

SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE TURFA: ESTUDO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO ALCALINA[#]

André Henrique Rosa, Julio Cesar Rocha*, Maysa Furlan

Instituto de Química de Araraquara - UNESP - CP 355 - 14800-900 - Araraquara - SP

Recebido em 17/6/99; aceito em 28/11/99

HUMIC SUBSTANCES OF PEAT: STUDY OF THE PARAMETERS THAT INFLUENCE ON THE PROCESS OF ALKALINE EXTRACTION. This study reports the parameters which influence on extraction of humic substances (HS) from peat. The yield, organic and inorganic content, E_4/E_6 ratio and elemental composition (C,H,N) of the extracted HS have been determined. The functional groups were identified by Fourier-transform infrared spectroscopy. The results showed influence of the extractor type, concentration, time, temperature and granular texture of the sample in the extraction. This work contributes to better understanding of the extraction process showing the necessity of the standard method to extract humic substances from soil.

Keywords: humic substances; humic acid; fulvic acid; peat; extraction.

INTRODUÇÃO

Substâncias húmicas (SH) são formadas pela transformação de biomoléculas, durante o processo de decomposição de resíduos vegetais e animais presentes no ambiente^{1,2}. Devido a natureza heterogênea e complexa das SH pouco se sabe sobre sua estrutura química e apresentam-se como moléculas polidifusas com elevada massa molar^{3,4}. Possuem alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio na forma de carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas⁵. Operacionalmente as SH são fracionadas em função de sua solubilidade a diferentes valores de pH em: ácidos húmicos (m), ácidos fúlvicos (AF) e humina.

Devido suas características estruturais as SH podem interagir com metais^{6,7} e compostos orgânicos como por exemplo, pesticidas e herbicidas presentes no ambiente⁸⁻¹⁰. Para melhor compreender o comportamento das SH, estas têm sido estudadas sob diferentes aspectos: caracterização de estruturas parciais¹¹, determinação de constantes de equilíbrio de espécies metal-SH¹², labilidade relativa de metais¹³ etc.. Entretanto, a primeira etapa para esses estudos é a extração das SH. Das condições experimentais utilizadas no procedimento de extração dependerão as futuras interpretações. Assim, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam extrair SH de solos, com mínimas alterações nas estruturas originais, em tempo relativamente curto, elevado rendimento e baixo teor de contaminantes¹⁴.

Ainda não existe uma metodologia para extração de SH de solos, oficialmente adotada. Alguns autores têm utilizado extratores mais brandos como pirofosfato de sódio¹⁵, agentes complexantes¹⁶, ácido fórmico¹⁷, misturas ácidas¹⁸ e solventes orgânicos¹⁹. Mesmo havendo risco de alterações estruturais, outros autores preferem a extração mais completa das SH utilizando álcalis^{1,2}. A International Humic Substances Society (IHSS) recomenda um procedimento baseado em 4 horas de extração com solução de NaOH 0,1 mol/L à temperatura ambiente na razão solo/extrator 1:10 (m/v) sob atmosfera de nitrogênio²⁰. Entretanto, de acordo com Parsons²¹, vários fatores influenciam no procedimento de extração e muitas questões ainda estão por ser respondidas.

Neste trabalho estudaram-se os parâmetros que influenciam na extração alcalina de SH de turfa como, tipo de extrator alcalino, concentração, tempo, temperatura de extração, razão turfa/extrator e granulometria da amostra.

MATERIAIS E MÉTODOS**Reagentes e soluções**

Utilizou-se água previamente destilada e purificada em sistema deionizador de água, Milli-Qplus até apresentar resistividade 18,2 M ohm/cm a 25°C e reagentes de grau analítico.

Coleta e preparo da amostra

Coletou-se amostra de turfa (30 cm de profundidade) em área localizada no município de Ribeirão Preto-SP. Após secagem ao ar, triturou-se em gral de porcelana e peneirou-se a 2 mm.

