que a complexação destes pelas substâncias húmicas seja a responsável pela redução da incorporação do metal pelos organismos [6].

Os grupos fenólicos e carboxílicos são tidos como os de sítios de complexação de maior atividade em ácidos húmicos e fúlvicos, sendo que a estabilidade dos complexos é uma função do pH [6]. Os cátions alcalino-terrosos Ca(II) e Mg(II) , por encontrarem-se em elevadas concentrações em ambiente naturais, inibem a complexação de traços metálicos pelas SH [6].

Ainda, colóides orgânicos naturais de ácidos húmicos e fúlvicos, formam complexos solúveis em água com radionuclídeos [7-9]. Podem ser importantes agentes transportadores de radionuclídeos do meio ambiente [10]. Sabe-se que a presença das substâncias húmicas em águas naturais pode influenciar na sorção de radionuclídeos pelos sólidos naturais, assim como em sua migração pelo meio aquático [11]. Materiais trocadores iônicos constituídos de humato de cálcio são apropriados para remover da água metais pesados como ferro, níquel, mercúrio, cádmio e cobre, assim como elementos radioativos provenientes de usinas nucleares [10]. Suas habilidades de ligações seletivas também são exploradas na destruição de munições e armas químicas [12].

Um aspecto negativo da presença de substâncias húmicas está no processo da desinfecção da água para a indústria e abastecimento público com produtos à base de cloro [13-14]. Nestes casos há possibilidade de formação de substâncias potencialmente cancerígenas, denominadas subprodutos da cloração, dentre as quais destacam-se os trihalometanos (THM), que se originam das reações entre o cloro e substâncias orgânicas, principalmente os ácidos húmicos e fúlvicos [13,14].

1.1.1 Histórico:

No ano de 1786 há o registro da primeira tentativa de se isolar substâncias húmicas de solo pelo cientista alemão Achard (1753-1821) que ao submeter turfas a solventes alcalinos obteve um material de coloração escura que precipitava por acidificação e se solubilizava em meio alcalino [15].

Em 1804, o termo *humus*, proveniente do latim, e equivalente a solo, foi introduzido por Theodore de Saussure (1767-1845) com o intuito de descrever o material orgânico de coloração escura originado do solo [15].

O período compreendido entre 1826 e 1837 traz os primeiros estudos realizados por Carl Sprengel (1787-1859), agrônomo alemão, na tentativa de se compreender a origem e a natureza química das substâncias húmicas [15]. Destes estudos o pesquisador concluiu que solos ricos em bases apresentavam maior teor de humatos, o que elevava sua fertilidade [3].

Jöns Jakob Berzelius (1779–1848) realizou importantes estudos a respeito das propriedades químicas das substâncias húmicas, dando contribuições valiosas sobre métodos de extração, conteúdo elementar e composição de complexos metálicos [3].

Mülder e outros contemporâneos, sob fortes influências dos trabalhos de Berzelius, acreditavam que as frações húmicas eram compostos quimicamente individuais e que não continham nitrogênio. Apesar deste conceito estar equivocado, estendeu-se até o final do século XIX [3].

Conte e colaboradores [16] estudaram as mudanças conformacionais dos ácidos húmico e fúlvico de diferentes naturezas químicas por cromatografia de exclusão de tamanho em elevada pressão após a dissolução em fases móveis diferindo em composição, mas em força iônica constante. Os autores verificaram que a redução no tamanho das substâncias húmicas dissolvidas se deu por causa do rompimento de um arranjo de elevado tamanho molecular em várias associações moleculares ao invés de uma estrutura macromolecular em espiral. As mudanças conformacionais mais significativas ocorreram nas fases móveis ácidas nas quais as formações de ligações de hidrogênio foram induzidas, sugerindo que conformações húmicas grandes de fácil ruptura estavam próximas de forças predominantemente hidrofóbicas. O tamanho da associação molecular variou com as amostras húmicas indicando uma relação próxima entre a composição química húmica e a estabilidade da estrutura conformacional. Conte e colaboradores [16] sugeriram que as substâncias húmicas em solução são uma auto-associação moléculas relativamente pequenas governada por ligações fracas, e que as interações hidrofóbicas intermoleculares são as forças ligantes predominantes. Este modelo de substâncias húmicas dissolvidas baseado na reversibilidade de auto-associação de pequenas moléculas preferencialmente à espiral randômica representa uma nova compreensão que deve contribuir para prever o comportamento ambiental de contaminantes com a matéria orgânica natural.

1.1.2 Classificação das Substâncias Húmicas (SH):

Substâncias húmicas e não-húmicas são termos utilizados para designar a matéria orgânica (em vários estágios de decomposição) encontrada nos solos, turfas e sedimentos [3]. A principal diferença entre substâncias húmicas e **não húmicas** está no critério da natureza das mesmas, isto é: substâncias húmicas são de estrutura química complexa e compõem um grupo de compostos heterogêneos, enquanto que as **não húmicas** são de natureza definida como aminoácidos, proteínas, carboidratos e ácidos orgânicos [3]. Dentre essas frações, SH's estão presentes em maior quantidade, correspondendo à cerca de 40 a 60% da matéria orgânica natural, de ocorrência em solos, águas e sedimentos [3].

A Tabela 1 traz as definições utilizadas de forma freqüente no estudo da química do húmus [3]:

Tabela 1: Definições para constituintes da matéria orgânica natural

Termos	Definições
Substâncias húmicas ou material húmico	Substâncias de coloração escura, elevada massa molecular, estrutura complexa e indefinida. Resultantes da decomposição de vegetais e animais.
Substâncias não húmicas	Substâncias presentes no solo de composição e estrutura definida, como aminoácidos, carboidratos, ceras, lipídeos, resinas, ácidos graxos etc...
Ácidos húmicos	Material orgânico de coloração escura insolúvel em meio ácido (pH < 2).
Ácidos fúlvicos	Material colorido remanescente após separação dos ácidos húmicos por precipitação em meio ácido. Solúvel em toda faixa de pH.
Humina	Parte do material orgânico presente no solo de coloração escura, insolúvel em álcalis e ácidos
Ácido himatomelânico	Fração dos ácidos húmicos solúvel em álcoois.

A Figura 1 mostra uma projeção da distribuição em percentagem da matéria orgânica do solo (MOS) entre os seres vivos e não-vivos existentes no mesmo. Nesta figura pode-se notar a predominância do húmus sobre os demais componentes [17].

Figura 1: Diagrama demonstrativo dos componentes da matéria orgânica do solo (MOS)

1.1.3 Mecanismos propostos para formação das substâncias húmicas:

Estudos visando a caracterização da origem do húmus foram realizados na década de 1910, surgindo com Maillard a teoria de maior consideração, a qual propunha a formação das substâncias húmicas durante o processo de decomposição de resíduos vegetais [3]. Em seguida, surgiu o conceito de **humificação**, o qual é mantido até hoje e consiste em assumir que seu início se dá a partir da decomposição hidrolítica de resíduos vegetais com formação de substâncias simples de natureza aromática; sendo em seguida oxidadas por meio de enzimas microbianas levando à formação de hidroxiquinonas, cuja condensação acarreta na formação das substâncias húmicas [3].

Em 1914, Williams postulou que a humificação ocorre em dois estágios, sendo que o primeiro se inicia com a decomposição de resíduos vegetais e compostos simples e o segundo com a síntese de substâncias de natureza mais complexa [3].

Shmook, em 1930, associou a formação das substâncias húmicas com a presença de microrganismos no solo e ainda mostrou a ocorrência de grupos carboxílicos em sua estrutura pela esterificação dos ácidos húmicos com álcool na presença de ácido clorídrico. [3].

O mecanismo de formação ainda é um dos aspectos pouco compreendidos na química do húmus, apesar de vários estudos realizados na área, dentre os quais podem ser citados aqueles realizados pelos pesquisadores: Kononova (1966) [18], Schnitzer & Khan (1978) [19], Giesecking (1975) [20] e Stevenson (1982) [21]. Em meio a esta numerosa quantidade de trabalhos podem-se citar:

1. fontes oriundas de tecidos lignificados de resíduos de plantas e a celulose ou açúcares simples [21];
2. Maillard [22] propôs que as substâncias húmicas são compostos sintetizados a partir de substâncias produzidas durante a decomposição de restos de plantas, sendo que a existência do húmus na natureza era proveniente de reações puramente químicas, nas quais os microrganismos não possuíam um papel direto, exceto na geração de carboidratos e aminoácidos de proteínas;

3. Segundo Steelink [23], algumas possíveis fontes podem ser: a lignina, polifenóis e aminoácidos provenientes das folhas do solo reagindo entre si, celulose, amido e açúcares utilizados por microrganismos;
4. Kononova [18] afirmou que o processo de humificação ocorre sequencialmente pelas etapas: decomposição hidrolítica de restos de plantas com síntese de substâncias simples de natureza aromática; oxidação destas por enzimas de microrganismos, formando hidroxiquinonas; condensação das quinonas em produtos de coloração escura (substâncias húmicas).
5. Ainda, alguns pesquisadores citam a lignina como o fator precursor de ácidos húmicos, dentre eles Fuchs [24,25], Hobson e Page [26], Waksman e colaboradores [27]. Esta afirmação se sustenta nos seguintes argumentos: os ácidos húmicos possuem propriedades similares a ligninas modificadas, tais como a presença de anéis aromáticos e grupos funcionais como hidroxilas fenólicas; o tratamento alcalino de ligninas dá origem a substâncias de cor e solubilidade semelhantes aos ácidos húmicos; ligninas apresentam resistência à ação de microrganismos; compostos de ligninas e proteínas preparados em laboratório possuem propriedades características de solos e ácidos húmicos de turfas. Entretanto, Wilson e colaboradores [28] argumentam que a possibilidade das substâncias húmicas derivarem diretamente da lignina é pequena, mesmo considerando-se o fato desta última possuir uma importante contribuição em matéria orgânica proveniente de turfa.

A Tabela 2 [29] mostra a composição elementar média de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de solos e pode-se verificar que o AH tem maior teor em carbono e menor teor de oxigênio que o AF. A razão atômica C/H é maior para o AH indicando maior aromaticidade e uma estrutura mais condensada [3].

Tabela 2: Composição elementar média de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de solos [29]

Substâncias	Composição elementar média (%)				
	C	H	O	N	S
húmicas					
Ácido	53,8-58,7	3,2-6,2	32,8-38,3	0,8-4,3	0,1-1,5
húmico					
Ácido	40,7-50,6	3,8-7,0	39,7-49,8	0,9-3,3	0,1-3,6
fúlvico					

1.1.4 Estruturas propostas para as substâncias húmicas:

Numerosos estudos estão apresentados na literatura no intuito de esclarecer as fórmulas estruturais das substâncias húmicas, sendo que cada uma desta deve ser compreendida como um conjunto de moléculas de diferentes tamanhos, nos quais o ácido húmico e a humina possuem maiores massas molares que os ácidos fúlvicos. Estes últimos têm um teor maior em oxigênio e mais pobre em carbono, possuindo então mais grupos funcionais de forma ácida. Ainda, pode-se citar a ocorrência em maior parte do oxigênio presente nos ácidos húmicos como fazendo parte de núcleos como éteres ou ligações de ésteres. Ácidos fúlvicos apresentam carboxilas, hidroxilas e carbonilas [30].

Figura 2: Modelo de estrutura de ácido fúlvico proposto por Fuchs [24]

As Figuras 3, 4 e 5 são representações de possibilidades para as estruturas publicadas na literatura. Fuchs [24], representa as estruturas com um caráter policíclico.

Schnitzer [19,31] propôs um modelo para o ácido fúlvico formado por um agregado de ácidos carboxílicos fenólicos, os quais podem estar ligados por pontes de hidrogênio ou por cadeias alifáticas (Figura 3). Apesar desta estrutura poder esclarecer numerosos casos de complexação dos ácidos fúlvicos, não admite a existência de grupos funcionais nitrogenados [32].

Figura 3: Modelo de estrutura de ácido fúlvico proposto por Schnitzer [19]

Dragunov [33], assim como outros autores, propôs modelos baseados em anéis benzênicos ligados por pontes, onde notam-se a existência de anéis aromáticos do tipo di e trihidroxibenzeno, contendo grupos quinônicos nitrogenados na forma cíclica e em cadeias periféricas, assim como resíduos de peptídeos (Figura 4).

Figura 4: Modelo de estrutura de ácido húmico proposto por Dragunov [33]

Kleinhempel [34] propôs uma estrutura de maior complexidade do que as demais, (Figura 5), incluindo a existência de pontes e cadeias alifáticas, grande aromaticidade, grupos contendo nitrogênio, um grande número de sítios complexantes e a possibilidade de agregação inter ou intra-molecular, possuindo natureza altamente polieletrólítica.

Figura 5: Modelo de estrutura de ácido húmico proposto por Kleinhempel [34]

1.1.5 Aplicações das substâncias húmicas:

Húmus representa um dos maiores reservatórios de carbono do planeta. Entretanto, são poucas as aplicações industriais do húmus e produtos derivados do mesmo [10].

Na **agricultura**, destacam-se:

- aditivos em fertilizantes [35];
- Humato de cálcio e outros sais derivados são usados para aumentar a fertilidade dos solos [36];
- Humato de amônio possibilita um efeito de estímulo ao crescimento [37];
- Alimento de animais do campo [38];

Na **indústria**:

Peña-Méndez e colaboradores [10] apontam:

- aditivos para materiais de construção;
- trabalhos no escurecimento da madeira;
- aditivos para melhorar a qualidade mecânica de cerâmicas, colorir telhas de barro, além de outras aplicações na preparação da argila;
- produção de plásticos (especificamente na coloração),
- aumentam a dureza do poliuretano;
- fonte de hidrocarbonetos e óleos combustíveis;
- melhorar a extração do urânio do seu minério;

Na **Medicina (Veterinária e Humana)**:

- administrados de forma preventiva a ratos diminuem de forma significativa a extensão de danos gástricos causados pelo etanol [10];
- ácidos húmicos são capazes de interagir com a bactéria *Micrococcus luteus* – neste caso as substâncias húmicas protegeram o organismo contra a ruptura da parede celular pelo lisossomo [39];
- Thiel e colaboradores em 1981 [40] descobriram que a pré-incubação de culturas celulares com humato de amônio evitou a infecção pelo vírus do herpes, percebendo que a função das substâncias húmicas é a de proteger os organismos;

- especialmente ácidos fúlvicos, têm a capacidade de dar proteção contra o câncer e vírus [41-43].

No **tratamento de água:**

- Filtros contendo húmus foram desenvolvidos para purificação de efluentes, com muitas aplicações. Os filtros são úteis para reter cromato, remover óleo [45], despejos urbanos e industriais, pesticidas provenientes de efluentes e fenol da água. Ainda, diversos grupos de compostos como herbicidas, fungicidas, inseticidas e dioxinas podem ser removidos da água, solo e efluentes [46].

1.1.6 Vermicomposto:

Sua definição é citada em Ormond [47]: “... processo de transformação por verme, especialmente as minhocas, de resíduos orgânicos de origem animal e vegetal em húmus...”.

A vermicompostagem é um processo que utiliza minhocas para digerir matéria orgânica e agregados de terra, provocando sua degradação [48]. O produto desta digestão é o coprólito, (palavra de origem grega: *copros* = fezes; *litos* = rocha - fezes fossilizadas e petrificadas) que contém nutrientes em maior concentração que o solo [49].

Estando em estado mais avançado de decomposição, proporciona uma produção acelerada de ácidos húmicos, a qual ocorre pela ação das enzimas produzidas no tubo digestivo das minhocas e da atividade dos microrganismos nele existentes, tais como bactérias, fungos, actinomicetos, algas e protozoários, grandemente estimulados antes de serem excretados [50].

Por ocasião da passagem através das minhocas, não só a matéria orgânica como também os componentes minerais que lhes servem de alimento ficam sujeitos a enzimas digestivas e a um processo de trituração. A melhoria no crescimento de gramíneas em torno dos resíduos das minhocas indica uma maior disponibilidade de nutrientes vegetais, sendo talvez o nitrogênio o mineral que está sujeito a maior influência [51]. Dentro do trato digestivo, o material contido no solo sofre transformações, havendo decomposição de matéria orgânica e liberação de nutrientes que serão posteriormente assimilados pelas plantas [52].

Por meio de estudos, confirmaram-se os resultados benéficos da atividade das minhocas na produtividade do solo, nos quais houve o aumento da matéria orgânica, da capacidade de permuta de cátions e da disponibilidade de fósforo e de potássio [51].

Há uma preferência pela espécie *Eisenia foetida* (Savigny - 1826), conhecida como minhoca Vermelha da Califórnia ou minhoca do esterco, por causa da habilidade de converter os resíduos orgânicos. Atualmente vem se destacando a minhoca conhecida como Africana *Eudrilus eugeniae* (Kingberg - 1867), em razão do seu tamanho avantajado (20 a 22 cm) [53].

Os excrementos de minhocas aumentam de três a onze vezes o teor de fósforo assimilável, de potássio e magnésio trocáveis no solo, e ainda elevam de cinco a dez vezes o teor de nitratos e em 30% o de cálcio, reduzindo a acidez da terra. A composição e as propriedades físico-químicas dos dejetos aceleram em até 60% o desenvolvimento de bactérias, protozoários e outros microrganismos, inclusive a bactéria que fixa o nitrogênio. Esses mesmos microrganismos multiplicados no processo tornam mais rápida a fermentação de restos vegetais e animais, que podem ser aproveitados pelas plantas [54].

O processo de compostagem e a ação das minhocas alteram qualitativa e quantitativamente a composição das substâncias húmicas e dos materiais orgânicos. O material humificado apresenta como vantagens maior capacidade de troca de cátions, maior retenção de umidade e mineralização mais lenta [55].

1.2 O cobre:

1.2.1 – O ciclo biogeoquímico:

Apresenta uma abundância natural na crosta terrestre de aproximadamente 60 mg kg^{-1} . As principais fontes de cobre são: a **malaquita** ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})$) (Figura 6), a **calcopirita** (CuFeS_2) (Figura 7) e a **calcocita** (Cu_2S) (Figura 8) [56]. Seus conteúdos variam de 0,5 a 5% da massa; rochas ígneas contêm 0,010% e as cristalinas 0,0055%; os arenitos um teor compreendido entre 10 a 40 mg kg^{-1} , os xistos de 30 a 150 mg kg^{-1} e os xistos marinhos de 20 a 300 mg kg^{-1} [57,58,59].

Próximo ao local da mineração ocorre o beneficiamento do minério através da trituração do mesmo prensado e posterior adição do agente de flotação. A espuma contendo cobre é removida, desidratada e o concentrado é transportado para a fundição [56].

Figura 6: Fotografia da malaquita [60]

Figura 7: Fotografia da calcopirita [60]

Figura 8: Fotografia da calcocita [60]

As concentrações médias de cobre emitidas por fontes naturais foram estimadas por Nriagu (1989), citado pela WHO (World Health Organization) [59], sendo que:

- Poeiras transportadas pelos ventos: $0,9-15 \times 10^3$ toneladas;
- Incêndios florestais: $0,1-7,5 \times 10^3$ toneladas;
- Partículas vulcânicas: $0,9-18 \times 10^3$ toneladas;
- Processos biogênicos: $0,1-6,4 \times 10^3$ toneladas;
- Névoa de água marinha: $0,2-6,9 \times 10^3$ toneladas.

1.2.2 Principais usos e aplicações:

Azevedo e colaboradores [56] apontam:

- Manufatura de fios e condutores;
- Galvanoplastia;
- Utensílios de cozinha;
- Tubulações residenciais e para linhas de serviço;
- Manufatura de moedas;
- Inseticida, fungicida, algicida e desinfetante;
- Tintas antiincrustantes;
- Baterias;
- Eletrodos;
- Pigmentos e Ligas.

Sulfato de cobre é utilizado mundialmente para inibir o crescimento de algas em reservatórios municipais, equipamentos de irrigação, piscinas e sistemas de refrigeração industriais. Entretanto, apenas 7% de sua produção é empregado no tratamento de água, 65% são utilizados na agricultura e 28% na indústria, juntamente com a produção de cromoarseniato de cobre (preservante de madeira), galvanoplastia e manufatura de corantes [61,62].

Óxido de cobre é usado como catalisador e corante de cerâmicas. É encontrado em baterias, eletrodo, tintas e inseticidas [56]. O cloreto de cobre é utilizado como desinfetante, na preservação da madeira, desodorante e desulfurizante em destilados do petróleo, em fotografia, na purificação da água e como aditivo alimentar [62]

Muitas ligas com o metal são utilizadas devido as suas características particulares: facilidade de moldagem (bronze e latões), maleabilidade do produto recozido, ductibilidade, resistência à deformação permanente, boa condutibilidade elétrica, assim como uma elevada resistência mecânica, condutibilidade térmica, resistência à corrosão e outras, tais como coloração, polimento, sonoridade, magnetismo etc... [63]

Ainda, pode-se citar sua participação como constituinte do dispositivo intrauterino de contracepção – contendo cerca de 100-150 mg de Cu [59,64,65].

1.2.3 Transporte e distribuição ambiental

1.2.3.1 Ar:

O cobre é liberado para a atmosfera na forma de material particulado ou adsorvido a partículas, em geral como partículas de óxidos, sulfatos ou carbonatos. É removido por sedimentação gravitacional, deposição de partículas, ou através das chuvas e neblinas. A velocidade de remoção e distribuição do cobre depende das características da fonte emissora, do tamanho das partículas e da velocidade dos ventos [56].

