

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA
E MORFOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS DA LAGOA DO PERI**

ESTÁGIO SUPERVISIONADO QMC 5510

**FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA – BRASIL
1999/2**



03738932

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
MORFOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DA
LAGOA DO PERI**

ESTAGIÁRIO: AMARILDO OTÁVIO MARTINS

ORIENTADORA: MARIA MARTA DE SOUZA SIERRA

*À minha esposa Lúcia
pela compreensão e apoio demonstrados
durante o curso de graduação.*

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	01
1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1. FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	02
1.2. ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	04
1.3. IMPORTÂNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	05
2. OBJETIVOS.....	06
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	07
3.1. RESINA DE TROCA IÔNICA.....	07
3.2. RESINA DE ADSORÇÃO	07
3.3. INSTRUMENTAÇÃO	07
3.4. AMOSTRAGEM	08
3.4.1. ÁREA DE ESTUDO.....	08
3.5. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	09
3.5.1. SECAGEM DA AMOSTRA	10
3.5.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4.1. COMPOSIÇÃO ELEMENTAR	11
4.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	13
4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	15
5. CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
FOTOS.....	21

RESUMO

Durante o estágio supervisionado foram feitas extrações das substâncias húmicas, segundo o método proposto pela sociedade internacional de estudos sobre substâncias húmicas (IHSS); coletados pelo núcleo de estudos do mar (NEMAR). As amostras foram caracterizadas por infravermelho, composição elementar, microscopia eletrônica de varredura e comparadas segundo dados da literatura.

Devido as condições do meio, as substâncias húmicas extraídas da Lagoa do Peri possuem um comportamento particular, influenciado pelos canais que drenam a lagoa. Portanto, um meio em constante renovação e pouco humificado.

Em relação a composição elementar observa-se que ocorre diminuição no conteúdo de oxigênio para os ácidos húmicos em relação aos ácidos fúlvicos, esta diminuição é conseqüência das reações de descarboxilação. Nos espectros de infravermelho os ácidos húmicos e ácidos fúlvicos exibiram as principais bandas características dos mesmos. A microscopia eletrônica de varredura é um parâmetro comportamental das substâncias húmicas após o processo de liofilização, havendo uma diferenciação dos ácidos húmicos em relação aos ácidos fúlvicos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

O extraordinário fenômeno bioquímico chamado fotossíntese regido pelos chamados produtores primários origina um enorme número de compostos orgânicos. Estes compostos, após a morte e decomposição dos organismos que deles se utilizam, dão origem a matéria orgânica dos solos, sedimentos e águas. De uma forma simplificada, este material pode ser dividido em dois grandes grupos. O primeiro grupo é constituído pelos produtos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano e inclui aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídios, ligninas, entre outros. O segundo grupo, por outro lado, resulta de uma série de reações enzimáticas entre estes compostos e é constituído de macromoléculas com características funcionais mistas. Estes últimos são chamados substâncias húmicas (SH). As SH são componentes majoritários (cerca de 70%) da matéria orgânica e estão presentes em águas, sedimentos e solos. Eles são fonte de elementos essenciais à vida, como o N e P; constituem uma grande reserva de carbono orgânico e ainda interagem com substâncias orgânicas e/ou inorgânicas no meio tanto de origem natural quanto antropogênica (Rashid, 1985).

Operacionalmente as substâncias húmicas (SH) são classificadas em ácidos húmicos (AH), solúveis em meio básico e insolúveis em meio ácido, ácidos fúlvicos (AF), solúveis em meio ácido e alcalino e as huminas; insolúveis em toda faixa de pH, não podendo ser extraída do solo ou sedimentos por ácidos ou bases diluídas.

A FIG.1 mostra uma proposição para o mecanismo de formação das SH, apresentado por Stevenson (1982).



Figura 1. Mecanismos de formação das SH no solo.

O processo de humificação parece ser simples. No entanto, o número de reações envolvidas são enormes. Aparentemente o ataque inicial aos materiais recentemente adicionados é realizado por representantes da mesofauna (formigas, térmitas e outros) (Pinheiro, 1996). Paralelamente ocorrem transformações conduzidas por enzimas produzidas por microrganismos (Stevenson, 1994). A fase inicial da biodegradação microbiana é caracterizada pela perda rápida de açúcares, proteínas, amido e numa segunda fase, ocorre a liberação de CO_2 (Sastriques, 1982).

1.2. ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Vários modelos de estruturas têm sido propostos para as SH. Schnitzer propôs os modelos para AH e AF representados nas FIGS. 2 e 3.