Tipo, concentração do extrator e tempo de extração

Fizeram-se extrações das SH variando-se as soluções extratoras (NaOH e KOH) e suas respectivas concentrações (0,1, 0,5 e 1,0 mol/L), por 4 horas, razão turfa/extrator 1:10 (m/v), temperatura ambiente (25-30°C), sob atmosfera de nitrogênio²² e agitação mecânica. Após extração, centrifugou-se a 2000.g por 10 minutos para separar a humina, fração insolúvel. Concentrou-se o extrato húmico (50 mL) em evaporador rotativo a 55°C até cerca de 10 mL, transferiu-se para placa de Petri e secou-se em estufa com circulação de ar. Repetiu-se esse procedimento variando-se o tempo de extração entre 1-8 horas.

Razão turfa/extrator, temperatura de extração e granulometria da amostra

Fizeram-se extrações das SH utilizando-se solução de KOH 0,5 mol/L, por 4 horas à temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio e agitação mecânica com diferentes razões turfa/extrator: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:50 (m/v). Posteriormente, com razão turfa/extrator 1:20 (m/v), estudaram-se a influência da temperatura de extração (25, 50 e 75°C) e granulometria da turfa (0,21, 0,59 e 1,0 mm).

e-mail: jrocha@iq.unesp.br

[#]Dedicated to the 60th birthday of Dr. Peter Burba and Prof. Dr. Celso A. F. Graner.

Fracionamento das substâncias húmicas em ácidos húmicos e fúlvicos

Para fracionamento em ácidos húmicos e fúlvicos, ajustou-se o pH das SH em 1,5 com solução de HCl 6,0 mol/L. Após decantação e centrifugação a 2000.g por 10 minutos o AH foi transferido para placa de Petri e seco em estufa de circulação de ar a 55°C. O AF foi concentrado em evaporador rotativo a 55°C, transferido para placa de Petri e seco em estufa de circulação de ar.

Teor de matéria orgânica e rendimento das extrações

Determinou-se o teor de matéria orgânica pela diferença entre a massa de material seco submetido à calcinação (750°C por 4 horas) e o resíduo final obtido²³. O rendimento da extração foi obtido pela diferença entre a massa de turfa seca submetida à extração e a massa de SH extraída. Calcularam-se os rendimentos de AH e de AF pelas diferenças entre a massa de SH submetida à acidificação a pH 1,5 e as massas obtidas para os respectivos ácidos.

Espectroscopia na região do visível e do infravermelho

Após purificação das amostras por diálise, conforme procedimento descrito por Town *et al.*²⁴, dissolveram-se 0,02 g de AH e de AF em 10 mL de solução de NaHCO₃ 0,05 mol/L e determinaram-se as razões entre as absorvâncias lidas a 465 e 665 nm (E_4/E_6)²⁵. Obtiveram-se espectros na região do infravermelho com pastilhas de KBr (200 mg) e 0,5 mg de cada ácido, submetendo-se a mistura (KBr:AH ou AF) à pressão de 10 t/cm² em pastilhador de 14 mm de diâmetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tipo e concentração do extrator

A Figura 1 mostra resultados referentes ao rendimento, teor de matéria orgânica e inorgânica das SH extraídas em função da concentração e do tipo de extrator. De acordo com Clapp *et al.*²⁰ e Swift²⁶ o processo de extração alcalina compreende a ionização dos grupos ácidos, causando expansão e repulsão de cargas da macromolécula húmica resultando na transferência das SH da fase sólida para a solução. Consequentemente, a solubilidade das SH é dependente do pH, força iônica e natureza dos eletrólitos²⁴.

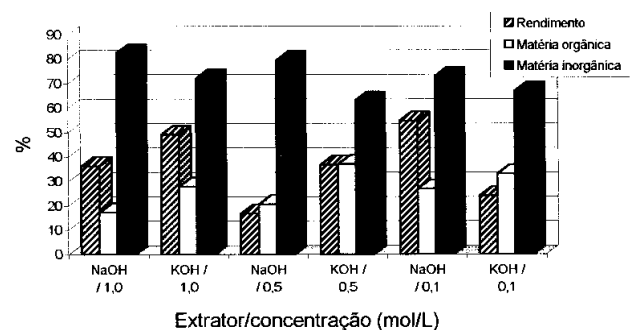


Figura 1. Influência do tipo e da concentração da solução extratora no rendimento, teor de matéria orgânica e inorgânica das substâncias húmicas extraídas de turfa.