Geralmente, a força gravitacional governa a dispersão das partículas maiores que 5 μm , enquanto as partículas menores são removidas por deposição seca ou úmida. Para as partículas maiores, observa-se que o cobre é removido mais rapidamente da atmosfera pela neve do que pela chuva. A deposição do metal é caracterizada por grande variabilidade temporal e espacial. A velocidade estimada de deposição de cobre em áreas urbanas é de 0,119 e 0,164 kg Cu/ha/ano para a deposição seca e úmida respectivamente. A sedimentação gravitacional relatada varia entre 0,002 e 3,01 kg/ha/ano. Em áreas rurais, a sedimentação gravitacional é de 0,018-0,50 kg/ha/ano, a deposição seca de 0,033kg/ha/ano e através da chuva entre 114.000-612.000 ($\mu\text{g Cu/m}^3$ de chuva/ $\mu\text{g Cu/m}^3$ ar) [62].

A combustão produz partículas pequenas contendo óxidos de cobre, cobre elementar e cobre adsorvido que podem permanecer na troposfera por 7 a 30 dias, e serem deslocadas para bem longe da fonte emissora [57,61].

1.2.3.2 Água e sedimento:

A revisão da literatura mostra que a biodisponibilidade é geralmente pequena em águas naturais [56]. Vários processos influenciam a biodisponibilidade do cobre no sistema aquático, incluindo a complexação a ligantes orgânicos e inorgânicos, adsorção a óxidos metálicos, argila e material particulado em suspensão, bioacumulação e troca entre sedimento e água [62].

As principais formas solúveis de cobre encontradas nas águas doce e salgada são Cu^{+2} , $\text{Cu}(\text{HCO}_3)$ e $\text{Cu}(\text{OH})_2$ [56]. Em valores de pH e concentrações de carbonato características de águas naturais, a maior parte do $\text{Cu}(\text{II})$ dissolvido acha-se preponderantemente na forma de complexos e não como íon cúprico livre [62].

A concentração de cobre dissolvido depende do pH, do potencial de oxi-redução da água, da presença de cátions competidores (Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} por exemplo), ânions de sais cúpricos insolúveis (OH^- , S^{-2} , PO_4^{-3} , CO_3^{-2}) e agentes complexantes orgânicos e inorgânicos. Se a concentração de um ânion em particular excede o produto de solubilidade do sal de cobre, ocorrerá a precipitação deste sal. Os principais precipitados formados em águas naturais são malaquita [$\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$], hidróxido de cobre e azurita [$\text{Cu}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$]. Em águas com baixa demanda bioquímica de oxigênio, forma-se Cu_2S , Cu_2O e cobre metálico, os quais sofrem deposição. A combinação dos processos de complexação, adsorção e precipitação controlam a concentração de $\text{Cu}(\text{II})$ livre e, na maioria das águas naturais, as condições químicas são tais que, mesmo em concentrações relativamente elevadas de cobre, estes processos reduzem o cobre livre para valores extremamente baixos [56].

Como resultado de todos esses processos mencionados, o cobre na água pode estar dissolvido ou associado a colóides ou material particulado. A fração coloidal inclui hidróxidos e complexos com aminoácidos. O cobre na forma particulada inclui precipitados, complexos orgânicos insolúveis e cobre adsorvido à argila ou outros minerais sólidos. Uma fração significativa do cobre é adsorvida nas primeiras horas e, na maioria dos casos, o equilíbrio é atingido em 24 horas. O metal forma complexos estáveis com ligantes orgânicos como o ácido húmico, ligando-se aos grupos $-\text{NH}_2$ e $-\text{SH}$, e, em menor proporção, aos grupos $-\text{OH}$. As águas naturais contêm quantidades variáveis de

espécies orgânicas e inorgânicas, o que afeta a capacidade de complexação e os tipos de complexos formados [56].

Na água do mar, a matéria orgânica é geralmente o agente de complexação mais importante. A formação de ligantes pode afetar outros processos físico-químicos como adsorção, precipitação e oxirredução na água [56].

O cobre é constituinte natural do solo, atingindo as águas ribeirinhas por ação das chuvas ou movimentação das águas, sendo responsável por cerca de 70% do total de cobre aí presente [57]. A maior parte do cobre liberado para cursos d'água encontra-se como material particulado, o qual é precipitado ou adsorvido à matéria orgânica, ao óxido de ferro hidratado, aos óxidos de manganês e depositado em sedimentos ou colunas em corpos d'água [56].

A toxicidade do cobre, geralmente, decresce com o aumento da dureza da água, provavelmente pela competição entre cálcio e cobre pelos sítios de adsorção em superfícies biológicas; assim, quanto maior a concentração de cálcio menor a adsorção de cobre [56]. Vários estudos correlacionaram a toxicidade do cobre à atividade do íon cúprico livre, influenciada pela dureza da água [62].

Em sedimentos, o cobre liga-se, primariamente, à matéria orgânica, a menos que o sedimento seja pobre neste tipo de material [56]. A afinidade de ligação, segundo estudo realizado por Badri e Aston em 1984, citados por Agency For Toxic Substances and Disease Registry [57], varia por um fator superior a 10 mil na seguinte ordem: hidratos de óxido de manganês – matéria orgânica – óxidos de ferro hidratos – aluminossilicatos – argila.

1.2.3.3 Solo:

A quantidade de metais pesados num solo sem interferência antropogênica depende do teor destes nas rochas de origem e do grau de intemperização a que esse material foi submetido. Os metais podem estar na forma solúvel, fixada pelos minerais do solo, precipitada com outros componentes, na biomassa e complexada com matéria orgânica. A atividade de um determinado metal na solução do solo é determinada pelo seu equilíbrio entre as partículas de argila, matéria orgânica, hidróxidos de ferro, alumínio, manganês e quelantes solúveis. Assim, outros fatores como a natureza do solo e seu pH, o tipo e a

distribuição da matéria orgânica, o potencial de oxirredução do solo e a presença de óxidos, a proporção de argila e de areia do solo, do clima e da vegetação do local podem afetar o equilíbrio entre a concentração de cobre nas rochas e sua concentração e permanência no solo [56].

A maior parte do cobre depositado no solo oriundo da atmosfera, de sua aplicação agrícola, da disposição de resíduos sólidos e de lodo de esgoto, está fortemente adsorvida aos primeiros centímetros do solo [59]. Sua movimentação é determinada pelas suas interações físico-químicas com os componentes do solo. Em geral, liga-se à matéria orgânica, aos carbonatos, à argila ou ao ferro hidratado e aos óxidos de manganês. A força iônica e o pH do solo afetam a sua carga superficial influenciando na interação iônica [56].

Quando a quantidade de matéria orgânica é baixa, a concentração de minerais ou de ferro, manganês, e óxidos de alumínio torna-se importante na adsorção de cobre. Como o cobre se liga mais fortemente ao solo que outros cátions divalentes, sua distribuição é menos influenciada pelo pH de que outros metais [56]. Em geral, o cobre se complexa mais fortemente e em maior proporção com substâncias orgânicas de que o Zn, o Cd e o Pb [66,67]. Devido à variedade de condições que influenciam a sua disponibilidade, o total de cobre no solo não indica exatamente a deficiência ou excesso desse metal na vegetação [57,58, 59].

Uma mobilização apreciável do cobre ocorre somente com a lixiviação em pH próximo a 3. Assim, parece improvável que as chuvas ácidas possam mobilizar o cobre em solos ricos em matéria orgânica, a menos que o seu pH seja inferior a 3 [56]. Estima-se que aproximadamente 50% do cobre nos primeiros centímetros desses solos encontram-se ligados à matéria orgânica, cerca de 18% na forma de hidroxycarbonatos, 7% no estado adsorvido, 11% ligado a outros ânions e 6% irreversivelmente adsorvido. Somente 3% são extraídos em pH 4,5, indicando ser esta a porcentagem de cobre móvel [58]. As maiores concentrações de cobre em lixiviados ocorrem em solos arenosos e em condições ácidas, as quais elevam a sua solubilidade e força iônica [57]. Solo ou águas superficiais alcalinas favorecem a precipitação do metal [56].

Recentemente, tornou-se claro que as camadas superficiais do solo são afetadas pela deposição das partículas atmosféricas decorrentes de fontes naturais ou antropogênicas [56]. Para estudar o transporte atmosférico de metais, Steiness e colaboradores [68]

avaliaram a concentração de Pb, Zn, Cu, As, Sb, Se e Cd na camada húmica do solo de 12 regiões da Noruega. Para o cobre, as diferenças regionais foram insignificantes (regiões do Norte = $8,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ e regiões do Sul = $13,5 \text{ mg kg}^{-1}$), indicando que a principal fonte deste elemento não é o transporte atmosférico [68]. Para sofrerem este transporte, os metais devem ser liberados na forma volátil e concentrar-se preferencialmente em aerossóis de pequeno diâmetro com elevada razão superfície/massa [56].

As formas mais voláteis são as metálicas ou os cloretos. Os cloretos de Zn, As, Se, Cd, Sb e Pb apresentam pontos de ebulição inferior a 1000°C e alguns desses metais são muito voláteis na forma elementar [56]. Já o cloreto de cobre e o cobre metálico apresentam ponto de ebulição de, respectivamente, 1490°C e 2567°C , o que explica a menor importância desta forma de transporte [59].

1.2.3.4 Resíduos sólidos e esgoto:

A concentração de metais em efluentes e lodo de esgoto varia muito. O lodo de esgoto, estritamente urbano, possui normalmente uma quantidade baixa de metais pesados, mas quando esgotos industriais e águas de chuva entram no sistema de captação de esgoto urbano, este pode ter sua concentração de metais aumentada de forma significativa [56]. Concentrações elevadas de diferentes metais representam um potencial risco ao meio ambiente e à saúde pública como resultado da acumulação destes metais no solo [59].

Os metais, mesmo na ordem de traços, persistem no solo por longos períodos; perdas por adsorção, remoção pelas plantas cultivadas ou lixiviação são normalmente baixas. Assim, solos poluídos com metais podem ser uma fonte de contaminação para plantas e animais durante um longo tempo. A onipresença de certos metais em decorrência de seu transporte atmosférico é um fato; porém, quando comparada à elevação das concentrações de metais de determinada região pela utilização de lodo de esgoto na agricultura, torna-se irrelevante [56].

Numerosas são as fontes de cobre nos efluentes e lodos de esgoto, incluindo os excrementos de humanos, a corrosão de tubulações de cobre nas redes hidráulicas domésticas e a adição direta decorrente de processos industriais. Assim, o uso deste material na agricultura, como método de disposição de resíduos sólidos, deve ser avaliado diante do seu potencial tóxico [56].

1.2.4 Bioacumulação:

É definida como a rede de absorção do cobre pelos microrganismos, plantas ou animais a partir de seu entorno. É afetada pela biodisponibilidade da substância. Apresenta, em geral, disponibilidade limitada no meio ambiente. A extensão da bioacumulação é determinada pela espécie do metal em associação às diferenças na absorção e velocidade de excreção entre plantas e animais [56].

1.2.4.1 – Microrganismos:

Vários metais são essenciais para as atividades microbianas, mas em concentrações excessivas podem causar toxicidade. Estudos realizados em áreas contaminadas com cobre e outros metais verificaram que estes inibem a mineralização do nitrogênio e do fósforo e diminuem a diversidade de fungos. Os modelos estatísticos aplicados nesses estudos mostraram que o cobre foi o que apresentou maior toxicidade com relação aos fenômenos descritos [56].

1.2.4.2 – Plantas e animais aquáticos:

Encontra-se nas águas em concentrações inferiores a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ [69]. A presença de concentrações elevadas de cobre pode eliminar espécies aquáticas sensíveis como as dáfneas e lesmas, importantes fontes de alimento para os peixes [70].

Alterações nas variáveis físico-químicas (pH, salinidade e temperatura) do meio podem influenciar as espécies disponíveis do metal e modificar sua disponibilidade para absorção – o que deve ser considerado nos programas de biomonitorização. Os metais apresentam um aumento de sua disponibilidade com a diminuição da salinidade, associado ao efeito desta salinidade na fisiologia dos organismos aquáticos. A disponibilidade de metais para a biota marinha depende da forma química desses metais [56]. Alguns metais pesados como o cobre e o cádmio estão disponíveis para absorção pelos organismos quando presentes como íons livres em solução [71].

1.2.4.3 – Plantas e animais terrestres:

É requerido em pequenas quantidades ao crescimento normal da planta, 5 a 20 mg kg⁻¹ – menos que 4 mg kg⁻¹ é considerado deficiente e mais que 20 mg kg⁻¹, tóxico.

A quantidade necessária, assim como a tóxica para animais terrestres, varia entre as espécies, bem como com a disponibilidade do metal e outros interferentes. A via de ingestão principal para humanos não expostos de forma ocupacional é a oral e a quantidade na qual esta ocorre varia de acordo com os hábitos alimentares e de sua concentração na água consumida [56].

Apresenta riscos quando ingerido em concentrações tanto baixas quanto elevadas. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), baseada na resolução do Mercosul (GMC nº 18/94) e do estabelecido pelo *Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. Recommended Dietary Allowances* (RDA), elaborou a Portaria nº 33 que dispõe sobre a adoção de Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas, minerais e proteínas a ser utilizada como parâmetro de ingestão desses nutrientes por indivíduos e diferentes grupos [72]. A Tabela 3 apresenta a ingestão diária recomendada para o cobre, segundo a referida portaria.

Tabela 3: Ingestão Diária Recomendada para o Cobre (mg), segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Nutriente	Adulto	Lactente		Crianças			Gestante
				Idade			
		(anos)		(anos)			
		0-0,5	0,5-1	1-3	4-6	7-10	
cobre mg ⁻¹	3	0,4-0,6	0,6-0,7	0,7-1,0	1,0-1,5	1-2	1,5-3,0

Nos mamíferos, o cobre pode ser absorvido do estômago ao intestino delgado distal. No entanto, somente uma pequena fração do cobre ingerido é solubilizada suficientemente no estômago – o que dificulta sua absorção neste local [56].

1.2.4.4 Síndrome tóxica:

A toxicidade aguda decorrente da ingestão de cobre não é freqüente em seres humanos, sendo usualmente relacionada à ingestão acidental ou intencional e à contaminação de bebidas [59]. Vários casos de exposição aguda única foram relatados na literatura [61]. Tais relatos referem-se ao uso do sulfato de cobre nas doses de 0,4 a 100 mg de Cu e os sintomas apresentados foram vômitos, sensação de ardência epigástrico, diarreia, melena, letargia, anemia hemolítica aguda, dano renal e hepático, neurotoxicidade, aumento da pressão sangüínea e freqüência respiratória [59].

Níveis excessivos de cobre inibem os grupos sulfidrilas das enzimas as quais são responsáveis por proteger o organismo contra os danos provocados pelos radicais livres [56]. A intoxicação aguda por cobre causa erosão do epitélio gastrointestinal associado à necrose centrilobular do fígado e necrose tubular dos rins [61].

A exposição aguda a poeira e a fumos de cobre podem irritar os olhos, o nariz e a garganta, provocando tosse, espirros e sangramentos nasais [56]. Os fumos metálicos podem promover a febre dos fumos, caracterizada por sintomas semelhantes à gripe associados ao sabor metálico na boca, febre e calafrios, bronconstrição e tosse [61].

A exposição crônica pode levar a um espessamento e esverdeamento da pele, dentes e cabelo. Ao nível pulmonar, pode-se observar irritação das fossas nasais, úlceras e perfuração de septo, além de hepatotoxicidade. Pode haver diminuição da fertilidade em animais de experimentação, tanto em machos como em fêmeas [56]. Há evidências de carcinoma pulmonar dentre os trabalhadores de fundições, mas acredita-se que seja atribuível ao óxido de arsênio e não ao de cobre [59,61,64,73]. Marsh e colaboradores [74] confirmaram a associação entre a exposição ocupacional em fundições de cobre e câncer pulmonar, mas não identificaram os fatores de risco específicos associados ao aumento da incidência desta patologia neste grupo de trabalhadores.

1.3 Complexação:

1.3.1 Técnicas analíticas:

Muitos ligantes naturais orgânicos encontrados nos solos, água e sedimentos podem complexar com o cobre, afetar sua atividade e então sua retenção e mobilidade no solo e águas. Muitos modelos de especiação geoquímicos foram utilizados para estimar a forma livre do metal, baseados principalmente em constantes de equilíbrio termodinâmicas e na capacidade complexante (CC), que são determinados para descrever a força de ligação e o número total de sítios ligantes, respectivamente. Para obter estes parâmetros de ligação e derivar informações quantitativas, muitas técnicas foram usadas, tais como titulação potenciométrica, voltametria, espectroscopia de fluorescência, troca iônica, filtração em gel, diálise, ultrafiltração e outras para determinar a concentração do metal livre ou dos sítios de ligação dos ligantes. As condições experimentais tais como temperatura, pH, força iônica da solução, concentração do metal e ligante irão também influenciar os parâmetros de ligação, determinando a magnitude das constantes de estabilidade condicionais [75].

1.3.2 Potenciometria:

A base da potenciometria foi estabelecida por Nernst, em 1888, descrevendo a origem do potencial de eletrodo entre um metal e uma solução contendo íons deste metal, e o potencial redox entre um metal inerte e uma solução contendo um sistema redox [76].

Quando um metal M é imerso numa solução que contém os seus próprios íons M^{n+} , instala-se um potencial de eletrodo, cujo valor é dado pela equação de Nernst

$$E = E^0 + (RT/nF)\ln a_{M^{n+}} \quad (1)$$

onde E^0 é uma constante – o potencial padrão de redução do metal do eletrodo. O potencial E pode ser medido pela combinação do eletrodo com um outro, o eletrodo de referência, e pela determinação da f.e.m. da pilha que se forma. Portanto, sabendo-se o potencial E_r do eletrodo de referência, pode-se deduzir o valor do potencial do eletrodo E. Se o potencial padrão do eletrodo E^0 for conhecido, pode-se então calcular a atividade do íon metálico $a_{M^{n+}}$ na solução. No caso de solução diluída, a atividade iônica será praticamente a mesma que a concentração iônica; quando as soluções forem mais concentradas, dado o valor do

coeficiente de atividade, será possível converter a atividade iônica medida na concentração correspondente [77].

Este procedimento, que usa uma única medida do potencial do eletrodo para determinar a concentração de uma espécie iônica em solução, é conhecido como a potenciometria direta. O eletrodo cujo potencial depende da atividade do íon a ser determinado é o eletrodo indicador. Se, como no caso exemplificado, o íon a ser determinado está diretamente envolvido na reação eletródica, trata-se de um **eletrodo de primeira espécie** [76].

1.3.2.1 Princípio das titulações potenciométricas:

Nas titulações potenciométricas, os potenciais absolutos, ou os potenciais em relação a um eletrodo padrão, não são necessários, e as medições se fazem enquanto a titulação vai se realizando. Um dos eletrodos deve ter um potencial constante, mas não necessariamente conhecido; o outro eletrodo opera como um indicador das alterações da concentração iônica e deve ter uma resposta rápida. A solução, como é natural, é agitada durante o processo de titulação. A aproximação do ponto estequiométrico evidencia-se pela modificação um tanto mais rápida e pronunciada da f.e.m [76].

1.3.2.2 Eletrodos no estado sólido:

Um eletrodo no estado sólido muito utilizado é o baseado na membrana de Ag_2S . Responde tanto a íons prata como sulfeto, abaixo de cerca de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Este baixo limite de detecção é muito elevado para ser explicado com base apenas pela baixa solubilidade do Ag_2S ($K_{ps} = 10^{-51}$). Isto provavelmente reflete dificuldades no preparo de soluções muito diluídas e adsorção ou desorção da superfície do eletrodo ou do frasco contendo a solução. Esta membrana é uma boa condutora iônica com baixa resistência. Pela mistura do Ag_2S com outro sal de prata ou de sulfeto (cujas resistências podem ser altas), esta membrana se tornará seletiva (ou sensível) a outros íons. Uma membrana contendo $\text{CuS}/\text{Ag}_2\text{S}$ irá responder ao Cu^{+2} em adição aos outros íons de membrana [77].

A principal restrição destes eletrodos de misturas salinas é que a solubilidade do segundo sal deve ser muito maior que a do Ag_2S ; mas, por outro lado, deve ser

suficientemente insolúvel tal que sua dissolução não limite a valores relativamente altos a concentração do íon que pode ser detectado. Se a membrana contém sulfeto de prata em concentração suficiente para permitir a condução de íons prata através da membrana, esta atuará como um eletrodo de cloreto de prata [77].

1.3.2.3 Características de eletrodos íon-seletivos:

Os limites de detecção são na ordem de 10^{-6} a 10^{-5} mol L⁻¹. Eletrodos íon-seletivos têm uma concentração elevada do sal do íon primário (aquele a ser analisado) somada à solução interna para manter um potencial estável na membrana.