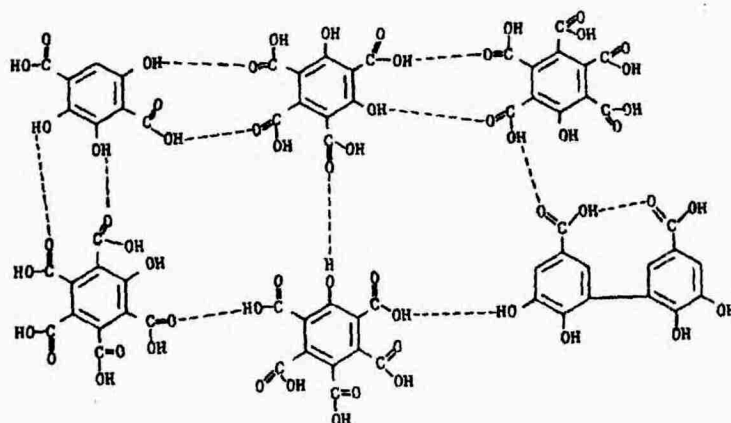


Figura 2. Estrutura de AF proposta por Schnitzer (1978).

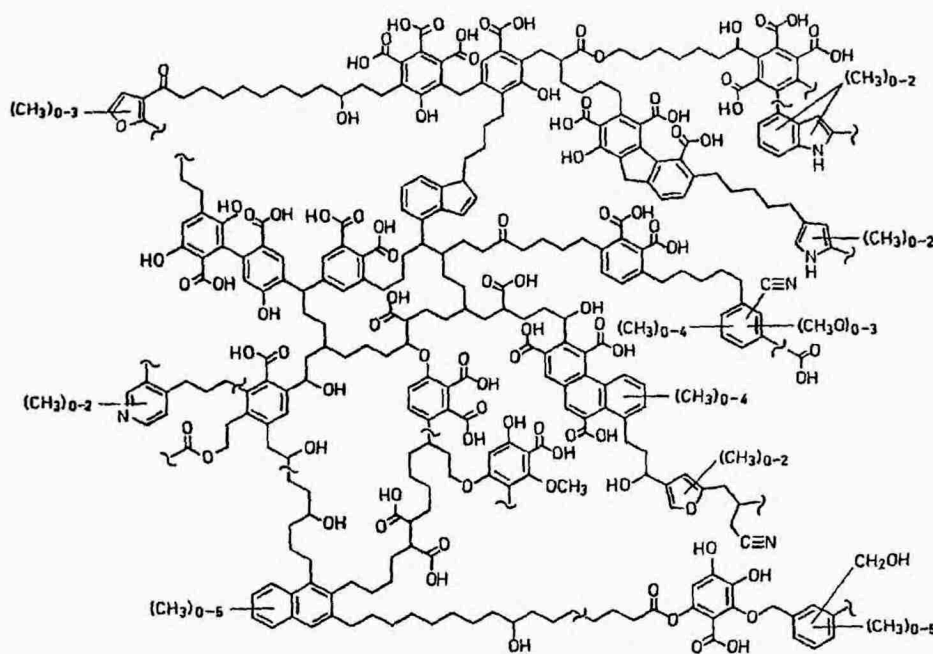


Figura 3. Estrutura de um ácido húmico proposta por Schnitzer 1993.

Os AF têm massa molar mais baixa se comparados com os AH e contêm consideráveis quantidades de grupos funcionais de natureza ácida, particularmente os carboxílicos. A estrutura dos AH é, em geral, mais rica em carbono do que a dos AF e a quantidade relativa de O é menor para os AH devido ao processo de descarboxilação durante a humificação. A quantidade de hidrogênio nos AH em relação aos AF é menor, em contraposição com a quantidade de nitrogênio que é maior para os primeiros. A diferença nas composições elementares entre AF e AH podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Faixa de composição elementar de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) de solos (Schnitzer, 1978).

SH	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	S (%)
AH	53,6 - 58,7	3,2 - 6,2	0,8 - 5,5	32,8 - 38,3	0,1 - 1,5
AF	40,7 - 50,6	3,8 - 7,0	0,9 - 3,3	39,7 - 49,8	0,1 - 3,6

1.3. IMPORTÂNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As SH ajudam na germinação de sementes, pois fazem aumentar a retenção de calor pelo solo, graças à sua coloração tipicamente escura. Devido à sua alta capacidade de retenção de água as SH evitam o escoamento sendo importantes na conservação do solo contra a erosão. Interagem ainda com argilas minerais, cimentando assim as partículas do solo em agregados, permitindo a troca de gases e conseqüentemente a permeabilidade (Senesi *et al.*, 1989; Ricca *et al.*, 1993).