No intervalo de concentração estudado, o rendimento das SH extraídas aumentou em função do aumento da concentração da solução de KOH. Entretanto, este comportamento não foi observado quando utiliza-se solução de NaOH pois, neste caso, o menor rendimento foi caracterizado utilizando-se concentração intermediária, ou seja 0,5 mol/L. Provavelmente, as diferentes concentrações e características termodinâmicas (raio de hidratação²⁷ e mobilidade iônica²⁸) dos contra íons Na⁺ e K⁺ influenciaram no processo de solvatação dos grupos ionizados, e conse-

qüentemente, no rendimento da extração. Com soluções extradoras mais diluídas (0,1 mol/L) utilizando-se NaOH o rendimento é cerca de duas vezes maior. Entretanto, em concentrações mais elevadas (1,0 e 0,5 mol/L) o rendimento é maior quando se utiliza solução de KOH e, além disso, o material inorgânico co-extraído é menor. A vantagem de extrair SH com baixo teor de cinzas é diminuir etapas de purificação as quais sempre causam perda de material e possibilitam modificações estruturais nas SH. Assim, nesse trabalho, optou-se pela não purificação das SH extraídas para melhor avaliação dos parâmetros envolvidos no processo de extração. Entretanto, a não purificação das SH tornou inviável a comparação entre os resultados de caracterização obtidos com dados da literatura para SH com baixos teores de cinzas.

A razão E_4/E_6 está diretamente relacionada à condensação estrutural, sendo indicativo do grau de humificação, aromaticidade, peso molecular e conteúdo ácido das SH. A diminuição dos valores da razão E_4/E_6 indicam maior condensação enquanto que maiores razões estão associadas a estruturas menos condensadas^{1,4}.

A Tabela 1 mostra resultados referentes à razão das absorvâncias E_4/E_6 das SH, AH e AF extraídos de turfa utilizando-se soluções extradoras de hidróxido de sódio e de potássio em diferentes concentrações.

Tabela 1. Influência do tipo e concentração da solução extratora na razão das absorvâncias E_4/E_6 , das substâncias húmicas, ácidos húmico e fúlvico extraídos de turfa.

Solução extratora	Concentração (mol/L)	E_4/E_6		
		SH	AH	AF
NaOH	1,0	5,75	4,22	4,05
NaOH	0,5	5,21	4,65	4,20
NaOH	0,1	3,75	4,72	4,63
KOH	1,0	3,14	4,20	3,67
KOH	0,5	3,55	3,94	3,02
KOH	0,1	3,58	3,80	3,26

A maior tendência do AF em formar pontes de hidrogênio intra e intermolecular²⁹ é responsável pelas menores razões E_4/E_6 se comparadas àquelas referentes ao AH. Independentemente da concentração, as SH extraídas com solução de KOH, tiveram menores razões E_4/E_6 indicando maior condensação estrutural.

Os resultados da Tabela 2 também indicam a influência do tipo e concentração do extrator utilizado na composição elementar das substâncias húmicas extraídas. Os valores das razões molares H/C estão diretamente relacionados ao conteúdo ácido das SH e observa-se pela Tabela 2 que a utilização de KOH e soluções extradoras mais diluídas extraem SH com maior acidez. Esses resultados estão associados ao processo de neutralização e contrabalanço das cargas das SH pelo extrator^{20,26}. A diferença entre os teores de nitrogênio das SH extraídas pode indicar uma possível contaminação de substâncias de natureza não húmica como por exemplo, proteínas e aminoácidos quando a extração é feita com NaOH ou sugerir uma extração incompleta do material húmico por KOH.

A Figura 2 mostra forte influência do tipo e da concentração da solução extratora no teor de AH e AF extraídos da amostra de turfa. Diminuindo a concentração do álcali, a extração do AH aumenta e a do AF reduz. Essas evidências ficaram caracterizadas inclusive por visualização da diferença de coloração (castanho, amarelo e quase incolor) da fração fúlvica extraída em função da concentração da solução extratora utilizada. Isto decorre do aumento da concentração do álcali causando rompimento de forças intermoleculares que ligam o AF ao AH, como pontes de hidrogênio ou ligações do tipo éster¹. Comportamento semelhante é observado na utilização de pirofosfato de sódio como solução extratora³⁰.

Tabela 2. Resultados da composição elementar das substâncias húmicas extraídas de turfa.