Algumas vantagens e desvantagens são mostradas, resumidamente, no uso de eletrodos íon-seletivos, assim como cuidados e limitações em seu uso como se segue [77]:

- Medem atividades ao invés de concentrações, uma vantagem única mas um fator que deve ser considerado na obtenção das medidas de concentrações. Podem ocorrer interferências a partir dos efeitos de força iônica;
- Medem íons “livres” (a fração que não está associada a outras espécies);
- Não são específicos, mas muito seletivos em relação a um íon particular. Por isso, são sujeitos à interferência de outros íons. Respondem aos íons hidrogênio e são, entretanto, limitados a uma faixa de pH;
- Podem trabalhar em soluções turvas ou coloridas, nas quais os métodos fotométricos falham;
- Têm uma resposta logarítmica, o que resulta em uma ampla faixa de trabalho, geralmente a partir de 4 a 6 ordens de magnitude. Esta resposta logarítmica também resulta em um erro relativamente constante, na faixa de trabalho onde a equação de Nernst é obedecida;
- Exceto em soluções diluídas, sua resposta é rápida, requerendo freqüentemente menos de 1 minuto para uma medida;
- A resposta é dependente da temperatura, por RT/nF ;
- O equipamento necessário para a medida é de fácil transporte e pequenas volumes de amostras podem ser analisados;
- A amostra não é destruída na medida;

- Enquanto alguns eletrodos podem operar abaixo de 10^{-6} mol L⁻¹, muitos não conseguem, de modo que a potenciometria direta não é uma técnica ultrasensível, como outras técnicas, tais como as que envolvem voltametria de redissolução, cujos limites de detecção podem se aproximar de 10^{-9} mol L⁻¹ ou menores;
- Calibrações freqüentes são necessárias.

2.0 OBJETIVOS:

Esta dissertação teve por objetivo comparar as propriedades de complexação de íons Cu(II) por ácido húmico e ácido fúlvico, utilizando-se técnicas potenciométricas. Para atingir este objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram alcançados:

- 1) Isolar os ácidos húmico e fúlvico de amostra de vermicomposto.
- 2) Caracterizar os materiais quanto à composição elementar e teor de cinzas.
- 3) Determinar a estequiometria e os valores de pK_a dos sítios ionizáveis dos ácidos húmico e fúlvico adotando-se um modelo de distribuição de sítios discretos.
- 4) Determinar os valores de capacidade de complexação e constante média de estabilidade condicional para a complexação de íons Cu(II) pelos ácidos húmicos e fúlvicos em pH 4,0; 5,0 e 6,0. Para isto os dados de titulação potenciométrica foram tratados pelo método de Scatchard, bem como por regressão não linear com a equação de Langmuir.
- 5) Avaliar a variação da constante de estabilidade condicional á medida que vai ocorrendo a ocupação dos sítios no material húmico em estudo pelos íons Cu(II), o que foi feito calculando-se a função de equilíbrio diferencial (K_{DEF}).

3.0 PARTE EXPERIMENTAL:

3.1 Equipamentos e materiais:

- ✓ Balança analítica eletrônica Mettler – resolução de 0,0001 g;
- ✓ pH-Metros Methrom B-654 – resolução de 0,001 unidades de pH (ou 0,1 mV);
- ✓ Pipeta automática Gilson – com volume variável (até 5000 µL);
- ✓ Pipeta automática Gilson – com volume variável (até 1000 µL);
- ✓ Pipeta automática Gilson – com volume variável (até 100 µL);
- ✓ Mesa agitadora – Nova Técnica – NT 145;
- ✓ Centrífuga Excelsa Baby – Fanen Ltda – 208 N;
- ✓ Bureta automática do sistema FIALab 3500 com capacidade de 5,00 mL;
- ✓ Eletrodo seletivo para Cu(II) Orion 9429;
- ✓ Eletrodo de referência de Ag/AgCl (dupla junção) Mettler Toledo modelo 405NS-S7/80;
- ✓ Computador AMD® - os programas utilizados para obter os resultados das titulações potenciométricas (ácido-base), foram compilados em Quick Basic 4.5 e, para os demais resultados, foram usados os programas Microsoft® Excel 2002 da Microsoft Corporation 1985-2001 e o Microcal Origin® 6.0 da Microcal Software Inc. 1991-1999.

3.2 Soluções e reagentes:

- ✓ Todas as soluções e reagentes utilizados no decorrer dos experimentos foram de grau analítico das marcas Merck, Aldrich, Sigma, J.T. Baker, Carlo Erba ou de qualidade equivalente e serão citados durante a descrição das técnicas empregadas;
- ✓ Água destilada e desionizada, sendo fervida quando necessário;
- ✓ Gás N₂-R-Air Liquide.

3.2.1 Soluções de NaOH:

Todas as soluções de NaOH para as titulações potenciométricas no estudo da titulação ácido-base, ou mesmo para acerto de pH durante as titulações de complexação, tiveram uma cuidadosa preparação, visando a minimização da presença de CO₂.

Inicialmente preparou-se um xarope de NaOH (50% m/V) e, após 24 horas, filtrou-se rapidamente em cadinho de vidro sinterizado nº 4, utilizando bomba de vácuo. Cuidou-se para que o xarope contido no cadinho durante a filtração não se esgotasse no intuito de evitar a entrada de CO₂ no sistema sob vácuo. Após ser recolhido um volume necessário para o preparo da solução, com o auxílio da micropipeta, pipetaram-se 3,5 mL do filtrado e imediatamente este volume foi transferido para um balão volumétrico contendo água desionizada fervida e a massa de KNO₃ suficiente para proporcionar a força iônica de 0,100 mol L⁻¹. Posteriormente, esta solução foi transferida a um frasco de polietileno de paredes grossas, dotado de uma conexão para sifonamento, com tubo contendo cal sodada, na entrada de ar, visando a retenção de CO₂. Com todos estes cuidados tomados, acredita-se evitar o problema relacionado com a absorção de CO₂, pois o Na₂CO₃ é insolúvel no xarope de NaOH 50%, não sendo assim uma fonte de contaminação da solução titulante.

A padronização das soluções de NaOH para uso como titulantes, foi feita antes do uso, com a utilização de biftalato de potássio previamente seco a 110°C durante 2 horas e fenolftaleína como indicador [76]. Soluções de NaOH destinadas ao controle de pH tiveram os mesmos cuidados no preparo, porém não foram padronizadas.

3.2.2 Soluções de Cu(II):

Foram preparadas a partir da diluição de um volume adequado da solução padrão para absorção atômica Carlo Erba 1000 mg L⁻¹ (15,74 mmol L⁻¹) na concentração de 4,72 mmol L⁻¹ em um balão volumétrico contendo água desionizada e uma massa de KNO₃ suficiente para deixar a força iônica em 0,100 mol L⁻¹.

3.3 Amostra:

- ✓ húmus de minhoca (vermicomposto) da marca West Garden, que é um produto auxiliar no cultivo de plantas; sendo obtido através da adição de uma determinada quantidade de minhocas, a um canteiro contendo uma mistura de esterco de bovinos e uma pequena quantidade de solo, ficando durante aproximadamente um mês nesta condição. O produto resultante é peneirado para remoção e reaproveitamento das minhocas. Possui grande quantidade de matéria orgânica, o que favoreceu a

utilização deste composto no presente trabalho. Este tipo de produto pode ser encontrado normalmente em supermercados ou em lojas que comercializam plantas.

3.4 Procedimento de extração e purificação:

O método utilizado foi o descrito pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas [78,79].

3.4.1 Ácidos húmicos:

Foram pesados 200 g de húmus previamente seco ao ar e transferido para um frasco de 4000 mL no qual foi adicionado 1800 mL de HCl 0,10 mol L⁻¹. O sistema foi agitado por cerca de uma hora e submetido à centrifugação (2500 rpm), da qual se reservou o sobrenadante, possibilitando a liberação de íons metálicos fracamente ligados à estrutura do material húmico.

Posteriormente, acertou-se o pH do meio em 7,0 com NaOH 1,0 mol L⁻¹ e depois se adicionou mais 200 mL de NaOH 0,10 mol L⁻¹ sob atmosfera de N₂. Por cerca de quatro horas o sistema foi agitado sendo, em seguida deixado em repouso por uma noite.

Na seqüência, o pH do sobrenadante foi abaixado até 1,0 com HCl 6,0 mol L⁻¹ e deixado em repouso por dezesseis horas. Ao término desta etapa, o ácido húmico precipitado foi isolado por centrifugação (2500 rpm). A solução sobrenadante foi reservada para posterior isolamento do ácido fúlvico. O precipitado de ácido húmico foi dissolvido em KOH 0,10 mol L⁻¹ (sob N₂), seguindo-se a adição de KCl sólido a fim de se obter uma concentração do mesmo em 0,30 mol L⁻¹, possibilitando a floculação de colóides inorgânicos.

A separação destes colóides foi feita por centrifugação e, após descartar-se o sedimento, ajustou-se o pH do meio sobrenadante em 1,0 com HCl 6,0 mol L⁻¹ para precipitação do ácido húmico, seguindo-se outra etapa de centrifugação (2500 rpm). O sobrenadante que resultou desta última etapa de centrifugação também foi reservado para isolamento do ácido fúlvico. O sólido contendo o ácido húmico foi ressuspenso em 200 mL de HCl 0,10 mol L⁻¹ e HF 0,30 mol L⁻¹, os quais foram deixados sob agitação por uma noite, possibilitando a destruição de sílica e silicatos.

A penúltima etapa consistiu de centrifugação (2500 rpm) e posterior descarte do sobrenadante. Finalmente, o conteúdo obtido foi dialisado em membranas com corte de massa molar de 1000 Daltons até não se detectar cloreto na solução externa à membrana, o que foi verificado pelo teste de precipitação de AgCl mediante adição de solução de AgNO₃ 0,050 mol L⁻¹, ou seja, até a concentração livre de Cl⁻ ser menor que 10⁻⁵ mol L⁻¹. Finalmente a suspensão de ácido húmico foi transferida para um balão volumétrico de 250,0 mL. A determinação da concentração de ácido húmico foi obtida pela massa seca contida em alíquotas de 5,00 mL da suspensão, pipetadas imediatamente após intensa homogeneização.

3.4.2 Ácido fúlvico do húmus de minhoca:

Primeiramente, fez-se um processo de condicionamento de uma resina XAD-7 o qual consistiu em mergulhar a mesma em um béquer de 500 mL contendo NaOH 0,1 mol L⁻¹. Esta solução foi trocada diariamente num período de cinco dias. Em seguida, 200 mL da resina foram colocados em uma coluna de vidro. Sendo que nesta foram passados volumes alternados de NaOH e HCl, ambos a 0,10 mol L⁻¹, por três vezes. Após a última lavagem com HCl, a resina foi lavada cinco vezes com água desionizada.

Os sobrenadantes obtidos do procedimento de extração do ácido húmico foram submetidos à filtração e posteriormente passados pela coluna de resina não iônica XAD-7, a qual adsorve o ácido fúlvico. O conteúdo retido nesta foi posteriormente eluído com uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹, seguida da adição de mais um volume da coluna com a solução alcalina. Lavou-se com 3 volumes de água desionizada e o eluído foi submetido a uma resina trocadora catiônica fortemente ácida Amberlyst 15 na forma protonada. A solução resultante foi armazenada em geladeira e a concentração de ácido fúlvico foi determinada a partir da massa seca de alíquotas de 25,00 mL desta solução.

3.4.3 Determinação do teor de cinzas:

Foi feita após o aquecimento cuidadoso na estufa até 60°C de 5,00 mL da suspensão obtida de ácido húmico e 25,0 mL da solução de ácido fúlvico, em cadinhos previamente tarados, seguido de resfriamento no dessecador, até ser obtida uma massa constante.

Posteriormente, repetiu-se o procedimento anterior com uma temperatura de 100 °C. Finalmente, levou-se o sistema resultante até a mufla na temperatura de 900 °C. Assim, o teor de cinzas foi calculado a partir das massas residuais obtidas nesta etapa.

3.5 Caracterização ácido-base:

Todas as titulações foram efetuadas em uma cela de vidro com capacidade volumétrica de 50,0 mL que possuía uma “camisa” externa, permitindo então a circulação de água termostatzada a 25,0±0,1°C com o auxílio de um banho termostático Ética 521D. Ainda, pôde-se acoplar uma tampa contendo aberturas suficientes para a adaptação de eletrodos, o conector da bureta automática do sistema FIALab 3500 e o tubo que injetava nitrogênio livre de CO₂ no interior da mesma.

3.5.1 Procedimento de calibração dos eletrodos:

A calibração dos eletrodos se deu de acordo com a proposta de Pehrson e colaboradores [80], ou seja, em termos da concentração e não da atividade. De acordo com a teoria de Debye-Hückel os coeficientes de atividade dos íons H⁺ mantêm-se constantes quando a temperatura e o meio iônico são também constantes durante a titulação. Assim, a 25 °C, a equação de Nernst pode ser escrita como:

$$E = E_a^0 + 59,16 \log[H^+] + E_j \quad (2)$$

onde E é o potencial medido, E_a⁰ é um termo que engloba o potencial padrão do eletrodo e o coeficiente de atividade do íon hidrogênio. E_j é o potencial de junção líquida e é representado por:

$$E_j = J_H[H^+] + J_{OH}[OH^-] \quad (3)$$

onde J_H e J_{OH} são característicos do meio iônico.

Assim, é possível determinar os valores de E_a⁰, J_H e J_{OH} além de K_w – o produto iônico da água – a partir da titulação de um ácido forte com uma base forte de concentração conhecida sob condições de temperatura e meio iônico constantes. Portanto, pode-se relacionar o potencial medido com a concentração de íons hidrogênio usando-se a equação 2 para a titulação de uma amostra desconhecida, realizada nas mesmas condições de força iônica e temperatura.

Na região ácida da titulação de calibração, o termo $J_{OH}[OH^-]$ da equação 3 pode ser desprezado em virtude da $[OH^-]$ ser muito pequena na região. Então:

$$E = E_a^0 + 59,16\log[H^+] + J_H[H^+] \quad (4)$$

Rearranjando obtém-se:

$$E - 59,16\log[H^+] = J_H[H^+] + E_a^0 \quad (5)$$

Graficamente, $E - 59,16\log[H^+]$ em função da $[H^+]$ permite obter uma reta cujo coeficiente angular fornece o valor J_H e o linear, E_a^0 .

De maneira análoga, na região alcalina da titulação de calibração, o termo $J_H[H^+]$ da equação 3 pode ser desprezado em virtude da $[H^+]$ ser muito pequena. Então:

$$E = E_b^0 + 59,16\log[H^+] + J_{OH}[OH^-] \quad (6)$$

Rearranjando, obtém-se:

$$E + 59,16\log[OH^-] = J_{OH}[OH^-] + E_b^0 \quad (7)$$

O termo E_b^0 engloba o potencial padrão de eletrodo, o coeficiente de atividade do íon OH^- e o produto iônico da água.

Graficamente, $E + 59,16\log[OH^-]$ em função da $[OH^-]$ permite obter uma reta cujo coeficiente angular fornece o valor J_{OH} e o linear, E_b^0 .

Pela expressão:

$$\log K_w = \frac{E_a^0 - E_b^0}{59,16} \quad (8)$$

a constante de ionização da água nas condições experimentais usadas pode ser determinada.

A titulação da calibração é feita com 2,00 mL de uma solução de ácido clorídrico com concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com solução padrão de NaOH $0,1000 \text{ mol L}^{-1}$, ambas tendo como eletrólito de suporte KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. O processo de titulação é iniciado após a termostatização do sistema a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, sendo, durante o decorrer deste, borbulhado nitrogênio livre de CO_2 na cela de titulação. Essa solução é permanentemente agitada com o auxílio de uma barra magnética e cerca de 10 a 15 pontos são anotados antes e após o volume do ponto estequiométrico.

O volume do ponto estequiométrico, V_e , é determinado utilizando-se o método de Gran – pela intersecção das funções $F_1 = (V_0 + V)10^{(E/59,16)}$ (para a região ácida) e $F_2 = (V_0 + V)10^{(-E/59,16)}$ (para a região alcalina) com o eixo do volume de titulante adicionado, conforme é mostrado na Figura 09.:

Figura 9: Aplicação do método de Gran para determinação do volume do ponto estequiométrico de uma titulação de 27,00 mL de HCl $7,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com NaOH $0,1000 \text{ mol L}^{-1}$, ambos em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, a 25°C

Através da equação:

$$[\text{H}^+] = \frac{(V_e - V)}{V_0 + V} C_B \quad (9)$$

pode-se determinar a concentração de íons hidrogênio, a qual, substituída na equação 5 permite o cálculo dos valores de E_a^0 e J_H , conforme a Figura 10:

Figura 10: Determinação dos parâmetros E_a^0 e J_H sob as mesmas condições experimentais para as descritas na Figura 9

Através da equação:

$$[\text{OH}^-] = \frac{(V - V_e)}{V_0 + V} C_B \quad (10)$$

pode-se determinar a concentração de íons hidroxila que, ao ser substituída na equação 6, permite o cálculo dos valores de E_b^0 e J_{OH} , conforme a Figura 11:

Figura 11: Determinação dos parâmetros E_b^0 e J_{OH} sob as mesmas condições experimentais para as descritas na Figura 9

3.5.2 Titulação das amostras:

3.5.2.1 Curvas de titulação de ácidos húmico e fúlvico:

Após a obtenção dos parâmetros citados, utilizando-se 25,00 mL da suspensão de ácido húmico com uma concentração de $0,5000 \text{ g L}^{-1}$ preparada em meio iônico de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, tendo o cuidado de homogeneizá-la cuidadosamente antes da retirada da alíquota, procedeu-se com a sua titulação. A cela utilizada foi termostatizada e mantida em uma atmosfera inerte de N_2 da mesma forma com o ocorrido no procedimento da calibração. Procedeu-se a titulação, conforme efetuado na calibração, tendo-se o cuidado de serem efetuadas adições de volumes menores que os utilizados na calibração.

Ao término das titulações, lançaram-se os valores de potenciais lidos e os parâmetros anteriormente determinados na calibração, em um programa para converter os valores de potenciais em $\text{p}^{\text{c}}\text{H}$, isto é, no logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio, o que é feito utilizando-se a equação 2.

Posteriormente, foram efetuadas titulações das soluções de ácido fúlvico nas mesmas condições de concentrações do material húmico, força iônica e temperatura. Após a obtenção dos valores de $\text{p}^{\text{c}}\text{H}$ da titulação da amostra, estes foram lançados em um programa, compilado em Q-Basic, baseado na segmentação e linearização da curva, que utiliza funções de Gran modificadas [81,82], visando a determinação simultânea dos volumes dos pontos estequiométricos e pK_a de cada grupo de sítios ionizáveis.

Nos tratamentos de dados das curvas de titulação potenciométricas, adota-se o modelo de sítios discretos, ou seja, as substâncias húmicas são consideradas como uma mistura de ácidos monopróticos fracos e, assim a linearização é efetuada através do uso de funções de Gran modificadas.

3.6 Método das Funções de Gran Modificadas:

Seymour e colaboradores [81] mostraram as deduções sobre a obtenção das funções de Gran Modificadas, as quais, posteriormente, foram aperfeiçoadas por Aleixo e colaboradores [82]. Neste trabalho serão apresentadas as equações lineares referentes a essas funções de maneira generalizada.

Para uma titulação potenciométrica com base forte de uma mistura de N ácidos fracos, sendo HA_0 o ácido forte e HA_1 , HA_2 , ... HA_N os N ácidos fracos, a partir das

equações de balanceamento de massa e condições de eletroneutralidade, chega-se à seguinte Função de Gran Modificada, F_{HA_0} para o ácido forte HA_0 :

$$F_{HA_0} = V_{HA_0} C_B - V C_B = ([H^+] - [OH^-])(V_0 + V) - \sum_{n=1}^N (V_{HA_n} - V_{HA_{(n-1)}}) C_B A_n \quad (11)$$

e as funções F_{HA_n} para os ácidos fracos HA_n , com n variando de 1 até N , são dadas por:

$$F_{HA_0} = V_{HA_n} K_{HA_n} - V K_{HA_n} = \left\{ \frac{([H^+] - [OH^-])(V_0 + V)(K_{HA_n} + [H^+])}{C_B} \right\} + (V - V_{HA_0})[H^+] + \\ + (V_{HA_{n-1}} - V_{HA_0})K_{HA_n} - \left\{ \sum_{j=1, n>1}^{n-1} (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}}) A_j + \sum_{j=n+1}^N (V_{HA_j} - V_{HA_{(j-1)}}) A_j \right\} (K_{HA_n} + [H^+]) \quad (12)$$

Os termos V_{HA_0} e V_{HA_n} , representam o volume total de base forte necessário para a neutralização de cada componente ácido presente. Portanto, os volumes de solução padrão de base forte necessários para neutralizar cada um dos componentes ácidos presentes são: V_{HA_0} , $(V_{HA_1} - V_{HA_0})$, $(V_{HA_0} - V_{HA_1}) \dots (V_{HA_n} - V_{HA_{n-1}})$.

K_{HA_n} é a constante de dissociação do ácido fraco HA_n , dada por:

$$K_{HA_n} = \frac{[H^+][A_n^-]}{[HA_n]} \quad (13)$$

e o termo A_n é expresso por:

$$A_n = \frac{K_{HA_n}}{(K_{HA_n} + [H^+])} \quad (14)$$

V_0 é o volume inicial na cela de titulação, $[H^+]$ e $[OH^-]$ são as concentrações dos íons hidrogênio e hidroxila, respectivamente. V_{HA_j} , K_{HA_j} e A_j , mostrados na equação 12, têm significado análogo aos termos V_{HA_n} , K_{HA_n} e A_n .