Substância húmica*	Composição elementar (%)			
	C	H	N	H/C
SH _A	27,59	4,44	1,52	1,94
SH _B	26,88	4,73	1,43	2,11
SH _C	22,31	5,18	1,58	2,78
SH _D	26,19	5,48	0,71	2,51
SH _E	25,79	6,13	0,57	2,85
SH _F	23,06	6,35	0,49	3,31

SH_A = extração com solução de NaOH 1,0 mol/L;

SH_B = extração com solução de NaOH 0,5 mol/L;

SH_C = extração com solução de NaOH 0,1 mol/L;

SH_D = extração com solução de KOH 1,0 mol/L;

SH_E = extração com solução de KOH 0,5 mol/L;

SH_F = extração com solução de KOH 0,1 mol/L;

* substância húmica não purificada

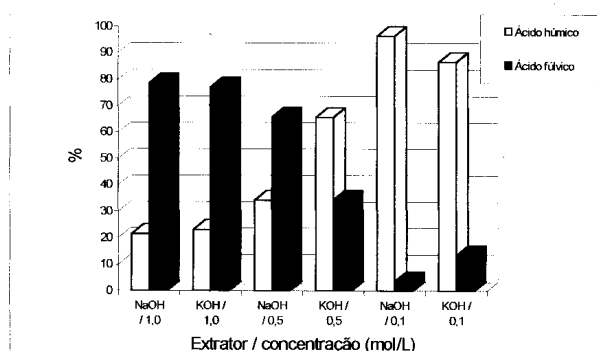


Figura 2. Influência da solução extratora e da sua concentração no teor de AH e AF extraído de turfa.

As bandas de absorção dos espectros na região do infravermelho obtidos dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos com soluções de NaOH e KOH em diferentes concentrações são compatíveis com aquelas encontradas na literatura^{3,31}. As principais bandas de absorção dos espectros de AH são listadas na Tabela 3 e mostradas na Figura 3.

Os espectros dos AF (Figura 4) mostram praticamente as mesmas frequências de absorção, com excessão da banda cerca de 1700 cm⁻¹ que encontra-se deslocada para frequências próximas de 1680 cm⁻¹ podendo estar associada ao estiramento C=O de cetonas conjugadas. Também verifica-se nos espectros do AF o desaparecimento da banda na região de 3700 cm⁻¹ associada ao estiramento OH de silicatos e o fortalecimento da banda na região de 1000 cm⁻¹ característica marcante de estiramento C-O de carboidratos, indicando assim, ser este o contaminante principal da fração fúlvica.

Tabela 3. Bandas de absorção na região do infravermelho observadas nos espectros de ácidos húmicos extraídos de turfa utilizando-se soluções extratoras de NaOH e KOH em diferentes concentrações.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3700 - 3750	estiramento OH de silicatos;
~ 3400	estiramento OH de álcoois e/ou fenóis e/ou ácidos carboxílicos e/ou NH;
2.940 - 2.900	estiramento assimétrico de C-H de alifáticos (-CH ₂);
1720	estiramento C=O, de grupos carboxílicos e/ou carbonílicos;
1.620 - 1.600	estiramento C=C de anel aromático;
1.590 - 1.517	estiramento C=C de anel aromático, deformação N-H de aminoácidos e estiramento C=N;
1450	deformação CH de alifáticos (-CH ₂ ; -CH ₃);
1.400 - 1.370	deformação O-H, deformação C-H (-CH ₂ ; -CH ₃), estiramento simétrico do COO ⁻ ;
1.170 - 950	estiramento C-O de álcoois e/ou fenóis e/ou carboidratos, impurezas de silicatos (Si-O);
~ 900	deformações fora do plano de CH de aromáticos

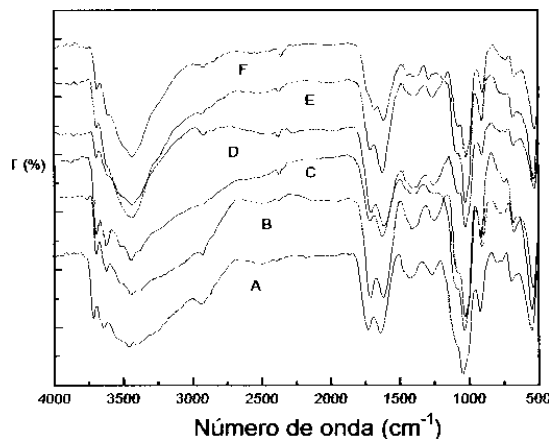


Figura 3. Espectros no IV de ácidos húmicos (pH: 1,5) extraídos de turfa com soluções de NaOH e KOH em diferentes concentrações. (A: NaOH 1,0 mol/L; B: KOH 1,0 mol/L; C: NaOH 0,5 mol/L; D: KOH 0,5 mol/L; E: NaOH 0,1 mol/L; F: KOH 0,1 mol/L).

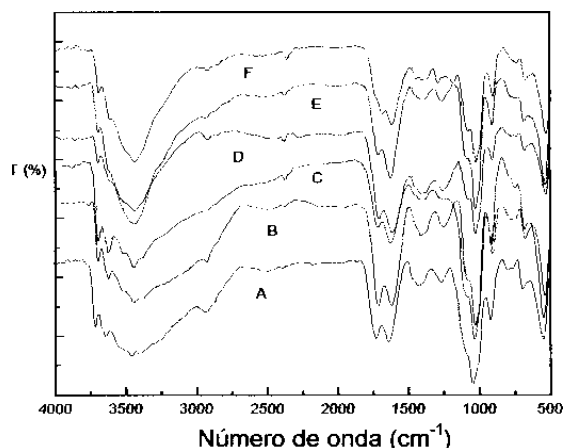


Figura 4. Espectros no IV de ácidos fúlvicos (pH: 1,5) extraídos de turfa com soluções de NaOH e KOH em diferentes concentrações. (A: NaOH 1,0 mol/L; B: KOH 1,0 mol/L; C: NaOH 0,5 mol/L; D: KOH 0,5 mol/L; E: NaOH 0,1 mol/L; F: KOH 0,1 mol/L).

Comparando-se os espectros dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos com solução de KOH e de NaOH em diferentes concentrações (Figuras 3 e 4), não se observam alterações significativas quanto à natureza dos grupos presentes na estrutura das macromoléculas húmicas.

Tempo de extração e razão turfa/extrator

A Figura 5 mostra a influência do tempo de extração no teor de matéria orgânica extraída. Segundo Stevenson¹, a quantidade

de matéria orgânica (MO) extraída com solventes alcalinos eleva-se com o tempo de extração devido à lenta despolimerização de complexos de alto peso molecular. Esses complexos fazem parte da humina e estão associados a sesquióxidos e silicatos. Assim, o tempo necessário para extração depende do grau de humificação da MO e das características do material inorgânico presente na matriz. Na amostra utilizada neste estudo, verifica-se a despolimerização da MO presente na humina até 240 minutos, após esse tempo não há aumento considerável no teor de MO extraída.

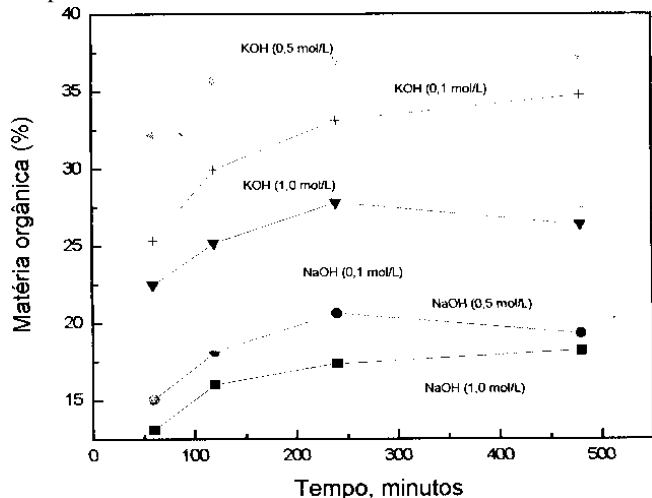


Figura 5. Influência do tempo de extração no teor de matéria orgânica extraída de turfa.

Utilizando-se a razão turfa/extrator 1:20 (m/v) o rendimento de material orgânico extraído foi maior. Em razões maiores observou-se apenas aumento do teor de material inorgânico mas não no conteúdo de material orgânico extraído. A variação do tempo de extração e das razões turfa/extrator não apresentaram diferenças significativas nos valores da razão E_4/E_6 das SH extraídas.