Os sítios ionizáveis de polieletrólitos podem ser protonados de forma quantitativa através da adição de um ácido forte como o HCl, sendo que esta adição é optativa, pois a equação e os termos para determinação de volume de ponto estequiométrico do ácido forte são removidos facilmente do programa. Esta é uma característica importante para titulações

de substâncias húmicas, onde a presença de excesso de ácido forte dificulta a determinação de sítios ionizáveis com $pK_a < 3$, comumente encontrados nestas substâncias.

4.0 Potenciometria de Complexação:

A potenciometria direta usando eletrodo íon seletivo foi a técnica empregada para determinar a concentração de cobre nos meios de titulação, para a qual vale a seguinte relação:

$$E = A + S \times \log[Cu(II)] \quad (15)$$

Onde:

E = potencial medido na cela eletroquímica.

A = constante que inclui o potencial do eletrodo de referência, o potencial de junção líquida, o potencial padrão de redução do Cu(II) e o coeficiente de atividade do Cu(II).

$S = 2,303RT/nF$, cujo valor teórico é 29,6 mV a 25°C.

Os termos A e S da equação (15) foram determinados experimentalmente em meio não complexante, por titulação de uma solução de KNO_3 (0,10 mol L^{-1}) em pH's $4,00 \pm 0,05$, $5,00 \pm 0,05$ e $6,00 \pm 0,05$ com uma solução padrão de Cu (II) em meio KNO_3 (0,10 mol L^{-1}). O pH da solução titulada foi mantido nos intervalos citados adicionando-se volumes apropriados de uma solução de NaOH $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} também em meio KNO_3 0,10 mol L^{-1} . Ainda, com o uso do aparelho de banho termostático, a temperatura foi mantida em $25,0 \pm 0,1^\circ C$. Nesta titulação de calibração a concentração de cobre livre, [Cu(II)], foi considerada igual à concentração de cobre total adicionado à cela, $C_{Cu(II)}$, calculada em cada ponto da titulação usando-se a equação:

$$[Cu(II)] = C_{Cu(II)} = \frac{V \times M_{Cu(II)}}{(V_0 + V + V_B)} \quad (16)$$

Onde:

[Cu(II)] = Concentração de Cu(II) livre na solução em mol L^{-1} ;

$C_{Cu(II)}$ = Concentração total de Cu(II) adicionado em mol L^{-1} ;

V = volume de solução de Cu(II) adicionado à cela de titulação;

$M_{Cu(II)}$ = Concentração da solução titulante de Cu(II) em mol L^{-1} ;

V_0 = Volume inicial na cela de titulação;

V_B = Volume de base adicionado à cela de titulação.

Os valores de A e S determinados em meio não complexante foram usados para calcular primeiramente os logaritmos das concentrações de cobre livre presentes na titulação da suspensão 30 mg L^{-1} de ácido húmico e da solução de mesma concentração de ácido fúlvico, ambas preparadas em meio KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

4.0.1 Procedimentos:

Anteriormente à etapa da titulação das amostras de ácido húmico e fúlvico, foi realizado um procedimento de calibração na cela potenciométrica no qual consistiu na adição de 25,00 mL de uma solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, mantida sob agitação constante por uma barra magnética e um agitador, em atmosfera de nitrogênio com adições de volumes adequados de uma solução padrão de Cu(II) em força iônica de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e sucessivas adições de volumes de NaOH $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ suficientes para manter o pH no intervalo desejado ($4,00 \pm 0,05$, $5,00 \pm 0,05$, ou $6,00 \pm 0,05$). A temperatura foi estabilizada em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ com o uso de um banho termostático Ética. Após a adição dos volumes das soluções de Cu(II)/ KNO_3 e NaOH/ KNO_3 , aguardou-se a estabilização do potencial lido e anotou-se o mesmo.

Após serem obtidos os dados referentes a esta etapa inicial, construiu-se um gráfico do potencial em função do logaritmo da concentração de Cu(II), como mostrado na Figura 12, do qual extraíram-se os termos S e A, correspondentes, respectivamente, aos coeficientes angular e linear. Este procedimento foi repetido em condições semelhantes para pH $5,00 \pm 0,05$ e $6,00 \pm 0,05$. As Figura 13 e 14 mostram os equipamentos utilizados nesta etapa.

Figura 12: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meio não complexante (KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) e complexante, (ácido húmico $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$), ambos em $\text{pH } 6,00 \pm 0,05$, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Figura 13: Sistema utilizado para a titulação potenciométrica dos ácidos húmico e fúlvico, com destaque para os dois potenciômetros, um para monitorar íons Cu(II) e outro para pH

Figura 14: Destaque para a cela de titulação, juntamente com: (a) eletrodo íon seletivo de cobre; (b) eletrodo de referência; (c) eletrodo combinado para monitoração de pH; (d) umidificador de N₂; (e) bureta contendo solução de NaOH 2,0 x 10⁻³ mol L⁻¹/KNO₃ 0,10 mol L⁻¹

Figura 15: Esquemas dos eletrodos utilizados para a titulação potenciométrica dos ácidos húmico e fúlvico, sendo: (A): eletrodo combinado Ag/AgCl; (B): eletrodo de referência Ag/AgCl e (C): eletrodo íon seletivo.

Após este passo, a titulação das amostras foi iniciada sob as condições já citadas de meio iônico, temperatura, atmosfera de nitrogênio e agitação nos valores de pH 4,00, 5,00 ou 6,00 ($\pm 0,05$ unidades).

Os potenciais lidos no decorrer da titulação, após a estabilização do sinal, foram anotados e, a partir da equação 15, com o auxílio dos termos A e S obtidos anteriormente na calibração, pôde-se calcular a concentração de Cu(II) livre presente no meio complexante.

4.1 Métodos de cálculo:

4.1.1 Cálculo de concentração:

Nas titulações da suspensão de ácido húmico e da solução de ácido fúlvico, a concentração de cobre complexado, [CuL], foi calculada a partir do balanço de massa mostrados pelas equações 17 e 18:

$$[\text{CuL}] + [\text{Cu(II)}] = C_{\text{Cu(II)}} \quad (17)$$

$$[\text{CuL}] = C_{\text{Cu(II)}} - [\text{Cu(II)}] \quad (18)$$

4.1.1.1 Método de Scatchard:

Os sítios ionizáveis e de complexação contidos nos materiais húmicos em estudo possuem diferentes naturezas químicas. Os sítios que formam complexos mais estáveis são ocupados em primeiro lugar, o que acarreta a uma função de distribuição das constantes de equilíbrio a qual é dependente do grau de ocupação dos sítios (θ). O grau de ocupação médio dos sítios de complexação/adsorção de uma classe j na superfície da substância húmica é dado pela equação:

$$j\theta = \frac{[\text{CuL}_j]}{[\text{L}_j]_t} \quad (19)$$

Onde:

θ = grau de ocupação médio dos sítios de classe j ($\theta = [\text{CuL}_j]/[\text{L}_j]_t$);

[CuL_j] = Concentração de íons Cu(II) ligados à classe de sítios j;

[L_j]_t = Concentração total dos sítios de complexação do tipo j;

No caso de ligantes de ocorrência natural como as substâncias húmicas, cujas massas molares não são definidas por um único valor, mas sim pela função de distribuição, e a concentração de sítios de complexação não é conhecida inicialmente, expressa-se o grau de ocupação dos sítios do tipo j como:

$$jv = \frac{[CuL_j]}{\{P\}} = Cc\theta \quad (20)$$

Onde:

$\{P\}$ = Concentração do ligante em $g L^{-1}$;

Cc = Capacidade de complexação (quantidade de matéria de Cu(II) que pode ser ligada por grama de SH);

θ = grau de ocupação médio dos sítios complexantes ($\theta = [CuL]/[L]_t$).

A concentração total de sítios de complexação/adsorção do tipo j pode ser obtida a partir da relação:

$$[L_j]_t = Cc\{P\} \quad (21)$$

Assumindo-se que os complexos formados têm estequiometria 1:1 e que o experimento é conduzido em força iônica e temperatura constantes, de modo que a carga elétrica sobre a superfície mantém-se constante, assim como sua conformação espacial, o grau de ocupação médio pode ser expresso de acordo com a isoterma de Langmuir [32].

A equação de Langmuir pode ser definida pela seguinte expressão:

$$q_i = \frac{bKC_i}{1 + KC_i} \quad (22)$$

Onde:

q_i : concentração do complexo – $[ML]$;

b : concentração máxima de sítios de complexação – $[L]_t$;

C_i : concentração em equilíbrio – $[M]$;

K : constante relacionada com a energia livre de ligação (constante de estabilidade);

Assim, tem-se a seguinte equação:

$$[ML] = \frac{[L]_t K[M]}{1 + K[M]} \quad (23)$$

Da qual, rearranjando, obtém-se:

$$[ML] + [ML]K[M] = [L]_t K[M] \quad (24)$$

Isolando-se o termo referente à concentração do metal complexado:

$$[ML] = [L]_t K[M] - [ML]K[M] \quad (25)$$

Assim, pode ser obtida a equação de Scatchard:

$$\frac{[ML]}{[M]} = [L]_t K - K[ML] \quad (26)$$

A partir da equação 26 pode-se concluir que um gráfico de $[CuL_j]/[Cu(II)]$ em função de $[CuL_j]$ é linear, sendo que o coeficiente angular fornece o negativo da constante de estabilidade média, enquanto a razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear fornece a concentração total dos sítios de complexação/adsorção da classe j.

Quando $j = 2$, a equação 26 deixa de ser linear, conforme é mostrado na Figura 16, entretanto, se K_1 e K_2 forem diferentes de forma significativa, dois segmentos lineares são obtidos, os quais permitem a determinação de K_1 e K_2 , assim como de Cc_1 e Cc_T .

Figura 16: Gráfico de Scatchard elaborado com os dados de uma titulação de suspensão $30 mg L^{-1}$ de ácido húmico com solução de $Cu(II) 4,70 mmol L^{-1}$ em meio de $KNO_3 0,10 mol L^{-1}$ e $pH 6,00 \pm 0,05$, a $25,0 \pm 0,1^\circ C$

4.1.1.2 Regressão não linear:

Utilizando-se a ferramenta de regressão não linear Levenberg Marquadt do programa Microcal Origin® 6.0 com a equação de Langmuir, obtêm-se as constantes de estabilidade, assim como as capacidades complexantes dos materiais húmicos com os íons Cu(II). A equação de Langmuir para dois sítios de complexação é dada por:

$$[ML] = \sum_{j=1}^2 \frac{[L_j]_T K_j [M]}{1 + K_j [M]} \quad (27)$$

Onde [ML] é a variável dependente e [M] é a variável independente.

4.1.2 Funções de Equilíbrio Diferenciais (DEF):

Devido à heterogeneidade química dos sítios de complexação, não há como caracterizar uma constante de equilíbrio K_j para cada sítio j . Os valores de $\log K$ determinados pelo método de Scatchard são valores médios e muitas vezes, mistos entre os sítios de maior e menor afinidade pelo cátion metálico. A interpretação dos dados de titulação de um sistema altamente heterogêneo levou à definição do parâmetro de equilíbrio diferencial (K_{DEF}) dado pela média aritmética ponderada das constantes de equilíbrio condicionais K_j para todos os sítios do tipo j envolvidos na complexação [83,84].

$$K_{DEF} = \frac{\sum_{j=1}^m K_j \theta_j (1 - \theta_j) \Delta x_j}{\sum \theta_j (1 - \theta_j) \Delta \Delta_j} \quad (28)$$

Onde:

K_{DEF} = Constante de estabilidade em função do grau de ocupação dos sítios complexantes;

Δx_j = fração molar do sítio complexante do tipo j , $\Delta x_j = [L_j]_t / [L]_t$;

m = número de diferentes tipos de sítios envolvidos na complexação.

O parâmetro K_{DEF} depende da composição do sítio de complexação através dos valores de K_j e Δx_j e do fator de ponderação $\theta_j(1-\theta_j)$. Este fator indica que o valor de K_{DEF} é controlado principalmente pelos sítios j que estão aproximadamente 50% saturados em um

certo ponto de titulação. Como K_{DEF} incorpora alguma influência de todos os sítios presentes na macromolécula ou superfície, também não pode ser associado a um único valor de K . A partir da equação 26, uma expressão baseada em dados experimentais pode ser deduzida para K_{DEF} :

$$K_{DEF} = -\frac{\alpha^2}{C_{Cu(II)}} \left\{ \frac{1 - \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{d \ln[L]_t}{d \ln \alpha} \right)}{1 + (\alpha - 1) \left[\frac{d \ln \left(\frac{C_{Cu(II)}}{[L]_t} \right)}{d \ln \alpha} \right]} \right\} \quad (29)$$

Onde:

$$\alpha = \frac{C_{Cu(II)}}{[Cu(II)]}$$

$[L]_t$ = concentração total de sítios ligantes que pode ser expressa em qualquer unidade diretamente relacionada à concentração total de sítios de complexação (mol L^{-1} ou mol g^{-1}).

Em um caso de titulação como o das SH, a concentração de ligantes é praticamente constante, assim como o número de sítios de complexação, de modo que a equação 28 pode ser reescrita como:

$$K_{DEF} = -\frac{\alpha^2}{C_{Cu(II)}} \left[\frac{1}{1 + (\alpha - 1) \left(\frac{d \ln C_{Cu(II)}}{d \ln \alpha} \right)} \right] \quad (30)$$

Como não existe uma expressão analítica relacionando $C_{Cu(II)}$ com α , o termo derivada $\ln C_{Cu(II)}/\ln \alpha$ é encontrado por ajuste polinomial e então a derivada do polinômio é utilizada na equação 30, conforme mostra a Figura 17

Figura 17: Gráfico de $\ln C_{\text{Cu(II)}}$ em função de $\ln \alpha$ para determinação da função diferencial $d \ln C_{\text{Cu(II)}}/d \ln \alpha$

Os valores de K_{DEF} podem ser relacionados com o grau de ocupação, θ , dos sítios de complexação pela equação:

$$\log \theta = \Gamma \log K_{\text{DEF}}^{\circ} - \Gamma \log K_{\text{DEF}} \quad (31)$$

Onde:

K_{DEF}° = valor de K_{DEF} quando todos os sítios complexantes estão ocupados, ou seja, quando $\theta = 1$.

Γ = parâmetro de heterogeneidade (igual a 1 para ligante simples e igual a zero para um ligante totalmente heterogêneo).

Experimentalmente, determina-se a concentração do íon livre em solução, $[\text{Cu(II)}]$, calcula-se α ($C_{\text{Cu(II)}}/[\text{Cu(II)}]$). Construindo-se um gráfico de $\ln C_{\text{Cu(II)}}$ em função de $\ln \alpha$ obtém-se uma equação polinomial (geralmente de ordem dois ou três). Substituindo-se a derivada deste polinômio na equação 30, calcula-se os valores de K_{DEF} . Fazendo $\log K_{\text{DEF}}$ em função de $\log \theta$ obtém-se um segmento de reta onde o coeficiente angular é o parâmetro de heterogeneidade (Γ), enquanto que a divisão do coeficiente linear pelo coeficiente

angular fornece o valor de $\log K_{\text{DEF}}^{\circ}$, que é o valor de $\log K_{\text{DEF}}$ quando todos os sítios complexantes estão ocupados, ou seja $\theta = 1$ e, portanto, $\log \theta = 0$ [84].

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 Composição elementar e teor de cinzas:

A análise elementar dos ácidos húmico e fúlvico foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, sendo que os resultados são mostrados na Tabela 4. Os resultados são dados em termos da percentagem em massa dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio.

Tabela 4: Percentagens em massa dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio encontradas nos ácidos húmico e fúlvico

Amostra	Elemento (%)		
	C	H	N
Ácido húmico	57,71	4,42	2,36
Ácido fúlvico	46,79	4,02	1,09

Pode-se observar que os resultados apresentados na Tabela 4 estão localizados dentro dos intervalos percentuais apontados pela literatura, previamente mostrados na Tabela 2, indicando que os valores obtidos são consistentes com a composição elementar média para ácidos húmicos e fúlvicos.

O teor em cinzas de ambos materiais é mostrado na Tabela 5. O teor de cinzas ao redor de 4% observado para o ácido húmico pode ser considerado baixo, principalmente levando-se em conta que extratos alcalinos de solos resultam em frações húmicas brutas contendo cerca de 30% de cinzas [21]. Como se pode verificar, o método de isolamento e purificação descrito pela IHSS [78], baseado na utilização de HF, é bastante eficiente na remoção do material inorgânico, especialmente sílica e silicatos presentes originalmente na amostra de vermicomposto.

Tabela 5: Teor em cinzas dos ácidos húmico e fúlvico representados em porcentagem

Amostra	Teor de Cinzas
Ácido húmico	4±1
Ácido fúlvico	N.D. ^a

a- Não Detectado

As concentrações de Cu(II) presentes nos ácidos húmico e fúlvico foram determinadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Estas determinações foram realizadas após digestão das amostras com ácido nítrico e

peróxido de hidrogênio [4] utilizando a técnica de ICP-AES. Os valores obtidos foram muito inferiores às concentrações analíticas utilizadas nas titulações ($<10^{-8}$ mol L⁻¹). Assim, tais concentrações não tiveram influencia significativa nos resultados do tratamento de dados empregado neste trabalho.

5.2 Caracterização ácido-base:

A interpretação das curvas de titulação dos ácidos húmicos é complicada pela presença dos grupos carboxílicos, fenólicos e aminos – uma mistura de espécies com diferentes forças ácidas. Ainda, os ácidos húmicos têm características polieletrólíticas, de modo que um grande número de cargas elétricas (dependentes do pH) afeta as constantes de dissociação dos grupos tituláveis. Outro problema é que a intensidade destas interações eletrostáticas é influenciada pela massa molar da macromolécula [4-6] e, se forem feitas separações, uma amostra de ácido húmico pode conter moléculas com massas molares variáveis.

Vários autores [85,86] interpretam as curvas de titulação ácido-base baseadas na teoria eletrostática desenvolvida por Tanford para macromoléculas [87]. Neste modelo, todos os grupos carboxílicos devem ser idênticos em suas afinidades pelo H⁺. Entretanto, a heterogeneidade química entre os grupos carboxílicos, ou entre os grupos fenólicos, é desprezada. Alguns autores adotam um modelo no qual a afinidade dos sítios de ligação pelos íons H⁺ se comporta de forma contínua, resultando em valores de pK_a que dependem do pH da solução [88,89]. Este comportamento seria explicado pelas cargas elétricas influenciando a dissociação dos prótons, ou seja, quanto maior a densidade de cargas negativas (maiores valores de pH), maior é a energia necessária para remover o próton do sítio ionizável da macromolécula, resultando em maior valor de pK_a [88,89].

Outros autores [82,90,91] assumem que os grupos ionizáveis nos ácidos húmicos se comportam como uma mistura de ácidos monopróticos fracos. As constantes de dissociação devem ser dependentes apenas da identidade química do grupo ionizável, assim como as interações locais devido ao ambiente físico e químico no qual o grupo está localizado na macromolécula. Aqui, os efeitos de acúmulo de carga nas constantes de dissociação são desprezados. Marinsky e Ephraim [92] e Tipping e colaboradores [93] propuseram uma

combinação de heterogeneidade química e interação eletrostática para descrever as propriedades ácido-base dos ácidos húmicos.

Na presente dissertação adotou-se o modelo de distribuição de sítios discretos, no qual as substâncias húmicas são tratadas como uma mistura de ácidos fracos monoprotônicos. Para tratamento de dados utilizou-se um método de linearização de dados de titulações potenciométricas, primeiramente aplicado para ácidos húmicos por Aleixo e colaboradores [82]. Este método utiliza as funções de Gran modificadas [94] – uma coleção de equações lineares baseada em um rigoroso balanço de massa descrevendo o equilíbrio envolvido em uma titulação de misturas de ácidos monoprotônicos na presença de um ácido forte. Quando estas equações são aplicadas a polieletrólitos, a energia livre eletrostática necessária para produzir a dissociação protônica é desprezada [98]. Aleixo e colaboradores [82] caracterizaram seis grupos tituláveis no ácido húmico. A mesma metodologia foi aplicada a proteínas e, neste caso, os grupos carboxílicos e aminos foram divididos em sub-grupos com diferentes pK_a 's. Godinho e colaboradores [95] mostraram que esta divisão deve ser uma consequência do desprezo aos efeitos eletrostáticos sobre as constantes de dissociação; então, a caracterização de dois ou três tipos de grupos carboxílicos nos polieletrólitos pode ser uma consequência de um ajuste numérico. Em trabalhos posteriores, Masini e colaboradores demonstraram que no caso de amostras de ácidos húmicos comerciais [96,98], ou isolados de vermicomposto ou sedimentos [96,97], a contribuição da heterogeneidade química dos sítios ionizáveis é mais importante do que os efeitos eletrostáticos na definição do número de classes de grupos que ajustam os dados de titulação potenciométrica. Para isto titulações foram realizadas em diferentes valores de força iônica, observando-se que, ao contrário do caso de titulações de proteínas, o número de classes de grupos definidos pelas funções de Gran modificadas para os ácidos húmicos é independente da força iônica. Adicionalmente, para meios iônicos mais concentrados do que $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, a influência da força iônica sobre os valores de pK_a dos sítios ionizáveis [96] torna-se pouco significativa. Neste sentido, os trabalhos experimentais da presente dissertação foram realizados em meio iônico de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Um exemplo do conjunto de dados experimentais de titulação potenciométrica ácido-base e das funções de Gran modificadas são mostrados, respectivamente, nas Tabelas

6 e 7, calculadas na determinação da concentração de sítios ionizáveis e seus pK_a 's, para a amostra de ácido húmico extraída a partir de vermicomposto.