Temperatura de extração

A Tabela 4 lista resultados da razão E_4/E_6 e teores de AH e AF extraídos em função da temperatura de extração. O aumento da temperatura não exerceu grande influência no rendimento do material extraído. Entretanto, há redução do teor de AH com o aumento da temperatura provavelmente devido ao rompimento de ligações tipo pontes de hidrogênio ou éster presentes na estrutura das moléculas húmicas³².

Tabela 4. Influência da temperatura (25, 50 e 75°C) na extração das SH de turfa.

Temperatura de extração (°C)	SH E_4/E_6	AH		AF	
		R	E_4/E_6	R	E_4/E_6
25	3,87	22,87	3,94	77,13	3,02
50	3,35	20,43	4,10	79,57	3,22
75	3,62	16,18	4,56	83,82	3,35

R - rendimento (%)

Comparando-se os espectros de AH extraídos a 50 e 75°C, com o espectro de AH extraído a 25°C (Figura 6) verifica-se o desaparecimento das bandas em torno de 3750 cm^{-1} (estiramento OH de silicatos), 3450 cm^{-1} (estiramento OH de álcoois e/ou fenóis) e 1030 cm^{-1} (estiramento CO de álcoois e/ou fenóis e SiO de impurezas de silicatos). Essas diferenças sugerem que a elevação da temperatura de extração pode causar oxidação

dos grupos hidroxílicos a carbonílicos de cetonas causando o rompimento do complexo AH-argila, havendo assim, liberação de impurezas de silicatos agregados à estrutura do complexo para a fração insolúvel (humina).

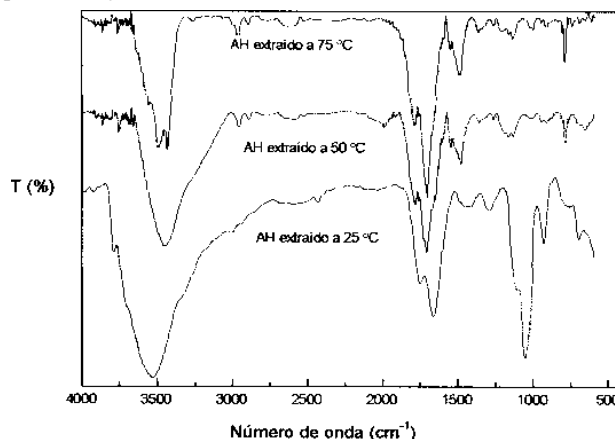


Figura 6. Espectros no IV de ácidos húmicos (pH = 1,5) extraídos de turfa em diferentes temperaturas (25, 50 e 75°C).

As diferenças observadas nos espectros de ácidos fúlvicos extraídos a 50 e 75°C em relação ao espectro de AF extraído a 25°C (Figura 7) foram: alargamento da banda em 3600 - 3000 cm^{-1} (estiramento OH de álcoois e/ou fenóis e/ou ácidos carboxílicos), aparecimento de banda em 1720 cm^{-1} (estiramento C=O de ácidos carboxílicos) e deslocamento/diminuição da banda referente ao estiramento C-O para região de 1100 cm^{-1} . Essas alterações no espectro possivelmente indicam a conversão de grupamentos hidroxílicos à ácidos carboxílicos devido oxidação durante o processo de extração. A diminuição da banda na região de 1000 cm^{-1} referente ao estiramento C-O também pode estar associada a degradação com a elevação da temperatura de carboidratos presentes na fração fúlvica.

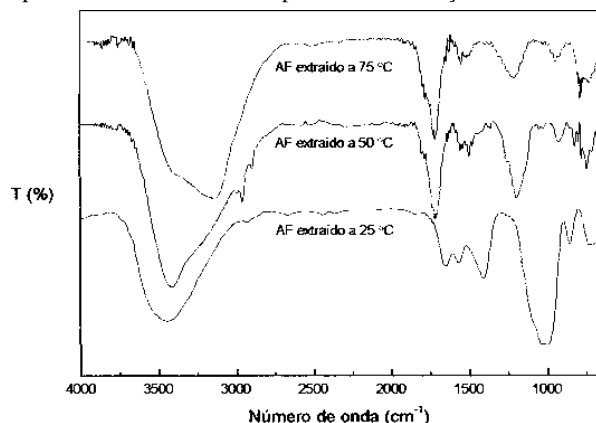


Figura 7. Espectros no IV de ácidos fúlvicos (pH = 1,5) extraídos de turfa em diferentes temperaturas (25, 50 e 75°C).