A partir dos parâmetros obtidos na calibração dos eletrodos $E^{0'} = 419,8 \text{ mV}$, $jH = -39,7 \text{ mV mol}^{-1} \cdot L^{-1}$, $jOH = -19,1 \text{ mV mol}^{-1} L^{-1}$ e $K_w = 1,80 \times 10^{-14}$, de acordo com o item 3.5.1 e dos dados de volumes de NaOH, os potenciais lidos no decorrer da titulação da amostra de ácido húmico ou fúlvico são convertidos em p^cH .

Posteriormente, os volumes de NaOH, valores de p^cH obtidos, volume inicial contido na cela de titulação, concentração da solução de NaOH em mol L^{-1} e K_w , foram inseridos num programa de regressão linear que utiliza as funções de Gran modificadas [94,99,100], o qual segmenta e lineariza os dados, de forma a proporcionar as concentrações de cada grupo de sítios ionizáveis juntamente com seus respectivos pK_a 's. Este objetivo é alcançado após a estimativa dos fatores:

1. número de grupos de sítios ionizáveis;
2. volumes de solução de NaOH nos respectivos pontos estequiométricos e, finalmente,
3. constantes de ionização aproximadas de cada grupo.

Assim, o programa efetua sucessivas iterações e fornece os resultados: volumes dos pontos estequiométricos, concentrações, pK_a , K_a e coeficientes de correlação, R , para cada grupo de sítios ionizáveis. As Tabelas 6 e 7 mostram, respectivamente, a conversão dos valores de potenciais em p^cH , obtidos de uma das titulações do ácido húmico extraído de vermicomposto e a listagem obtida pela aplicação da regressão linear.

Tabela 6: Modelo de listagem de conversão dos potenciais em p^cH para uma titulação de ácido húmico

N	VOLUME	E(mV)	pH	pOH
1	0,0000	204,9	3,346	10,373
2	0,0250	202,4	3,388	10,330
3	0,0500	195,7	3,502	10,217
4	0,0750	186,8	3,652	10,067
5	0,0850	182,8	3,719	10,000
6	0,0950	178,5	3,792	9,927
7	0,1050	173,8	3,871	9,848
8	0,1150	168,7	3,957	9,761
9	0,1250	163,4	4,047	9,672
10	0,1350	157,7	4,143	9,576
11	0,1450	151,8	4,253	9,476
12	0,1550	145,6	4,348	9,371

13	0,1650	139,6	4,449	9,270
14	0,1750	133,5	4,552	9,167
15	0,1850	127,8	4,659	9,070
16	0,1950	122,2	4,753	8,976
17	0,2050	117,1	4,829	8,889
18	0,2150	112,1	4,914	8,805
19	0,2250	108,9	4,968	8,751
20	0,2400	99,1	5,134	8,585
21	0,2550	90,1	5,286	8,433
22	0,2700	80,6	5,446	8,273
23	0,2800	75,5	5,533	8,186
24	0,2900	68,7	5,648	8,071
25	0,3000	61,2	5,774	7,945
26	0,3050	57,8	5,832	7,887
27	0,3100	53,9	5,898	7,821
28	0,3150	49,7	5,969	7,750
29	0,3200	45,4	6,041	7,678
30	0,3250	40,9	6,117	7,601
31	0,3300	36,1	6,199	7,520
32	0,3350	31,2	6,281	7,438
33	0,3400	26,1	6,368	7,351
34	0,3450	20,8	6,457	7,262
35	0,3500	15,1	6,554	7,165
36	0,3550	9,4	6,650	7,069
37	0,3600	3,5	6,750	6,969
38	0,3650	-2,8	6,856	6,863
39	0,3700	-9,6	6,971	6,748
40	0,3750	-16,1	7,081	6,638
41	0,3800	-22,9	7,196	6,523
42	0,3850	-29,8	7,313	6,406
43	0,3900	-36,9	7,433	6,286
44	0,3950	-43,7	7,548	6,171
45	0,4000	-51,1	7,673	6,046
46	0,4050	-58,2	7,793	5,926
47	0,4100	-65,6	7,918	5,801
48	0,4150	-72,9	8,041	5,678
49	0,4200	-80,2	8,164	5,554
50	0,4250	-87,3	8,285	5,434
51	0,4300	-93,4	8,388	5,331
52	0,4350	-99,4	8,489	5,230
53	0,4400	-106,6	8,611	5,108
54	0,4454	-113,5	8,727	4,992
55	0,4500	-120,0	8,837	4,882
56	0,4550	-126,4	8,946	4,773
57	0,4600	-132,1	9,042	4,677
58	0,4650	-137,6	9,135	4,584
59	0,4700	-142,3	9,214	4,505
60	0,4750	-146,8	9,290	4,428
61	0,4800	-151,5	9,370	4,349
62	0,4850	-155,8	9,443	4,276
63	0,4900	-160,0	9,514	4,205
64	0,4950	-163,7	9,576	4,143
65	0,5000	-167,4	9,639	4,080
66	0,5050	-170,8	9,697	4,022
67	0,5100	-173,9	9,749	3,970
68	0,5150	-176,7	9,796	3,923

69	0,5200	-179,3	9,840	3,879
70	0,5300	-184,4	9,927	3,792
71	0,5400	-188,8	10,001	3,718
72	0,5500	-192,5	10,064	3,655
73	0,5600	-195,8	10,120	3,599
74	0,5700	-199,3	10,180	3,539
75	0,5950	-206,7	10,305	3,414
76	0,6000	-207,8	10,324	3,395
77	0,6250	-213,6	10,423	3,296
78	0,6500	-218,4	10,505	3,214
79	0,6750	-222,5	10,575	3,144
80	0,7000	-226,1	10,636	3,083
81	0,7250	-229,2	10,689	3,030
82	0,7500	-232,0	10,737	2,982
83	0,8000	-236,9	10,822	2,897
84	0,8500	-241,1	10,894	2,825
85	0,9000	-244,6	10,955	2,764
86	0,9500	-247,7	11,009	2,710
87	1,0000	-250,5	11,058	2,661
88	1,0500	-253,1	11,103	2,616
89	1,1000	-255,4	11,143	2,575
90	1,2000	-259,3	11,212	2,507
91	1,3000	-262,7	11,273	2,446
92	1,4000	-265,7	11,327	2,392
93	1,5000	-268,4	11,376	2,343
94	1,6000	-270,7	11,418	2,301
95	1,7000	-272,9	11,458	2,261
96	1,8000	-274,9	11,495	2,224
97	1,9000	-276,7	11,529	2,190
98	2,0000	-278,4	11,561	2,158
99	2,1000	-279,9	11,589	2,130
100	2,2000	-281,4	11,618	2,101
101	2,3000	-282,8	11,645	2,074
102	2,4000	-284,1	11,670	2,049
103	2,5000	-285,3	11,694	2,025

N = numeração seqüencial; V = volume de NaOH 0,1090 mol L⁻¹ adicionado (força iônica 0,10 mol L⁻¹ KNO₃); E (mV) = potencial em milivolts. Condições: CAH = 0,5000 g L⁻¹; volume inicial = 25,00 mL; força iônica = 0,10 mol L⁻¹ KNO₃; T = 25,0±0,1°C; eletrodo de referência = Ag/AgCl – KCl 3 mol L⁻¹

Tabela 7: Segmentação e linearização dos dados da Tabela 5 para obtenção das concentrações e pKa de cada grupo de sítios ionizáveis

PARA HA 1:

N1= 1	N2= 11			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,0000	3,346	1,0617E-04	1,1395E-04	-6,8321E+00
0,0250	3,388	1,0285E-04	9,4566E-05	8,7625E+00
0,0500	3,502	7,9733E-05	7,5180E-05	6,0561E+00
0,0750	3,652	5,5692E-05	5,5795E-05	-1,8396E-01
0,0850	3,719	4,7069E-05	4,8040E-05	-2,0215E+00
0,0950	3,792	3,8756E-05	4,0286E-05	-3,7971E+00
0,1050	3,871	3,0814E-05	3,2531E-05	-5,2794E+00
0,1150	3,957	2,3146E-05	2,4777E-05	-6,5825E+00
0,1250	4,057	1,5986E-05	1,7023E-05	-6,0928E+00
0,1350	4,153	9,0074E-06	9,2683E-06	-2,8154E+00
0,1450	4,243	2,1995E-06	1,5139E-06	4,5281E+01
0,1550	4,348	-4,7300E-06	-6,2404E-06	-2,4204E+01
VHA	CHA	pKA	KHA	R
0,14695	7,4299E-04	3,11045	7,7544E-04	-0,99472797

PARA HA 2:

N1= 24	N2= 10			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,2900	5,648	3,0002E-07	2,9156E-07	2,9032E+00
0,3000	5,774	2,2705E-07	2,2990E-07	-1,2362E+00
0,3050	5,832	1,9784E-07	1,9906E-07	-6,1661E-01
0,3100	5,898	1,6598E-07	1,6823E-07	-1,3368E+00
0,3150	5,969	1,3392E-07	1,3740E-07	-2,5314E+00
0,3200	6,041	1,0379E-07	1,0657E-07	-2,6088E+00
0,3250	6,117	7,3960E-08	7,5739E-08	-2,3483E+00
0,3300	6,199	4,3577E-08	4,4908E-08	-2,9631E+00
0,3350	6,281	1,4870E-08	1,4076E-08	5,6363E+00
0,3400	6,368	-1,4427E-08	-1,6755E-08	-1,3892E+01
0,3450	6,457	-4,3484E-08	-4,7586E-08	-8,6202E+00
VHA	CHA	pKA	KHA	R
0,19033	9,6231E-04	5,20998	6,1663E-06	-0,99941790

PARA HA 3:

N1= 37	N2= 9			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,3600	6,750	5,3486E-09	5,1614E-09	3,6259E+00
0,3650	6,856	4,6243E-09	4,5382E-09	1,8967E+00
0,3700	6,971	3,8475E-09	3,9150E-09	-1,7249E+00
0,3750	7,081	3,1902E-09	3,2918E-09	-3,0867E+00
0,3800	7,196	2,5395E-09	2,6686E-09	-4,8367E+00
0,3850	7,313	1,9260E-09	2,0454E-09	-5,8369E+00
0,3900	7,433	1,3370E-09	1,4222E-09	-5,9936E+00
0,3950	7,548	8,0972E-10	7,9900E-10	1,3418E+00
0,4000	7,673	2,4238E-10	1,7580E-10	3,7874E+01
0,4050	7,793	-2,9510E-10	-4,4740E-10	-3,4043E+01
VHA	CHA	pKA	KHA	R
0,06413	3,2423E-04	6,90434	1,2464E-07	-0,99808246

PARA HA 4:

N1= 53	N2= 11			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,4400	8,611	7,8157E-11	7,2579E-11	7,6853E+00
0,4450	8,727	5,9499E-11	5,8198E-11	2,2344E+00
0,4500	8,837	4,2629E-11	4,3818E-11	-2,7133E+00
0,4550	8,946	2,6045E-11	2,9438E-11	-1,1525E+01
0,4600	9,042	1,1832E-11	1,5057E-11	-2,1419E+01
0,4650	9,135	-2,3938E-12	6,7669E-13	-4,5375E+02
0,4750	9,290	-2,7203E-11	-2,8084E-11	-3,1375E+00
0,4800	9,370	-4,1601E-11	-4,2465E-11	-2,0338E+00
0,4850	9,443	-5,5657E-11	-5,6845E-11	-2,0894E+00
0,4900	9,514	-7,0476E-11	-7,1226E-11	-1,0528E+00
0,4950	9,576	-8,4337E-11	-8,5606E-11	-1,4819E+00
VHA	CHA	pKA	KHA	R
0,06382	3,2270E-04	8,54120	2,8761E-09	-0,99879211

PARA HA 5:

N1= 64	N2= 9			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,4950	9,576	4,7052E-12	4,5652E-12	3,0650E+00
0,5000	9,639	4,1745E-12	4,1413E-12	8,0207E-01
0,5050	9,697	3,6737E-12	3,7174E-12	-1,1769E+00
0,5100	9,749	3,2365E-12	3,2935E-12	-1,7300E+00
0,5150	9,796	2,8441E-12	2,8696E-12	-8,8655E-01
0,5200	9,840	2,4527E-12	2,4457E-12	2,8728E-01
0,5300	9,927	1,4960E-12	1,5979E-12	-6,3744E+00
0,5400	10,001	6,5139E-13	7,5003E-13	-1,3152E+01
0,5500	10,064	-9,1954E-14	-9,7787E-14	-5,9645E+00
0,5600	10,120	-8,0497E-13	-9,4561E-13	-1,4873E+01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0,08361	4,2274E-04	10,07170	8,4782E-11	-0,99892980

N1 e N2 são estimados, onde N1 = número que representa o primeiro ponto escolhido para efetuar a regressão linear de um dado segmento de reta, de acordo com numeração sequencial da Tabela 5; N2 = número de pontos que deve ser somado a N1, que determina o último ponto do intervalo da regressão linear de um dado segmento de reta; VOLUME = volume de solução de NaOH; FG. MODIF = função de Gran modificada; FG. AJUST = função de Gran ajustada; DESVIO = diferença em % entre FG. MODIF e FG. AJUST, com relação à FG. AJUST.; HA1 a H1A5 representam 5 grupos de sítios ionizáveis, que foram possíveis de serem caracterizados neste estudo; VHA = volume do ponto estequiométrico, CHA = concentração (mol L^{-1}), pKA = $-\log K_a$, sendo K_a a constante de dissociação para um dado grupo de sítios ionizáveis; R = coeficiente de correlação. Condições conforme a Tabela 5.

Após a conclusão dos cálculos, converte-se o resultado de CHA em mmol de sítios ionizáveis por grama de amostra, de acordo com a concentração da suspensão utilizada na análise. Uma característica muito importante desta análise é a possibilidade de se determinar a concentração dos diferentes grupos de sítios ionizáveis e os valores de pKa. A

Figura 18 mostra a curva de titulação ácido base de uma amostra de ácido húmico (Tabelas 6 e 7) segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas.

Figura 18: Curva de titulação segmentada e linearizada utilizando funções de Gran modificadas. Condições: CHA = 0,5000 g L⁻¹; volume inicial = 25,0 mL; força iônica = 0,10 mol L⁻¹ em KNO₃; T = 25,0 ± 0,1°C; eletrodo de referência = Ag/AgCl – KCl 3 mol L⁻¹; FHAn = funções de Gran modificadas (n = 1-5, representam cada grupo de sítios ionizáveis)

Outro exemplo do conjunto de dados experimentais de titulação potenciométrica ácido-base e das funções de Gran modificadas, sob as mesmas condições aplicadas para o ácido húmico, são mostrados, respectivamente, nas Tabelas 8 e 9, relativas a determinação da concentração de sítios ionizáveis e seus pK_a's para uma amostra de ácido fúlvico extraída a partir do mesmo vermicomposto.

Tabela 8: Modelo de listagem de conversão dos potenciais em p^cH para uma titulação de ácido fúlvico

N	VOLUME	E(mV)	p ^c H	pOH	N	VOLUME	E(mV)	p ^c H	pOH
1	0,0000	251,8	2,588	11,109	43	0,9300	71,7	5,632	8,065
2	0,0200	250,9	2,603	11,094	44	0,9400	65,0	5,745	7,951
3	0,0500	249,5	2,627	11,07	45	0,9500	57,8	5,867	7,83
4	0,1000	246,8	2,672	11,024	46	0,9600	50,0	5,999	7,698
5	0,1500	243,8	2,723	10,974	47	0,9700	41,1	6,149	7,547
6	0,2000	240,6	2,777	10,92	48	0,9750	36,6	6,225	7,471
7	0,2500	236,9	2,840	10,857	49	0,9800	31,9	6,305	7,392
8	0,3000	232,8	2,909	10,788	50	0,9850	26,7	6,393	7,304
9	0,3500	228,1	2,989	10,708	51	0,9900	21,1	6,487	7,209
10	0,4000	222,7	3,080	10,617	52	0,9950	15,5	6,582	7,115
11	0,4500	216,3	3,188	10,509	53	1,0000	9,2	6,689	7,008
12	0,5000	208,8	3,315	10,382	54	1,0050	2,6	6,800	6,897
13	0,5250	204,6	3,386	10,311	55	1,0100	-5,0	6,929	6,768
14	0,5500	199,9	3,465	10,232	56	1,0150	-12,3	7,052	6,645
15	0,5750	194,9	3,550	10,147	57	1,0200	-20,6	7,192	6,504
16	0,6000	189,3	3,644	10,052	58	1,0250	-29,1	7,336	6,361
17	0,6250	183,4	3,744	9,953	59	1,0300	-38,2	7,490	6,207
18	0,6500	177	3,852	9,845	60	1,0350	-48,0	7,656	6,041
19	0,6750	170,2	3,967	9,730	61	1,0400	-57,5	7,816	5,881
20	0,7000	163,1	4,087	9,610	62	1,0450	-67,4	7,983	5,713
21	0,7100	160,2	4,136	9,561	63	1,0500	-77,4	8,152	5,544
22	0,7200	157,3	4,185	9,512	64	1,0550	-87,0	8,315	5,382
23	0,7300	154,2	4,238	9,459	65	1,0600	-96,8	8,480	5,216
24	0,7400	151,2	4,288	9,408	66	1,0650	-105,8	8,633	5,064
25	0,7500	147,9	4,344	9,353	67	1,0700	-114,1	8,773	4,924
26	0,7600	144,7	4,398	9,299	68	1,0750	-122,0	8,906	4,790
27	0,7700	141,2	4,457	9,239	69	1,0800	-129,6	9,035	4,662
28	0,7800	137,9	4,513	9,184	70	1,0850	-136,6	9,153	4,544
29	0,7900	134,4	4,572	9,124	71	1,0900	-143,1	9,263	4,434
30	0,8000	130,9	4,632	9,065	72	1,0950	-148,8	9,359	4,337
31	0,8100	127,3	4,692	9,004	73	1,1000	-154,0	9,447	4,250
32	0,8200	123,6	4,755	8,942	74	1,1050	-158,7	9,527	4,170
33	0,8300	119,6	4,823	8,874	75	1,1100	-163,1	9,601	4,096
34	0,8400	115,6	4,890	8,807	76	1,1150	-167,0	9,667	4,030
35	0,8500	111,6	4,958	8,739	77	1,1200	-170,1	9,719	3,977
36	0,8600	107,4	5,029	8,668	78	1,1300	-177,3	9,841	3,856
37	0,8700	103,4	5,096	8,600	79	1,1400	-182,9	9,936	3,761
38	0,8800	98,9	5,172	8,524	80	1,1500	-187,7	10,017	3,680
39	0,8900	94	5,255	8,442	81	1,1600	-192,1	10,091	3,605
40	0,9000	88,9	5,341	8,355	82	1,1700	-196,0	10,157	3,540
41	0,9100	83,5	5,433	8,264	83	1,1800	-199,3	10,213	3,484
42	0,9200	77,9	5,527	8,169	84	1,2000	-205,1	10,311	3,386

N = numeração seqüencial; V = volume de NaOH 0,1090 mol L⁻¹ adicionado (força iônica 0,10 mol L⁻¹ KNO₃); E (mV) = potencial em milivolts. Condições: CAF = 0,5000 g L⁻¹; volume inicial = 25,00 mL; força iônica = 0,10 mol L⁻¹ em KNO₃; T = 25,0±0,1°C; eletrodo de referência = Ag/AgCl – KCl 3 mol L⁻¹

Tabela 9: Segmentação e linearização dos dados de titulação potenciométrica ácido base descritos na Tabela 7 para obtenção das concentrações e pKa de cada grupo de sítios ionizáveis

PARA AF 1:

N1 = 1	N2=14			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,0000	2,588	8,7286E-03	8,6473E-03	9,3934E-01
0,0200	2,603	8,4397E-03	8,3535E-03	1,0320E+00
0,0500	2,627	7,9938E-03	7,9127E-03	1,0249E+00
0,1000	2,672	7,2101E-03	7,1780E-03	4,4730E-01
0,1500	2,723	6,4055E-03	6,4433E-03	-5,8729E-01
0,2000	2,777	5,6489E-03	5,7086E-03	-1,0469E+00
0,2500	2,840	4,8654E-03	4,9740E-03	-2,1831E+00
0,3000	2,909	4,1213E-03	4,2393E-03	-2,7834E+00
0,3500	2,989	3,3807E-03	3,5046E-03	-3,5350E+00
0,4000	3,080	2,6722E-03	2,7699E-03	-3,5271E+00
0,4500	3,188	1,9763E-03	2,0353E-03	-2,8965E+00
0,5000	3,315	1,3102E-03	1,3006E-03	7,3644E-01
0,5250	3,386	9,9114E-04	9,3326E-04	6,2011E+00
0,5500	3,465	6,6908E-04	5,6592E-04	1,8228E+01
0,5750	3,550	3,5206E-04	1,9859E-04	7,7280E+01
VAF	CAF	PKA	KHA	R
0,5885	2,9755E-03	1,83288	1,4693E-02	-0,99951881

PARA AF2:

N1 = 25	N2 = 24			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,7500	4,344	8,1673E-06	7,4219E-06	1,0043E+1
0,7600	4,398	7,5399E-06	6,9947E-06	7,7946E+00
0,7700	4,457	6,8633E-06	6,5675E-06	4,5039E+00
0,7800	4,513	6,2825E-06	6,1404E-06	2,3145E+00
0,7900	4,572	5,6971E-06	5,7132E-06	-2,8305E-1
0,8000	4,632	5,1420E-06	5,2861E-06	-2,7246E+00
0,8100	4,692	4,6296E-06	4,8589E-06	-4,7196E+00
0,8200	4,755	4,1250E-06	4,4317E-06	-6,9222E+00
0,8300	4,823	3,6155E-06	4,0046E-06	-9,7154E+00
0,8400	4,890	3,1620E-06	3,5774E-06	-1,1612E+1
0,8500	4,958	2,7414E-06	3,1503E-06	-1,2978E+1
0,8600	5,029	2,3378E-06	2,7231E-06	-1,4149E+1
0,8700	5,096	1,9949E-06	2,2960E-06	-1,3110E+1
0,8800	5,172	1,6291E-06	1,8688E-06	-1,2825E+1
0,8900	5,255	1,2605E-06	1,4416E-06	-1,2564E+1
0,9000	5,341	9,1061E-07	1,0145E-06	-1,0239E+1
0,9100	5,433	5,6333E-07	5,8732E-07	-4,0842E+00
0,9200	5,527	2,3160E-07	1,6016E-07	4,4609E+1
0,9300	5,632	-1,2284E-07	-2,6700E-07	-5,3992E+1
0,9400	5,745	-4,9196E-07	-6,9416E-07	-2,9128E+1
0,9500	5,867	-8,8390E-07	-1,1213E-06	-2,1173E+1
0,9600	5,999	-1,3050E-06	-1,5485E-06	-1,5721E+1
0,9700	6,149	-1,7791E-06	-1,9756E-06	-9,9468E+00
0,9750	6,225	-2,0145E-06	-2,1892E-06	-7,9799E+00
0,9800	6,305	-2,2565E-06	-2,4028E-06	-6,0865E+00
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0,33523	1,6949E-03	4,36941	4,2716E-05	-0,99520230

PARA AF 3:

N1 = 51	N2 = 9			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
0,9900	6,487	2,3217E-08	2,2027E-08	5,4032E+00
0,9950	6,582	1,9566E-08	1,9087E-08	2,5086E+00
1,0000	6,689	1,5868E-08	1,6148E-08	-1,7319E+00
1,0050	6,800	1,2573E-08	1,3209E-08	-4,8129E+00
1,0100	6,929	9,2444E-09	1,0269E-08	-9,9813E+00
1,0150	7,052	6,5935E-09	7,3301E-09	-1,0049E+01
1,0200	7,192	3,9378E-09	4,3907E-09	-1,0315E+01
1,0250	7,336	1,5074E-09	1,4544E-09	3,8597E+00
1,0300	7,490	-9,3888E-10	-1,4879E-09	-3,6900E+01
1,0350	7,656	-3,5712E-09	-4,4273E-09	-1,9336E+01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0,10372	5,2441E-04	6,23072E+00	5,8787E-07	-0,99653596

PARA AF 4:

N1 = 65	N2 = 9			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
1,0600	8,480	7,5743E-11	7,4410E-11	1,7908E+00
1,0650	8,633	4,4018E-11	4,5457E-11	-3,1662E+00
1,0700	8,773	1,5680E-11	1,6505E-11	-4,9994E+00
1,0750	8,906	-1,2125E-11	-1,2447E-11	-2,5859E+00
1,0800	9,035	-4,1042E-11	-4,1400E-11	-8,6424E-01
1,0850	9,153	-6,9820E-11	-7,0352E-11	-7,5658E-01
1,0900	9,263	-9,9537E-11	-9,9304E-11	2,3458E-01
1,0950	9,359	-1,2818E-10	-1,2826E-10	-5,6893E-02
1,1000	9,447	-1,5722E-10	-1,5721E-10	9,8251E-03
1,1050	9,527	-1,8627E-10	-1,8616E-10	5,8184E-02
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0,04538	2,2945E-04	8,23729	5,7905E-09	-0,99996305

PARA AF 5:

N1 = 73	N2 = 10			
Volume	pH	FG Modif	FG ajust	Desvio
1,1000	9,447	4,7847E-12	4,7995E-12	-3,0813E-01
1,1050	9,527	3,8053E-12	3,8272E-12	-5,7168E-01
1,1100	9,601	2,7984E-12	2,8549E-12	-1,9811E+00
1,1150	9,667	1,8565E-12	1,8826E-12	-1,3861E+00
1,1200	9,719	1,1983E-12	9,1035E-13	3,1636E+01
1,1300	9,841	-1,1292E-12	-1,0342E-12	9,1770E+00
1,1400	9,936	-3,0627E-12	-2,9788E-12	2,8163E+00
1,1500	10,017	-4,9271E-12	-4,9234E-12	-3,4151E-02
1,1600	10,091	-6,8835E-12	-6,8680E-12	2,2604E-01
1,1700	10,157	-8,8566E-12	-8,8126E-12	4,9991E-01
1,1800	10,213	-1,0689E-11	-1,0757E-11	-6,3211E-01
VHA	CHA	PKA	KHA	R
0,05183	2,6206E-04	9,71117	1,9446E-10	-0,99980605

N1 e N2 são estimados, onde N1 = número eu representa o primeiro ponto escolhido para efetuar a regressão linear de um dado segmento de reta, de acordo com numeração seqüencial da tabela 5; N2 = número de pontos que deve ser somado a N1, que determina o último ponto da regressão linear de um dado segmento de reta; VOLUME = volume de solução de NaOH; FG. MODIF = função de Gran modificada; FG. AJUST = função de Gran ajustada; DESVIO = diferença em % entre FG. MODIF e FG. AJUST, com relação à FG. AJUST.; AF1 a HAF5 representam 5 grupos de sítios ionizáveis, que foram possíveis de serem caracterizados neste estudo; VHA = volume de equivalência, CAF = concentração (mol.L^{-1}), PKA = pKa e KHA = Ka, para um dado grupo de sítios ionizáveis; R = coeficiente de correlação. Condições conforme a Tabela 7.

A Figura 19 mostra a curva de titulação ácido base de uma amostra de ácido fúlvico (Tabelas 8 e 9) segmentada e linearizada pelas funções de Gran modificadas.

Figura 19: Curva de titulação segmentada e linearizada utilizando funções de Gran modificadas. Condições: CAF = 0,5000 g L⁻¹; volume inicial = 25,00 mL; força iônica = 0,10 mol L⁻¹ KNO₃; T = 25,0 ± 0,1°C; eletrodo de referência = Ag/AgCl – KCl 3 mol.L⁻¹; FAHn = funções de Gran modificadas (n = 1-5, representam cada grupo de sítios ionizáveis)

A Tabela 10 apresenta as concentrações dos sítios ionizáveis determinadas para as cinco classes de grupos ionizáveis nas amostras de ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF). Os respectivos valores de pKa ajustados para os cinco grupos são apresentados na Tabela 11. Em outros trabalhos, tais como o apresentado por Masini e colaboradores [96],

foram caracterizadas seis classes de sítios ionizáveis em uma amostra comercial de ácido húmico (Aldrich) e em outra de vermicomposto. Posteriormente, Abate e Masini [97] ao estudarem uma amostra de ácido húmico de sedimento do Reservatório do Rio Tietê de Barra Bonita, determinaram seis grupos de sítios ionizáveis. De forma diferente desta dissertação, conforme mostrado na Tabela 10, destaca-se a presença de um grupo de sítios ionizáveis a menos quando comparado às referências anteriores. Esta pode ser atribuída às diferentes concentrações dos ácidos húmicos empregadas, sendo que estas eram maiores nas referências citadas [96,97], da ordem de $1,0 \text{ g L}^{-1}$.

Os grupos definidos como HA_1 , HA_2 e HA_3 (Tabelas 10 e 11) podem ser atribuídos a grupos carboxílicos em razão dos valores de pK_a serem típicos para esta classe de sítios ionizáveis. Adicionalmente, um estudo prévio [97] de comparação de metodologias para determinação de sítios ionizáveis em substâncias húmicas demonstrou que a soma de grupos com $\text{pK}_a < 7$ obtidos por titulação potenciométrica é coincidente com a concentração de grupos carboxílicos determinados pelo método clássico do acetato de cálcio [21].

Tabela 10: Concentração dos cinco grupos ionizáveis presentes nos ácidos húmico e fúlvico

Amostra	Concentração de sítios ionizáveis (mmol g^{-1}) 25,0°C; I: KNO_3 0,10 mol L^{-1}					
	HA_1	HA_2	HA_3	HA_4	HA_5	ΣHA
Ácido Húmico	$1,2 \pm 0,1$	$2,02 \pm 0,08$	$0,9 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,5$
Ácido Fúlvico	$5,8 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	12 ± 1

Tabela 11: Valores de pK_a ajustados para os grupos ionizáveis descritos na Tabela 10

Amostra	pK_a 25,0°C; I: 0,10 mol L^{-1} em KNO_3				
	HA_1	HA_2	HA_3	HA_4	HA_5
Ácido Húmico	$3,07 \pm 0,04$	$5,19 \pm 0,05$	$6,94 \pm 0,03$	$8,48 \pm 0,01$	$9,87 \pm 0,09$
Ácido Fúlvico	$1,9 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,1$

A classe de grupos definida como HA₁ apresenta um baixo valor de pKa, especialmente para o ácido fúlvico. Baseando-se nos estudos de Leenheer e colaboradores [101,102], pode-se inferir que tais grupos estão relacionados à presença de grupos policarboxílicos, ou ainda grupos carboxílicos próximos a átomos ou sítios com alta eletroafinidade (por exemplo, grupos policarboxílicos em anéis fenólicos), ou adjacentes a grupos cetônicos. A abundância dos grupos carboxílicos com baixo pKa (HA₁) corresponde a 55,2 % do total de grupos carboxílicos do ácido fúlvico e a 29,1 % para o ácido húmico. Leenheer e colaboradores [101,102] reportaram valores de 33,4 % de grupos carboxílicos com pKa < 3 em amostras de ácido fúlvico isolado do rio Suwannee (Geórgia, EUA).

Os sítios da classe HA₂ foram titulados em uma região de pH típica para a maior parte dos ácidos carboxílicos, correspondendo a 30,4 e 49,0 % dos grupos carboxílicos presentes no ácido fúlvico e húmico, respectivamente.

É interessante notar que, apesar do método de tratamento de dados não adotar o modelo eletrostático, o efeito destas interações se faz notar especialmente no pKa do grupo HA₃. Na região de pH em que são tituladas, parte substancial dos grupos carboxílicos já se encontra dissociada, contribuindo com cargas negativas para a macromolécula, o que dificulta a dissociação dos grupos carboxílicos que permanecem protonados, acarretando um aumento nos seus valores de pKa.

As classes HA₄ e HA₅ podem ser atribuídas a grupos fenólicos e aminos. A distinção entre estes grupos não é possível com o método de titulação (e tratamento de dados) empregado, devido a grande proximidade dos valores de pKa destas espécies [100]. O total de sítios ionizáveis determinados no ácido húmico e no ácido fúlvico foi de $5,2 \pm 0,5$ e $11,5 \pm 1,1$ mmol g⁻¹, respectivamente. A contribuição de grupos carboxílicos e de fenólicos ou aminos em relação ao total de sítios ionizáveis é dada na Tabela 12, na qual se pode observar uma grande predominância de grupos carboxílicos, especialmente para o ácido fúlvico.

Tabela 12: Percentagens dos grupos carboxílicos, fenólicos e aminos encontradas nas SH's analisadas

Amostra	% de grupos existentes	
	carboxílicos	fenólicos e aminos
Ácido Húmico	78,9	21,1
Ácido Fúlvico	91,3	8,7

Tabela 13: Faixa de concentração (em mmol g⁻¹) de grupos ácidos em ácidos húmicos e fúlvicos isolados de solos tropicais (Adaptado de Stevenson)

Grupo Funcional	Ácido Húmico	Ácido Fúlvico
Acidez Total	6,2-7,5	6,4-12,3
COOH	3,8-4,5	7,2-11,2
OH fenólico	2,2-3,0	0,3-2,5

A concentração de grupos carboxílicos obtida tanto para HA como para AF mostrou-se de acordo com o apontado na literatura (Tabela 13), com o mesmo ocorrendo para as hidroxilas fenólicas do AF, exceto para estas últimas no HA.

5.3 Complexação de Cu(II) por AF e AH:

Inicialmente estudaram-se as características de resposta do eletrodo íon-seletivo para Cu(II) nos diferentes valores de pH nos quais os estudos de complexação seriam realizados. A Figura 20 mostra as curvas analíticas obtidas em meio iônico de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ em pH 4,00; 5,00 e 6,00 na faixa de concentrações de Cu(II) entre 1,80 x 10⁻⁶ e 1,70 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Figura 20: Resposta do eletrodo íon-seletivo a Cu(II) em meio não complexante de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹, 25,0±0,1^oC, em diferentes condições de pH

A Tabela 14 apresenta os valores dos coeficientes angulares e lineares acompanhados de seus respectivos desvios padrões para as curvas analíticas mostradas na Figura 17. Vale lembrar que o coeficiente angular refere-se ao termo S da equação 15, enquanto o coeficiente linear corresponde ao termo A da mesma equação. Pode-se notar que nas três condições utilizadas o coeficiente angular das curvas analíticas é próximo ao valor teórico de 29,6 mV L mol⁻¹, previsto pela equação de Nernst a 25^oC para um cátion divalente. Com isso, pôde-se verificar que o eletrodo utilizado apresenta resposta nernstiana à atividade de íons Cu(II) em solução. Assim, assumiu-se que a contribuição da hidrólise do Cu(II) seria desprezível para efeito dos cálculos, valendo portanto a equação 15.

Tabela 14: Parâmetros de resposta do eletrodo íon-seletivo para Cu(II), onde A é a inclinação da curva analítica, S é o coeficiente linear e R o coeficiente de correlação considerando a faixa de trabalho entre $1,80 \times 10^{-6}$ e $1,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

Parâmetro	pH		
	4,00	5,00	6,00
A / mV	$322,3 \pm 0,6$	$317,3 \pm 0,6$	323 ± 1
S / mV L mol ⁻¹	$28,1 \pm 0,1$	$26,9 \pm 0,1$	$28,2 \pm 0,2$
R	0,9998	0,9998	0,9994

As curvas de analíticas obtidas em meio não complexante sobrepostas às curvas de titulação de ácidos húmico e fúlvico são mostradas nas Figuras 21, 22 e 23. Em uma primeira avaliação qualitativa destas figuras pode-se já verificar que as interações de íons Cu(II) com ácido húmico são mais intensas do que observado para o ácido fúlvico. Esta inferência é baseada na maior diferença de potencial, para uma mesma concentração total de Cu(II), verificado nos experimentos na presença de ácido húmico em relação às curvas de titulação obtidas em meio não complexante.

As curvas de titulação dos ácidos húmico e fúlvico apresentaram maior diferença de potencial da curva em meio não complexante em pH 6,0 (Figura 23), denotando também maior intensidade das interações neste pH, o que é uma consequência da menor competição de prótons com os íons Cu(II) pelos sítios de ligação. Em pH 4,0 a complexação de Cu(II) por ácido fúlvico foi muito pouco pronunciada, sendo que as curvas em meio complexante e não complexante foram praticamente indistinguíveis para valores de $\log [\text{Cu(II)}]_t > -5,5$ (Figura 22). Para concentrações menores, começa a aparecer a diferenciação entre as duas curvas, denotando que em condições de baixo grau de ocupação de sítios ocorre a complexação de Cu(II) por ácido fúlvico mesmo em pH 4,0. Entretanto, devido ao pequeno número de dados experimentais obtidos nestas condições, uma caracterização quantitativa da complexação de Cu(II) por ácido fúlvico em pH 4,0 não foi possível.

Figura 21: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meios complexantes e não complexante, em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,00 \pm 0,05$, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Os meios complexantes são constituídos por suspensão $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido húmico ou solução $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido fúlvico

Figura 22: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meios complexantes e não complexante, em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 5,00 \pm 0,05$, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Os meios complexantes são constituídos por suspensão $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido húmico ou solução $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido fúlvico

Figura 23: Resposta do eletrodo seletivo de cobre em meios complexantes e não complexante, em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,00 \pm 0,05$, a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Os meios complexantes são constituídos por suspensão $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido húmico ou de solução $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido fúlvico

Colocando-se em gráfico as concentrações em equilíbrio de cobre complexado (CuL) em função da concentração em equilíbrio de cobre livre, verifica-se a obtenção de curvas que seguem o perfil das isothermas de Langmuir, conforme mostrado nas Figuras 23 e 24. De acordo com a equação 22, o termo b da equação de Langmuir é a capacidade máxima de adsorção/complexação, a qual pode ser estimada graficamente a partir das concentrações máximas de CuL que são atingidas assintoticamente à medida que se aumenta a concentração total de íons Cu(II) . Para o ácido húmico, as concentrações máximas de CuL podem ser estimadas como $9,50$, $23,4$ e $32,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{pH } 4,0$, $5,0$ e $6,0$, respectivamente. Para o ácido fúlvico as concentrações máximas de CuL são $14,9$ e $31,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em $\text{pH } 5,0$ e $6,0$, respectivamente. A diminuição sistemática da concentração máxima de CuL com a diminuição do pH deve ser atribuída à competição de prótons pelos sítios de complexação.

Para a obtenção das constantes de estabilidade médias e das capacidades de complexação, estudou-se a possibilidade de aplicação do método de regressão não linear com a equação de Langmuir, utilizando-se o programa Origin 6.0, considerando-se a existência de uma única classe de sítios de complexação. Entretanto, não se obteve um bom

ajuste numérico entre os dados experimentais e os calculados. O mesmo se observou com a utilização da equação de Langmuir linearizada para uma única classe de sítios. Em razão destas dificuldades optou-se pela utilização do método de Scatchard, que, conforme discutido no item 4.1.2.2, considera a ocorrência de uma ou mais classes de sítios de complexação.

A Tabela 15 mostra um típico conjunto de dados usados na construção do gráfico de Scatchard. A Figura 25 mostra os gráficos de Scatchard para as titulações de ácido húmico. Neste último, notam-se duas regiões que possibilitam a passagem de duas retas com inclinações bem distintas e pronunciadas, sendo que a de maior inclinação é atribuída como uma região de sítios com forte interação e a outra, aos sítios de fraca interação. Os coeficientes angulares das porções lineares fornecem as constantes de estabilidade condicionais médias. Dividindo-se o coeficiente linear pelo angular calcula-se a concentração de ligantes (em mol L⁻¹) correspondentes à região de forte interação (reta de maior inclinação) e à concentração total de ligantes (reta de menor inclinação). Ao se dividir este valor calculado pela concentração do material húmico estudado, encontra-se a capacidade complexante do mesmo em mol g⁻¹, respectivamente da região de forte interação e a total .

Figura 24: Relações existentes entre as concentrações de CuL e Cu(II) total obtidas no decorrer das titulações de suspensões 30 mg L⁻¹ de ácido húmico em meio iônico KNO₃ 0,1 mol L⁻¹, temperatura 25,0±0,1°C em intervalos de pH 4,00±0,05, 5,00±0,05 e 6,00±0,05

Figura 25: Relações existentes entre as concentrações de CuL e Cu(II) total obtidas no decorrer das titulações de soluções 30 mg L⁻¹ de ácido fúlvico em meio iônico KNO₃ 0,1 mol L⁻¹, temperatura 25,0±0,1°C, intervalos de pH 5,00±0,05 e 6,00±0,05

Tabela 15: Dados experimentais e calculados para uma típica titulação da suspensão de ácido húmico 30 mg L⁻¹ em KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ e pH 6,00±0,05, a 25,0±0,1°C

ponto	[Cu(II)] total x 10 ⁶ / mol L ⁻¹	[Cu(II)] / mol L ⁻¹	[CuL] / mol L ⁻¹	[CuL]/[Cu(II)]
1	4,06	5,24 10 ⁻⁰⁹	4,06 10 ⁻⁰⁶	774,05
2	4,95	7,82 10 ⁻⁰⁹	4,95 10 ⁻⁰⁶	632,77
3	6,71	1,44 10 ⁻⁰⁸	6,70 10 ⁻⁰⁶	466,59
4	7,60	2,47 10 ⁻⁰⁸	7,58 10 ⁻⁰⁶	307,07
5	8,47	3,06 10 ⁻⁰⁸	8,44 10 ⁻⁰⁶	275,55
6	9,36	5,40 10 ⁻⁰⁸	9,31 10 ⁻⁰⁶	172,35
7	10,24	7,29 10 ⁻⁰⁸	1,02 10 ⁻⁰⁵	139,45
8	11,17	9,76 10 ⁻⁰⁸	1,10 10 ⁻⁰⁵	112,89
9	12,8	2,15 10 ⁻⁰⁷	1,26 10 ⁻⁰⁵	58,71
10	14,6	2,91 10 ⁻⁰⁷	1,43 10 ⁻⁰⁵	49,16
11	16,3	3,58 10 ⁻⁰⁷	1,59 10 ⁻⁰⁵	44,51
12	18,0	5,43 10 ⁻⁰⁷	1,75 10 ⁻⁰⁵	32,17
13	21,4	9,64 10 ⁻⁰⁷	2,04 10 ⁻⁰⁵	21,20
14	23,1	1,49 10 ⁻⁰⁶	2,16 10 ⁻⁰⁵	14,55
15	26,5	2,35 10 ⁻⁰⁶	2,41 10 ⁻⁰⁵	10,27
16	29,9	3,66 10 ⁻⁰⁶	2,62 10 ⁻⁰⁵	7,16
17	33,2	4,85 10 ⁻⁰⁶	2,83 10 ⁻⁰⁵	5,84
18	36,5	6,66 10 ⁻⁰⁶	2,99 10 ⁻⁰⁵	4,48
19	40,6	8,20 10 ⁻⁰⁶	3,24 10 ⁻⁰⁵	3,95
20	44,6	1,11 10 ⁻⁰⁵	3,35 10 ⁻⁰⁵	3,03

Figura 26: Gráficos de Scatchard obtidos em pH 4,0 (A), 5,0 (B) e 6,0 (C) para titulações de suspensões 30 mg L^{-1} de ácido húmico com solução de $\text{Cu(II)} \text{ } 4,72 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio $\text{KNO}_3 \text{ } 0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$

De maneira similar foram construídos os gráficos de Scatchard para as titulações de ácido fúlvico, conforme mostra a Figura 26. Os valores calculados para as constantes de estabilidade condicionais médias e para as capacidades de complexação são apresentadas na Tabela 16.