O aumento dos valores da razão E_4/E_6 (Tabela 4) de AH e AF também mostram diferenças que inferem a redução da condensação e do peso molecular, em função da elevação da temperatura de extração. Assim, os valores da razão E_4/E_6 e a análise dos espectros obtidos na região do infravermelho mostram que a elevação da temperatura da extração causa alterações estruturais tanto no AH como no AF. Essas modificações foram discutidas com base na comparação dos espectros de infravermelho e visível e estão de acordo com Pang, *et al.*³³ os quais utilizando RMN ^1H e ^{13}C verificaram que o aumento da temperatura durante a extração exerce influência nas características estruturais do material extraído pelo favorecimento de processos oxidativos.

Influência da granulometria do solo

A Tabela 5 lista os resultados referentes ao estudo da granulometria da turfa submetida a extração. O rendimento bruto da extração praticamente não variou com a granulometria da amostra de turfa. Entretanto, os teores de material orgânico e inorgânico extraídos são diretamente influenciados pela granulometria da amostra. Ou seja, menor granulometria favorece a extração de maior teor de matéria orgânica e, conseqüentemente, diminui o teor de matéria inorgânica (MI) devido ao aumento da superfície de contato da turfa com a solução extratora.

Tabela 5. Influência da granulometria (0,21; 0,59 e 1,00 mm) da turfa na extração das SH.

Granulometria da turfa (mm)	Substâncias húmicas		
	R (%)	MO (%)	MI (%)
0,21	49,67	31,34	68,66
0,59	52,18	28,59	71,41
1,00	50,35	25,43	74,57

R = rendimento (%);

MO = matéria orgânica (%);

MI = matéria inorgânica (%);

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram influência do tipo de extrator alcalino (NaOH e KOH), concentração (1,0, 0,5 e 0,1 mol/L), tempo de extração (60, 120, 240 e 480 minutos), temperatura de extração (25, 50 e 75°C), e granulometria da turfa (0,21; 0,59 e 1,0 mm) nas características estruturais, rendimento e teor de cinzas das SH extraídas de amostra de turfa. O extrator alcalino e sua concentração influenciaram no rendimento, teor de cinzas, razão E₄/E₆, e teor de AH e AF extraídos, mas não na presença dos grupos funcionais presentes na estrutura dos ácidos. O teor de matéria orgânica extraída (solúvel em álcali) eleva-se até 240 minutos e o rendimento foi maior utilizando-se a razão turfa/extrator 1:20 (m/v). Entretanto, estes parâmetros não influenciaram nas razões de absorvâncias (E₄/E₆) das SH extraídas. Altas temperaturas causam alterações estruturais nos ácidos devido à oxidação e quebra do complexo húmico-silicato e, aumentando o teor de AF em detrimento do teor de AH. A diminuição da granulometria da turfa permite a elevação do teor de matéria orgânica extraída devido ao aumento de sua superfície de contato com o solvente extrator.

As melhores condições para extração das substâncias húmicas da amostra de turfa em estudo foram: solução extratora KOH (0,5 mol/L), tempo de extração 4 horas, razão turfa/extrator 1:20 (m/v), temperatura ambiente (25 - 30°C), atmosfera de nitrogênio, agitação mecânica e granulometria de 0,21 mm. A solução extratora KOH (0,5 mol/L) apresentou vantagens em relação ao NaOH, para a amostra estudada, devido ao maior rendimento e redução de contaminantes no processo de extração.