Figura 27: Gráficos de Scatchard obtidos em pH 5,0 (A) e 6,0 (B) para titulações de soluções 30 mg L^{-1} de ácido fúlvico com solução de $\text{Cu(II)} \text{ } 4,72 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio $\text{KNO}_3 \text{ } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$

Tabela 16: Resultados referentes aos logaritmos das constantes de estabilidade médias e capacidades de complexação nos pH 4, 5 e 6 em KNO₃ 0,10 mol L⁻¹, 25,0±0,1°C para a suspensão 30 mg L⁻¹ de ácido húmico e a solução 30 mg L⁻¹ de ácido fúlvico

Substância	pH	log K ₁ / L mol ⁻¹	Cc ₁ x 10 ⁴ / mol g ⁻¹	log K ₂ / L mol ⁻¹	Cc _T x 10 ⁴ / mol g ⁻¹
Húmica					
Ácidos Húmicos	4,0	-	-	5,55±0,07	2,29±0,06
Ácidos Fúlvicos		-	-	-	-
Ácidos Húmicos	5,0	6,5±0,2	4,0±0,7	5,7±0,1	8,1±0,7
Ácidos Fúlvicos		6,45±0,08	1,5±0,3	5,8±0,2	4±1
Ácidos Húmicos	6,0	7,5±0,2	3,7±0,2	5,6±0,1	11,6±0,8
Ácidos Fúlvicos		6,4±0,3	7,0±0,3	4,8±0,1	11±1

logK₁ = logaritmo da constante de sítios de forte interação; logK₂ = logaritmo da constante de sítios de fraca interação; Cc₁ = capacidade de complexação de sítios de forte interação; Cc_T = capacidade de complexação total da substância húmica. Os resultados correspondem à média de pelo menos 3 titulações

Pode-se notar a partir de uma observação cuidadosa das Figuras relativas aos gráficos de Scatchard que, apesar da mudança de inclinação ser bastante significativa, com exceção da titulação de ácido húmico em pH 4,0, a escolha de regiões lineares não é simples, incorporando um importante grau de subjetividade na escolha dos pontos, o que pode refletir em considerável variação dos parâmetros de complexação calculados. Visando contornar esta dificuldade realizou-se o tratamento de dados por regressão não linear usando-se o programa Origin 6.0, ao qual foi incorporada a equação de Langmuir com dois sítios de adsorção distintos, conforme equação 27 mostrada no item 4.1.1.2. Em pH 4,0, tanto para o ácido húmico, como para o ácido fúlvico, a equação de Langmuir com um único sítio de adsorção foi a mais apropriada para representar os dados experimentais, o que foi avaliado pelo maior coeficiente de correlação entre os dados experimentais e a curva ajustada por regressão não linear. Para todos os outros casos a equação considerando dois sítios de adsorção/complexação foi o mais apropriado, em concordância com o tratamento de dados realizados pelo método de Scatchard. Os dados experimentais sobrepostos às curvas ajustadas por regressão linear são mostrados nas Figura 27 e 28 para o ácido húmico e fúlvico, respectivamente. Como neste caso todos os dados experimentais

são usados no cálculo, elimina-se a subjetividade da escolha de pontos para compor uma região linear. A Tabela 17 apresenta os valores de capacidade de complexação e logaritmo da constante de estabilidade condicional média ajustadas por regressão não linear para as substâncias húmicas estudadas.

Figura 28: Isotermas de adsorção de Cu(II) em ácido húmico em diferentes valores de pH, em KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ e a 25,0^oC. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas representam as curvas ajustadas por regressão não linear considerando um sítio (pH 4,0) e dois sítios (pH 5,0 e 6,0) de adsorção. Em todos os casos o coeficiente de correlação (r^2) foi maior que 0,98

Figura 29: Isotermas de adsorção de Cu(II) em ácido fúlvico em diferentes valores de pH, em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e a $25,0^\circ\text{C}$. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas representam as curvas ajustadas por regressão não linear considerando um sítio (pH 4,0) e dois sítios (pH 5,0 e 6,0) de adsorção. Os coeficientes de correlação (r^2) foram maiores que 0,99 para pH 5,0 e 6,0 e maiores do que 0,94 para pH 4,0

Tabela 17: Resultados referentes aos logaritmos das constantes de estabilidade médias e capacidades de complexação nos pH 4, 5 e 6 em KNO₃ 0,10 mol L⁻¹, 25,0±0,1°C para a suspensão 30 mg L⁻¹ de ácido húmico e a solução 30 mg L⁻¹ de ácido fúlvico, obtidos por regressão não linear usando o programa Origin 6.0

Material	Parâmetro de Complexação	pH		
		4,0	5,0	6,0
Ácido Húmico	C _{C1} x 10 ⁴ / mol g ⁻¹	-	3,5 ± 0,5	4,4 ± 0,4
	Log K ₁	-	6,6 ± 0,1	7,5 ± 0,1
	C _{C2} x 10 ⁴ / mol g ⁻¹	3,3 ± 0,1	5,3 ± 0,9	8,4 ± 0,9
	Log K ₂	5,7 ± 0,2	5,1 ± 0,1	5,31 ± 0,09
	C _{CT} x 10 ⁴ / mol g ⁻¹	3,3 ± 0,1	8,6 ± 0,6	12 ± 1
Ácido Fúlvico	C _{C1} x 10 ⁴ / mol g ⁻¹	-	0,90 ± 0,03	2,7 ± 0,4
	Log K ₁	-	6,6 ± 0,1	6,2 ± 0,1
	C _{C2} x 10 ⁴ / mol g ⁻¹	0,6 ± 0,2	2,7 ± 0,3	8 ± 2
	Log K ₂	5,1 ± 0,2	5,2 ± 0,2	4,6 ± 0,4
	C _{CT} x 10 ⁴ / mol g ⁻¹	0,6 ± 0,2	3,6 ± 0,4	11 ± 2

logK₁ = logaritmo da constante de sítios de forte interação; logK₂ = logaritmo da constante de sítios de fraca interação; Cc₁ = capacidade de complexação de sítios de forte interação; Cc_T = capacidade de complexação total da substância húmica. Os resultados correspondem à média de pelo menos 3 titulações

Comparando-se os resultados apresentados nas Tabelas 16 e 17, verifica-se que, apesar da subjetividade da escolha de pontos inerente ao método de Scatchard, os valores de capacidade de complexação e constantes de estabilidade condicionais não são significativamente distintos dos valores obtidos por regressão não linear. A única exceção refere-se às titulações de ácido fúlvico em pH 4,0, que puderam ser tratadas pelo método de regressão não linear, ao contrário do método de Scatchard. Com isso, a discussão a seguir pode ser baseada nos resultados obtidos tanto por uma, como por outra metodologia de cálculo.

Nota-se que, para o ácido húmico em pH 4,00, foi possível a caracterização de apenas uma classe de sítios de complexação, cujo fato pode ser atribuído a uma maior competição dos prótons com os íons Cu(II) pelos sítios complexantes do material húmico nas condições realizadas do estudo. Conclui-se que os íons Cu(II) não conseguem deslocar os prótons que ocupam os sítios de complexação. Ainda neste mesmo pH, com o ácido fúlvico não foi obtido um comportamento adequado para a aplicação do método de Scatchard. Esta ocorrência pode ser atribuída ao fato do ácido fúlvico não formar complexos com Cu(II) em uma concentração mínima detectável pelo método analítico empregado. Ressalta-se ainda que, de acordo com Hutzinger [103], tais complexos são praticamente destruídos em pH abaixo de 4,00. Apesar destas limitações, o método de cálculo baseado em regressão não linear permitiu que fossem estimados os valores de capacidade de complexação e log K, que em comparação com o ácido húmico nas mesmas condições, revelaram uma capacidade de complexação muito menor para o ácido fúlvico (Tabela 17). Já os valores de log K ajustados em pH 4,0 não apresentaram diferenças muito significativas, apesar do log K para o ácido húmico ($5,7 \pm 0,2$) ter sido ligeiramente superior ao do ácido fúlvico ($5,1 \pm 0,2$).

Em pH 5,00 o ácido húmico possui uma maior capacidade complexante total que o fúlvico e ambos apresentam valores de constantes de estabilidade praticamente iguais para sítios de forte interação, o mesmo ocorrendo com os de fraca interação, levando-nos a concluir que as forças de interação do metal com ambos complexantes são muito próximas.

Já em pH 6,00 a capacidade complexante total de ambos materiais húmicos praticamente se equivalem, porém as constantes de estabilidade médias com ácido húmico são significativamente maiores, denotando maior força de ligação. Observou-se ainda em pH 6,0 que as quantidades de prótons liberadas nas titulações de ambos materiais são muito próximas: $(5,7 \pm 0,4) \times 10^{-5}$ mol de H^+ g⁻¹ para o ácido fúlvico e $(5,4 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ mol de H^+ g⁻¹ para o ácido húmico.

Assumindo-se a formação de complexos bidentados em que dois sítios carboxílicos são utilizados para complexar um íon Cu(II), tem-se que a partir da concentração total de sítios carboxílicos (Tabela 10), 10,4 - 11,9, 36,8 - 42,2 e 54,5 - 62,5% destes sítios são utilizados para a complexação de íons Cu(II) em pH 4,0, 5,0 e 6,0, respectivamente. Para o ácido fúlvico estas porcentagens são 7,0 - 8,3 % em pH 5,0 e 19,3 - 22,9% em pH 6,0.

Town e Powell [104] obtiveram porcentagens de 15 – 18% em pH 5,0 e 28 – 33% em pH 6,3 para uma amostra de ácido fúlvico isolada de turfa e porcentagens de 21-27 % (pH 5,0) e 57 – 67% (pH 6,3) para amostra de ácido húmico isolado de um solo de referência. Os resultados obtidos nesta dissertação estão em razoável concordância com os resultados de Town e Powell [105], especialmente para o ácido húmicos, considerando-se as diferenças dos materiais de origem.

Em comparação com o ácido húmico, o ácido fúlvico apresenta uma menor proporção de grupos carboxílicos envolvidos na complexação de íons Cu(II), o que é consistente com uma estrutura caracterizada por grupos carboxílicos isolados, sem possibilidade de formação de quelatos, ou ainda grupos que estereoquimicamente inacessíveis [104]. A proporção de sítios carboxílicos do ácido húmico envolvidos na complexação é significativamente maior, o que por sua vez é consistente com uma configuração favorável para complexação de íons Cu(II).

Brown e colaboradores [105] estudaram a complexação de Cu(II) por ácido fúlvico em pH 6,0, realizando uma comparação das constantes de estabilidade condicionais obtidas com aquelas determinadas para compostos policarboxílicos modelos, tais como os ácidos pentanodóico, carbalílico (ácido propano 1,2,3-tricarboxílico), diglicólico, ciclopentano 1,2,3,4-tetracarboxílico e tetraidrofurano 2,3,4,5-tetracarboxílico. Para os ácidos carbalílico e ciclopentano 1,2,3,4-tetracarboxílico as constantes de estabilidade determinadas a 25⁰C e em força iônica 0,0010 foram entre 4,26 e 4,31, respectivamente, enquanto para o ácido pentanodóico em força iônica zero a constante reportada na literatura é 3,16 [106]. Estes dados sugerem que os sítios de fraca interação com Cu(II) podem ser governados pela presença de ácidos policarboxílicos, em concordância com os resultados obtidos na presente dissertação. Para os ácidos ciclopentano 1,2,3,4-tetracarboxílico e tetraidrofurano 2,3,4,5-tetracarboxílico, as constantes de estabilidade determinadas foram 4,75 e 7,40, respectivamente, indicando que sítios com alta carga negativa e ligação do tipo éter podem ser responsáveis para explicar as constantes de estabilidade condicionais dos sítios de forte interação.

Por outro lado, deve-se considerar ainda que as substâncias húmicas contêm grupos carboxílicos fenólicos, nos quais a complexação com formação de quelatos se dá através dos oxigênios do grupamento carboxílico e da hidroxila fenólica ligados ao anel benzênico.

Borges e colaboradores [107] estudaram a complexação de Cu(II) por ácidos fenólicos como modelos discretos de ácidos húmicos. Os ácidos estudados foram: ácido 3,4-dihidroxicinâmico, ácido 3,4 dihidroxifenilacético e ácido 3,4 dihidroxibenzóico. As constantes de estabilidade obtidas por estes autores foram bastante similares para os três compostos, estando entre 12,25 e 13,12 para a espécie CuL e entre 21,20 e 21,84 para a espécie CuL₂, valores estes bem maiores do que os encontrados na presente dissertação, assim como em comparação a outros estudos com substâncias húmicas. Além disso, Borges e colaboradores [107] não verificaram dependência das constantes com diferentes razões metal-ligante utilizadas, fato este que não é observado para substâncias húmicas e exemplifica a limitação de utilização de complexantes modelo, com estruturas relativamente simples, para simular substâncias húmicas.

Finalmente, deve-se considerar ainda a participação de sítios de complexação contendo N, uma vez que este elemento foi determinado em concentrações apreciáveis na análise elementar, especialmente para o ácido húmico (Tabela 4). Tais grupos nitrogenados provavelmente comporiam a composição dos sítios de forte interação tanto no ácido húmico, como no ácido fúlvico.

Plaza e colaboradores [108] determinaram a concentração de sítios ionizáveis, a capacidade complexante em pH 6,0 e a constante de estabilidade condicional dos complexos com Cu(II) de ácidos húmicos extraídos de solos de diferentes regiões da União Européia por espectroscopia de luminescência total, sendo que as amostras eram originárias das seguintes regiões e o suas respectivas finalidades: Sicília (Itália) – gramado, Peloponeso (Grécia) árvores de folha-larga, País de Gales (Grã-Bretanha) – gramado para pasto, Normandia (França) - terra para o plantio de trigo e Schleswig-Holstein (Alemanha) – floresta de coníferas. As concentrações de sítios ionizáveis determinadas variaram de $(5,3 \pm 0,1) \text{ mmol g}^{-1}$ – França a $(9,3 \pm 0,3) \text{ mmol g}^{-1}$ – Alemanha e as capacidades complexantes com o Cu(II) estão contidas nos intervalos de $(1,8 \pm 0,1) \text{ mmol g}^{-1}$ - Grã-Bretanha a $(3,7 \pm 0,3) \text{ mmol g}^{-1}$ – Itália. Os logaritmos das constantes de estabilidade variaram em intervalos de $(5,14 \pm 0,04)$ – Itália a $(5,36 \pm 0,04)$ – França. Este método de estudo considera que a ligação dos íons Cu(II) ocorre na proporção metal/ligante 1:1. É interessante notar que a concentração média de sítios ionizáveis para o HA obtida e apresentada nesta dissertação, comparada ao trabalho de Plaza e colaboradores [108], tem $0,08 \text{ mmol g}^{-1}$ de grupos de

sítios a menos que o menor valor médio encontrado por estes autores. Ainda, verifica-se que o vermicomposto analisado apresentou um valor médio de capacidade complexante cerca de $0,6 \text{ mmol g}^{-1}$ inferior ao médio apontado por Plaza e colaboradores [108]. Entretanto, a constante de estabilidade média é aproximadamente 126 vezes maior que a média apresentada por Plaza e colaboradores [108], o que demonstra haver a formação de um complexo mais forte com o HA do vermicomposto.

Ainda, Plaza e colaboradores [108] ao analisarem amostras de solo da Alemanha verificaram que estas eram as com maiores concentrações de grupos carboxílicos e de hidroxilas fenólicas, entretanto as mesmas não possuíam as maiores capacidades complexantes. Estes resultados nos sugerem que não é apenas a quantidade total de grupos funcionais ácidos que afetam a capacidade complexante total dos HA's, mas sim a estrutura química geral e/ou os efeitos de impedimento estérico que têm uma forte influência também. As amostras que apresentaram os maiores valores dos logaritmos das constantes dos complexos formados são as de maior teor em nitrogênio. Plaza e colaboradores [108] atribuíram ao fato dos íons cobre se ligarem mais fortemente a grupos doadores de par de elétrons, tais como aqueles contendo N nas substâncias húmicas. Tais conclusões estão de acordo com os resultados obtidos na presente dissertação comparando-se a fração húmica e fúlvica da matéria orgânica de vermicomposto.

5.4 Obtenção de K_{DEF} :

A partir dos dados obtidos nas titulações potenciométricas, cujo procedimento foi descrito em 4.1.1, construiu-se Tabela 18 para as suspensões de ácido húmico e as soluções de ácido fúlvico, permitindo a obtenção do valor de K_{DEF} para cada ponto de titulação (grau de ocupação).

Tabela 18: Conjunto de dados experimentais e de resultados de cálculo para a determinação de K_{DEF} em função do grau de ocupação dos sítios de complexação de uma suspensão de ácido húmico 30 mg L⁻¹ em meio de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ em pH 6,00 ± 0,05 e 25,0 ± 0,1 °C

Ponto Experimental	$C_{Cu(II)} 10^6 / \text{mol L}^{-1}$	$\ln C_{Cu(II)}$	$[Cu(II)] / \text{mol L}^{-1}$	α	$\ln \alpha$	$\frac{d \ln C_{Cu(II)}}{d \ln \alpha}$	$\log K_{DEF}$	$\log \theta$
1	1,39	-13,49	1,82 10 ⁻⁹	763,41	6,64	-1,06	8,72	-2,05
2	2,29	-12,99	2,46 10 ⁻⁹	931,59	6,84	-1,16	8,55	-1,84
3	3,18	-12,66	3,79 10 ⁻⁹	840,84	6,73	-1,10	8,38	-1,69
4	4,08	-12,41	6,84 10 ⁻⁹	596,16	6,39	-0,94	8,19	-1,59
5	4,97	-12,21	1,1210 ⁻⁸	444,47	6,10	-0,81	8,04	-1,50
6	5,85	-12,05	2,35 10 ⁻⁸	249,25	5,52	-0,60	7,85	-1,43
7	6,74	-11,91	3,30 10 ⁻⁸	203,98	5,32	-0,54	7,75	-1,37
8	7,62	-11,78	3,8710 ⁻⁸	196,98	5,28	-0,53	7,69	-1,31
9	8,50	-11,67	6,76 10 ⁻⁸	125,78	4,83	-0,43	7,54	-1,27
10	9,39	-11,58	9,05 10 ⁻⁸	103,69	4,64	-0,39	7,45	-1,23
11	10,3	-11,49	1,06 10 ⁻⁷	96,71	4,57	-0,38	7,40	-1,19
12	11,1	-11,41	1,75 10 ⁻⁷	63,68	4,15	-0,33	7,24	-1,16
13	12,9	-11,26	2,28 10 ⁻⁷	56,33	4,03	-0,32	7,13	-1,09
14	14,6	-11,13	4,7110 ⁻⁷	31,03	3,43	-0,32	6,83	-1,04
15	16,3	-11,02	6,10 10 ⁻⁷	26,78	3,29	-0,32	6,70	-1,00
16	18,1	-10,92	9,41 10 ⁻⁷	19,21	2,96	-0,35	6,48	-0,96
17	19,8	-10,83	1,28 10 ⁻⁶	15,45	2,74	-0,38	6,31	-0,93
18	23,2	-10,67	2,08 10 ⁻⁶	11,17	2,41	-0,45	6,03	-0,87
19	26,6	-10,54	3,31 10 ⁻⁶	8,03	2,08	-0,52	5,76	-0,83
20	28,2	-10,48	4,50 10 ⁻⁶	6,26	1,83	-0,60	5,57	-0,82
21	31,5	-10,36	5,93 10 ⁻⁶	5,32	1,67	-0,65	5,41	-0,79
22	34,8	-10,26	7,74 10 ⁻⁶	4,50	1,50	-0,71	5,26	-0,76
23	39,0	-10,15	1,04 10 ⁻⁵	3,76	1,33	-0,78	5,09	-0,74
24	43,1	-10,05	1,2910 ⁻⁵	3,35	1,21	-0,82	4,97	-0,71
25	47,1	-9,96	1,60 10 ⁻⁵	2,95	1,08	-0,88	4,85	-0,49
26	51,1	-9,88	1,92 10 ⁻⁵	2,67	0,98	-0,92	4,75	-0,48
27	55,1	-9,81	2,21 10 ⁻⁵	2,49	0,91	-0,95	4,68	-0,47
28	59,1	-9,74	2,51 10 ⁻⁵	2,36	0,86	-0,98	4,61	-0,45
29	63,1	-9,67	2,89 10 ⁻⁵	2,19	0,78	-1,02	4,53	-0,45

A partir de dados como exemplificados pela Tabela 18 pode-se construir um gráfico de $\log K_{\text{DEF}}$ em função de $\log \theta$, mostrados na Figura 29.