Este trabalho contribui para um melhor entendimento dos parâmetros relacionados com o processo de extração alcalina de SH e caracteriza a importância da sistematização do processo de extração para melhor comparação entre resultados de amostras com características químicas distintas coletadas em diferentes localidades.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP (Proc. n.º 95/4682-9 e 97/10673-8) e CNPq por bolsas e suporte financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

1. Stevenson, F. J.; *Humus Chemistry*. Wiley & Sons; New York, 1982; p.198.

2. Senesi, N.; Miano, T. M.; *Humic substances in the global environmental and implications on human health*. Elsevier, Amsterdam, 1994.
3. Swift, R. S.; In: *Methods of soil analysis. Part 3. chemical methods - SSSA Book series no 5*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, 1996, p. 1011.
4. Stevenson, F. J.; In: *Humic Substances in soil, sediment and water*; Aiken, G. R.; Mcknight, D. M.; Wershaw, R. L., Eds. Wiley & Sons; New York, 1985; p.13.
5. Jordão, C. P.; Costa, E. D.; Brune, W.; Gourlart, A. T.; *Quim. Nova* **1993**, 16, 517.
6. Burba, P.; Rocha, J. C.; Klockow, D.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, 349, 800.
7. Rocha, J. C.; Sene, J. J.; Burba, P.; Klockow, D.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 79.
8. Landgraf, M. D.; Silva, S. C.; Resende, M. O. O.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 368, 155.
9. Santos, T. C.; Rocha, J. C.; Alonso, R. M.; Martinez, E.; Ibanez, C.; Barceló, D.; *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 3479.
10. Martin, L. N.; Vieira, E. M.; Sposito, G.; *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 1867.
11. Chiavari, G.; Torsi, G.; Fabbri, D.; Galletti, G. C.; *Analyst* **1994**, 119, 1141.
12. Pinheiro, J. P.; Mota, A. M.; Gonçalves, M. L. S.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, 284, 525.
13. Rocha, J. C.; Toscano, I. A. S.; Burba, P.; *Talanta* **1997**, 44, 69.
14. Rosa, A. H.; Rocha, J. C.; Sargentini Jr, E.; *European J. Soil Sci.* **2000** (in press).
15. Dick, D.; Burba, P.; Herzog, H.; In: *9th International meeting of the International Humic Substances Society*, Livro de resumos, 1998, p.75.
16. Whitehead, D. C.; Tinsley, J.; *Soil Sci.* **1967**, 97, 34.
17. Jones, M. J.; Parsons, J. W.; *J. Soil. Sci.* **1972**, 23, 119.
18. Stevenson, F. J.; Kidder, G.; Tilo, S. N.; *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **1967**, 31, 71.
19. Porter, L. K.; *J. Agr. Food. Chem.* **1967**, 15, 807.
20. Clapp, C. E.; Hayes, M. H. B.; Swift, R. S. In: *Organic substances in soil and water: Natural constituents and their influences on contaminant behaviour*. Beck, A. J.; Jones, K. C.; Hayes, M. H. B.; Mingelgrin, U. Eds.; Royal Society of Chemistry; Cambridge 1993; p.31.
21. Parsons, J. W. In: *Humic substances and their role in the environment*. Frimmel, F. H. & Christman, R. F. Eds.; John Wiley, Chichester 1988, p 03 - 14.
22. Rosa, A. H.; Rocha, J. C.; Furlan, M.; Zara, L. F.; Santos, A.; *Anais Assoc. Bras. Quím.* **1998**, 47, 25.
23. Griffith, S. M.; Schnitzer, M.; *Soil Sci. Amer. Proc.* **1975**, 39, 861.
24. Town, R. M.; Powell, H. K. J.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 256, 81.
25. Peuravuori, J.; Pihlaja, K.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 337, 133.
26. Swift, R. S.; In: *Humic substances II: in search of structure*. Hayes, M. H. B.; Maccarthy, P.; Malcolm, R. L.; Swift, R. S. (Eds.) Wiley; New York, 1989; p.450.
27. Kielland, J.; *Amer. Chem. Soc.* **1937**, 59, 1675.
28. Atkins, P. W.; *Physical Chemistry*, 5^a ed, Butler & Tanner; Oxford 1994; p.841.
29. Schnitzer, M.; Khan, S. U.; *Humic substances in the environment*, Marcel Dekker; New York 1972.
30. Gascho, G. J.; Stevenson, F. J.; *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **1968**, 32, 117.
31. Zunic, W. M.; Ding, S.; Durig, J. R.; Cohen, A. D.; *J. Mol. Struct.* **1992**, 287, 371.
32. Kononova, M. M.; *Soil Organic Matter*. Pergamon Press; Oxford 1966; p.75.
33. Pang, L. S. K.; Vassallo, A. M.; Wilson, M. A. *Org. Geochem.* **1990**, 16, 853.