Figura 30: Gráficos de $\log K_{\text{DEF}}$ em função do $\log \theta$ obtidos para suspensões 30 mg L^{-1} de ácido húmico (A) e soluções 30 mg L^{-1} de ácido fúlvico (B) com solução de Cu(II) $4,72 \text{ mmol L}^{-1}$ ambas em meio KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$

Nota-se na Figura 29 que com o aumento do $\log \theta$, ou seja com o aumento do grau de ocupação de Cu(II) nos sítios de complexação, os valores de K_{DEF} diminuem sistematicamente. Este fato pode ser explicado pela ocorrência da ocupação de Cu(II) primeiramente dos sítios ligantes de maior afinidade por esta espécie.

Ainda, percebe-se que, nos três pH's estudados, o ácido húmico possui os maiores valores de $\log K_{\text{DEF}}$ com o decorrer do aumento do grau de ocupação de Cu(II) dos sítios ligantes, demonstrando então que é um formador de complexos mais fortes que o ácido fúlvico na faixa da concentração de Cu(II) utilizada.

Os parâmetros de heterogeneidade assim como os logaritmos de K°_{DEF} obtidos para os materiais húmicos são representados na Tabela 19 e nesta pode-se notar que os valores médios variaram predominantemente dentro do intervalo de 0 a 1 (com exceção da titulação de ácido húmico em pH 4,0). Esta faixa de variação é típica para ligantes de ocorrência natural. De acordo com Vasconcelos e colaboradores [109], para valores de $\log \theta < 1,5$ efeitos eletrostáticos e estéricos são bastante reduzidos devido ao baixo grau de ocupação dos sítios de complexação. Nestas condições, o ácido húmico apresentou maior homogeneidade nos sítios de complexação do que o ácido fúlvico ($|\Gamma|$ mais próximo a 1).

Tabela 19: Parâmetros de heterogeneidade e $\log K^{\circ}_{\text{DEF}}$ obtidos para suspensões de ácido húmico e soluções de ácido fúlvico, ambas em concentração 30 mg L⁻¹, a 25,0±0,1°C e força iônica KNO₃ 0,1 mol L⁻¹

Substância húmica	pH	$ \Gamma $	Log K°_{DEF}
Ácido Húmico	4,0	1,25±0,06	4,3±0,6
	5,0	0,97±0,07	4,7±0,6
	6,0	0,74±0,09	6,2±0,3
Ácido Fúlvico	5,0	0,54±0,08	2,3±0,1
	6,0	0,59±0,07	3,2±0,3

6.0 CONCLUSÕES:

Os ácidos húmico e fúlvico foram isolados da amostra do vermicomposto e caracterizados quanto à composição elementar e teor de cinzas. A caracterização elementar demonstrou que as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio estão de acordo com o que a literatura aponta para outras substâncias [21]. O teor de cinzas retido pelo ácido húmico pode ser considerado baixo, comprovando assim a eficiência do método de extração e isolamento empregado neste trabalho.

A partir do modelo de distribuição de sítios discretos foi determinado que o ácido fúlvico tem um teor maior de grupos carboxílicos que o ácido húmico. Ambas as substâncias húmicas apresentaram as mesmas concentrações de sítios aminos e fenólicos. Esta constatação está de acordo com Stevenson [21]. A concentração de hidroxilas fenólicas obtidas para o ácido húmico mostrou-se abaixo dos valores médios apresentados na literatura.

Utilizando-se o método de Scatchard verificou-se que só foi possível a obtenção de um sítio complexante em pH 4,0 para o ácido húmico e que para o ácido fúlvico não se detectou a ocorrência de complexação. Em pH 5,0 os sítios de forte e fraca interações apresentaram praticamente as mesmas forças de ligação para os complexos com Cu(II) em ácido húmico e ácido fúlvico. Já em pH 6,0 o ácido húmico mostrou possuir sítios complexantes de interações com Cu(II) mais fortes que os do ácido fúlvico. Ainda, o HA possui uma capacidade complexante maior que o AF nos pH's estudados, exceto em pH 6,0 onde ambas praticamente se equivalem. Paralelamente, as constantes de estabilidade e as capacidades complexantes foram obtidas, com a equação de Langmuir, e os resultados se assemelharam muito com os apresentados pelo método de Scatchard, com a vantagem de se identificar a complexação de Cu(II) com o ácido fúlvico em pH 4,0.

A distribuição das constantes de estabilidade em função do grau de ocupação dos sítios revelou que, para a faixa de concentrações de íons Cu(II) estudada, as constantes de estabilidade observadas para o ácido húmico são sistematicamente maiores do que aquelas observadas para o ácido fúlvico, em qualquer dos pH's estudados.

O conjunto de resultados aqui obtidos confirma a hipótese de que a conformação espacial dos sítios ionizáveis exerce um papel mais importante do que sua concentração na estabilidade dos complexos e na capacidade de complexação das substâncias húmicas.

Apesar da concentração dos sítios ionizáveis do ácido fúlvico ser maior do que o dobro da concentração no ácido húmico, a estabilidade dos complexos e a capacidade de complexação deste último foram sistematicamente maiores.

7.0 PROPOSTAS FUTURAS:

Estudar as propriedades de complexação dos ácidos húmico e fúlvico com Cu(II) utilizando análise voltamétrica, no intuito de avaliar a labilidade dos complexos.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1] - Barbeiro, H.; Cantele, B.R.; Schneeberger, C.A.; *História – de olho no mundo do trabalho*; 1ª ed., Scipione: São Paulo, 2005;
- [2] - <http://www.wwf.org.br>, acessada em janeiro de 2005;
- [3] - Rocha, J.C.; Rosa, A.H.; *Substâncias Húmicas Aquáticas – Interações com Espécies Metálicas*, 1ª ed., UNESP: São Paulo, 2003;
- [4] - Abate, G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1998.
- [5] - Thurman, E.M.; Malcolm, R.L.; *Environ. Sci. Technol.* **1981**, 15, 463;
- [6] - Liu, A.; Gonzalez; R.D.; *Langmuir*. **2000**, 16, 3902;
- [7] - Lubal, P.; Fetsch, D.; Siroký D.; *Talanta*. **2000**, 51, 977;
- [8] - Pacheco, M.L.; Havel, J.; *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2001**, 248, 565;
- [9] - Ghabbour, E.A.; Davies, G.; Ghali, N.K.; Mulligan, M.D.; *Canad. J. Soil. Sci.* **2001**, 81, 331; Apud: Peña-Méndez [10];
- [10] - Peña-Méndez, E.; Havel, J.; Patočka, J.; *J. Appl. Biomed.* **2005**, 3;
- [11] - Bondietti E.; *Environmental migration of longlived radionuclides*; IAEA: Vienna 1982; Apud: [10];
- [12] - Ghabbour, E.A.; Davies, G.; *Humic substances: structures, models and functions* Based on proceedings, RSC: Cambridge, 2001;
- [13] - Rook, J.J.; *Water Treatment and Examination*. **1974**, 23, 234;
- [14] - Rook, J.J.; *Environ. Sci. Technol.* **1977**, 11, 478;
- [15] - Conte, P.; Piccolo, A.; *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 1682;
- [16] - Moraes; S.L. de; Rezende, M. O.O.; *Quim. Nova*. **2004**, 27, 701;
- [17] - <http://www.embrapa.org.br>, acessada em janeiro de 2003;
- [18] - Kononova, M.M.; *Soil organic matter: its nature, its role in soil formation and in soil fertility*, Pergamon Press: New York, 1966;
- [19] - Schnitzer, M.; Khan, S.U.; *Soil organic matter*, Elsevier: Amsterdam, 1978;
- [20] - Gjessing, E.T.; *Environ. Sci. Technol.*, **1970**, 4, 437;
- [21] - Stevenson, F.J.; *Húmus chemistry: genesis, composition and reaction*, John Wiley & Sons: New York, 1985;

- [22] - Maillard, L.C. ; *Ann. Chim. Phys.*; **1916**, 5, 258; Apud: Stevenson [21];
- [23] - Steelink, C.; *J. of Chem. Educ.*; **1963**, 40, 379;
- [24] - Fuchs, W.; *Kolloid Ztschr.*; **1930**, 52, 124; Apud: Stevenson [21];
- [25] - Fuchs, W.; *Die Chemie der Kohle*, Springer, Berlin, 1931; Apud: Stevenson [21];
- [26] - Hobson, R.P.; Page, H.J.; *J. Agr. Sci.*; **1932**, 22, 297; Apud: Stevenson; [21];
- [27] - Waksman, S.A.; *Húmus*; Williams and Wilkins, Baltimore (1936); Apud: Stevenson;
- [28] - Wilson, M.A.; Jones, A.J.; Williamson, B.; *Nature*; **1978**, 276, 487; Apud: Buffle [84];
- [29] - Calderoni, G.; Schnitzer, M.; *Geochim. Cosmochim. Acta.*, **1984**, 48, 2045;
- [30] - Wershaw, R.L.; *Environ. Sci. Technol.*, **1993**, 27, 814;
- [31] - Schnitzer, M.; *Agrochimica*; **1978**, 22, 216;
- [32] - Buffle, J.; *Complexation Reactions in Aquatic Systems; An Analytical Approach*; Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry: New York, 1990;
- [33] - Dragunov, S.S.; Zhelokhovtseva, N.J.; Strelkova, E.I.; *Pochvovedenie*, **1948**, 407; Apud: Buffle [32];
- [34] - Kleinhempel, D.; *Albrecht Thaer Arch.*; **1970**, 14, 3; Apud: Buffle [32];
- [35] - Garcia D., Cegarra J., Roig, A., Abad, M.; *Biores. Technol.* **1994**, 47, 103; Apud.: [10];
- [36] - Buckau, G.; Hooker, P.; Moulin, V.; *Versatile components of plants, soils and water*; RSC: Cambridge 2000;
- [37] - Lotosh, T.D.; *Nauchn. Dokl. Vyss. Skoly. Biol. Nauki.* **1991**, 10, 99; Apud: [10];
- [38] - Kocabagli, N., Kahraman, R.; *Poult. Sci.* **2002**, 81, 227;
- [39] - Pflug, W.; Ziechman, W.; *Soil Bio. Biochem.* 1982,14, 165;
- [40] - Thiel; K.D.; Helbig, B.; Klöcking, B.; Wutzler, P.; Sprossig, M.; Schweizer, H.; *Pharmazie*. **1981**, 36, 50; Apud.: [10];.
- [41] - Schneider, J.; Weis, R; Manner, C.; *Virology.* **1996**, 218, 389;
- [42] - Rensburg, C.E.V.; Dekker, J.; Weis, R.; Smith, T.L.; Rensburg, J.V.; Schneider, J.; *Chemotherapy.* **2002**, 48, 138; Apud: [10];
- [43] - Joone, G.K.; Dekker, J.; Rensburg, C.E.V.; *Z. Naturforsch.* **2003**, 58, 263; Apud: [10]

- [44] - Ho, K.J.; Liu, T.K.; Huang, T.S.; Lu, F.J.; *Arch. Toxicol.* **2003**, 77, 100;.
- [45] - Verstraete, W.; Devliegher, W.; *Biodegradation.* **1977**, 7, 471;
- [46] - Loffredo, E.; Pezzuto, M.; Senesi, N.; *Humic Substances: Versatile Components of Plants, Soils and Water*, E.A. Ghabbour and G. Davies: RSC, Cambridge, 2000.
- [47] - http://www.bndes.gov.br/conhecimento/livro_glossario/glossario.pdf acessada em julho/2005
- [48] - Rodrigues, V.C.; Theodoro, V.C. de A.; Andrade, I.F. de; Neto, A.I.; Rodrigues, V. do N.; Alves, F.; *Ciênc. Agrotec.* **2003**, 27, 1409;
- [49] - <http://www.unb.br/ig/glossario/verbete/coprolito.htm> acessada em julho 2005;
- [50] - Martinez, A.A.; *Manual prático do minhocultor*; FUNEP: Jaboticabal, 1995;
- [51] - Buckman, H.O.; Brady, N.C.; *Natureza e propriedade dos solos*; 4ª ed., F.Bastos: Rio de Janeiro, 1976;
- [52] - Balota, E.L.; Hungria, M.; Colozzi, F., A. *Biologia do solo*, EMBRAPA: Brasília, 1998;
- [53] - Lopes, J.F.P.; Theodoro, V.C.A.; *Curso de criação de minhocas e produção de vermicomposto*; FAEPE/UFLA: Lavras, 2000;
- [54] - Tagliari; P.S.; *Minhoca: a grande aliada da agricultura*., Agropecuária Catarinense: Florianópolis, 1995;
- [55] - Aquino, A.M.; Almeida, D.L.; Silva, V.F.; *Utilização de minhocas na estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem*, Centro Nacional de Pesquisa Biológica do Solo: Rio de Janeiro, 1992;
- [56] - Azevedo, F.A.; Chasin, A.A.da M.; *Metais: Gerenciamento da toxicidade*, 1ª ed., Atheneu: São Paulo, 2003;
- [57] - Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for copper. Syracuse: US Department of Commerce, 1990; Apud: [56];
- [58] - Hazardous Substance data bank. Copper. In: Tokes CPSTM System. Toxicology, Occupational Medicine and Environmental Series. [CD-ROM] Englewood: Micromedex; 2000; Apud: [56];
- [59] - World Health Organization. Copper. Geneva: WHO, 1998. (Environmental Health Criteria 200); Apud: [56];
- [60] - Hankin, R.; *Gemas, Cristais, Minerais*; Edições 70: Lisboa, 1998;

- [61] - Barceloux, D.G.; *Copper. Clin Toxicol.* **1999**, 37, 217; Apud: [56]
- [62] - Beaumont, M.W.; Butler, P.J.; Taylor, E.W.; *Aquatic Toxicol.* **2000**, 51, 259;
- [63] - Burgess, W.A.; *Identificação de possíveis riscos à saúde do trabalhador nos diversos processos industriais*, 2ª ed., Ergo: Belo Horizonte, 1995;
- [64] - MEDICAL MANAGEMENT. Copper. In: TOMES CPS™ SYSTEM. Toxicology, Occupational Medicine and Environmental Series. [CD-ROM] Englewood: Micromedex; 2000.; Apud: [56];
- [65] - Moore, M.; Imray, P.; Dameron, C.; Callan, P., Langley, A., Mangas, S. Copper. South Austrália: National Environmental Department, 1997. [National Health Monographs, Metal Series nº 3. Publicado por the National Environmental Health Fórum; Apud: [56];
- [66] - Bettiol, W.; Camargo, O..A.;. (eds). Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: EMBRAPA meio ambiente 2000;.Apud: [56];
- [67] - Salminen, R.; Rojstaczer, S.; Peuranioemi, V.; *Bangladesh. Environ. Geol.*, **2000**, 39, 1083;
- [68] - Steinnes, E.; Allen, R.; Petersen, H.; Rambaek, J.; Varksog, P.; *Sci Total Environ.* **1997**, 205, 255; Apud: [56];
- [69] - <http://www.cetesb.sp.gov.br/Água/rios/variáveis.asp#cobre> acessada em outubro/2004;
- [70] - Grobler, D.; *J. Vet. Res.* **1999**, 66, 81; Apud: [56];
- [71] - Blasco, J.; Arias, A.; Sáenz, V.; *Sci. Total. Environ.*, **1999**, 242; Apud: [56];
- [72] - BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº33, de 13/01/98: Dispõe sobre adoção de ingestão diária recomendada (IDR) de vitaminas, minerais e proteínas. Diário Oficial da União, Brasília, 16 jan de 1998, Seção I-E.; Apud :[56];
- [73] - INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM. Copper. In: TOMES CPS™ SYSTEM. Toxicology, Occupational Medicine and Environmental Series. [CD-ROM] Englewood: Micromedex; 2000; Apud: [56];
- [74] - Marsh, G.; Stone, R.; Esmen, N.; Gula, M.; Gause, C.; Petersen, N.; Meaney, F.; Prybylski, D.; *Arch. Environ. Health.* **1998**, 53, 15;

- [75] - Cao, J.; Lam, K.C.; Dawson, R.W.; Liu, W.X.; Tao, S.; *Chemosphere*. **2004**, 54, 507;
- [76] - Vogel, A.I.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed., JC: Rio de Janeiro, 1992;
- [77] - Christian, G.D.; *Analytical Chemistry*, 6ª ed., John Wiley: Washington, 2004
- [78] - <http://www.ihss.gatech.edu/>, acessada em agosto de 2001;
- [79] - www.embrapa.gov.br, acessada em julho de 2005;
- [80] - Person, L.; Ingman, F.; Johansson, A.; *Talanta*. **1976**, 23, 769;
- [81] - Seymour, M.D.; Clayton, J.N.; Fernando, Q.; *Anal. Chem.* **1977**, 49, 1429;
- [82] - Aleixo, L.M.; Godinho, O.E.S.; da Costa, W.F.; *Anal. Chim. Acta*. **1992**, 257, 35.
- [83] - Pinheiro, J.P.; Mota, M.; Gonçalves, M.L.S.; *Anal. Chim. Acta*. **1994**, 284, 525;.
- [84] - Buffle, J.; Altman, R.S.; Filella, M.; Tessier, A.; *Geochim. Cosmochim. Acta*. **1990**, 54, 1535;
- [85] - Chopinand, G.R.; Kullberg, L.; *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1978**, 40, 651;
- [86] - Takamatsu, T.; Yoshida, T.; *Soil Sci.*, **1978**, 125, 377;
- [87] - Tanford, C.; *Adv. Protein Chem.* **1962**, 17, 70;
- [88] - Perdue, E.M.; Lytle, C.R.; *Environ. Sci. Technol.*, **1983**, 17, 654;
- [89] - Perdue, E.M.; Reuter, J.H.; Parish, R.S.; *Geochim. Cosmochim. Acta*. **1984**, 48, 1257.
- [90] - Paxéus, N.; Wedborg, N.; *Anal. Chim. Acta*. **1985**, 169, 87;
- [91] - Masini, J.C.; *Talanta*. **1994**, 41, 1383;
- [92] - Marinsky, J.A.; Ephraim, J.; *Environ. Sci. Technol.* **1986**, 20, 349;
- [93] - Tipping, E.; Reddy, M.M.; Hurley, M.A.; *Environ. Sci. Technol.* **1990**, 24, 1700;
- [94] - Aleixo, L.M.; Godinho, O.E.S.; *Química Nova*. **1987**, 10-2, 83;
- [95] - Godinho, O.E.S.; Aleixo, L.M.; *Anal. Biochem.* **1981**, 112, 323;
- [96] - Masini, J.C.; Abate, G.; Lima, E.C.; Hahn, L.C.; Nakamura, M.S.; Lichtig, J.; Nagatomy, H.R.; *Anal. Chim. Acta*. **1998**, 364, 223;
- [97] - Abate, G.A.; Masini, J.C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 109;
- [98] - Masini, J.C.; *Anal. Chim. Acta*. **1993**, 283, 803;
- [99] - Seymour, M.D.; Clayton, J.N.; Fernando, Q.; *Anal. Chem.* **1977**, 49, 1429;
- [100] - Masini, J.C.; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1990.
- [101] - Leenheer, J.A.; Wershaw, R.L.; Reddy, M.M.; *Environ. Sci. Technol.* **1995**, 29, 399;

- [102] - Masini, J.C.; Godinho, O.E.S.; Aleixo, L.M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, 360, 104;
- [103] - Hutzinger, O.; *The Natural Environment and the Biogeochemical Cycles*, vol.1, part A, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 1980;
- [104] - Town, R.M.; Powell, H.K.J.; *Anal. Chim. Acta.* **1993**, 279, 221;
- [105] - Brown, G.K.; Cabaniss, S.E.; MacCarthy, P.; Leenheer, J.A.; *Anal. Chim. Acta.* **1999**, 402, 183;
- [106] - Martell, A.E.; Smith, R.M.; Motekaitis, R.J.; NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database, NIST, Department of Commerce, Gaithersburg, MD, 1993
- [107] - Borges, F.; Guimarães, C.; Lima, J.L.F.C.; Pinto, I.; Reis, S.; *Talanta.* **2005**, 66, 670;
- [108] - Plaza, C.; Orazio, D.V.; Senesi, N.; *Geoderma.* **2005**, 125, 177;
- [109] - Vasconcelos, M.T.; Azenha, M.; Freitas, V. de; *J. Agric. Food Chem..* **1999**, 47, 2791.

8.0 *CURRICULUM VITAE*

Sandro de Miranda Colombo

São Paulo – SP – 14 de janeiro de 1977

EDUCAÇÃO

Colégio “Nossa Senhora dos Remédios” – Osasco – SP – 1994

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Oswaldo Cruz – Bacharelado em Ciências com Habilitação em Química – 1998.

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Oswaldo Cruz – Licenciatura em Ciências e Química - 1999.

OCUPAÇÃO

Professor de Química e Ciências do Ensino Médio e Fundamental da Rede Pública e Particular de setembro de 1999 até julho de 2002.

Bolsista do CNPq de agosto de 2002 a agosto de 2004.

Janeiro de 2005 até junho de 2006: professor do Ensino Médio da Rede particular.