A presença de grupos funcionais, particularmente carboxilas e hidroxilas fenólicas, que podem ser protonados e desprotonados segundo o pH nos diversos setores do meio ambiente, fazem com que as SH assumam um comportamento polieletrólítico e funcionem como agente tamponante de

íons metálicos nos ambientes naturais (Saar e Weber, 1982; Samanidou *et al.* 1991). Metais como cobre e cádmio, pôr exemplo, quando complexados com as SH são menos tóxicos aos organismos do que em suas formas hidratadas (Sunda e Lewis, 1978; Wangersky, 1986; Florence *et al.*, 1992).

Em ambientes aquáticos, as SH podem ainda alterar a partição dos metais passíveis de complexação, seqüestrando ou liberando estes íons para o ambiente. Além da complexação com metais, tem sido mostrado que as SH podem interagir com poluentes orgânicos, tais como o DDT e outros. O modo de ação vai desde um aumento na solubilidade do agente tóxico, até sua completa imobilização, se o agente se liga à humina, que é insolúvel (Manahan, 1989; Kango e Quinn, 1992).

O estudo da dinâmica da matéria orgânica, especificamente as SH, contribui decisivamente para o desenvolvimento da ciência do solo reduzindo o impacto ambiental. É portanto, considerado como uma das prioridades de pesquisa para o próximo século. A busca de sistemas sustentáveis e produtivos pode ocorrer através do manejo adequado dos recursos disponíveis, mantendo e melhorando a qualidade ambiental e conservando os recursos naturais.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o de extrair as SH de cinco amostras de sedimentos provenientes da Lagoa do Peri, avaliando suas características estruturais e espectrais por meio de CHN, infravermelho e morfológicas por microscopia eletrônica de varredura, de forma a averiguar a origem deste material, comparando-os com outros resultados da literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Resina de Troca Iônica Amberlite® IRA 200

Procedência: Supelco Park

Para converter a resina na forma ácida, lavou-se inicialmente com solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 15 minutos com agitação. Após a remoção do sobrenadante, adicionou-se solução de ácido clorídrico $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e manteve-se a agitação por mais 1 hora.

3.2. Resina Supelite™ DAX-8

A resina Supelite™ DAX-8, sendo hidrofóbica, concentra a matéria orgânica presente em solução aquosa. Esta resina tem sido indicada pela IHSS para extração de SH de sedimentos e águas. A resina foi tratada segundo o método desenvolvido por Thurman e Malcolm (1981), descrito a seguir:

Lavou-se a resina várias vezes com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para eliminar parte do material que se forma por estocagem da mesma em laboratório. A seguir, a resina foi lavada seqüencialmente, por períodos de 6 horas, com metanol, éter etílico, acetonitrila e metanol, num extrator Soxhlet.

3.3. INSTRUMENTAÇÃO

A matéria orgânica foi fracionada em uma centrífuga Excelsa Baby modelo 206/2.

As soluções foram evaporadas em um rotaevaporador Fisatom modelo 802 e liofilizadas em um Liofilizador Edwards.

Os espectros de Infravermelho dos AF e AH (2 mg em pastilha de KBr) foram registrados em um Espectrofotômetro FT Perkin Elmer modelo 16 PC.

A análise elementar dos AF e AH foi realizada em um Analisador Elementar CHNS - O - EA 1110 CE - Instruments.

As análises morfológicas de microscopia eletrônica de varredura foram feitas em Microscópio eletrônico de varredura Philips XL30. As amostras foram metalizadas, em uma fina camada de ouro, em um metalizador P-S2 Diod Sputtering System.

3.4. AMOSTRAGEM

3.4.1. ÁREA DE ESTUDO

A Lagoa do Peri está localizada na parte sul da Ilha de Santa Catarina, entre as coordenadas geográficas (48° 43' 30" S e 48° 32' 18" W). Apresenta uma área de 5,12 km², sendo sua configuração no sentido norte-sul, com extensão de 4 km, e larguras que variam de 1,0 km a 1,7 km.

A cobertura vegetal da Bacia da Lagoa do Peri, está composta principalmente por espécies integrantes da Mata Atlântica, reflorestamento de Pinus e Eucaliptos, e por vegetação de restinga.

Os principais canais fluviais que drenam para a Lagoa do Peri são: Ribeirão do Peri, Cachoeira Grande e o Cachoeira Pequena.

A FIG.4 mostra os pontos de coleta na Lagoa do Peri.

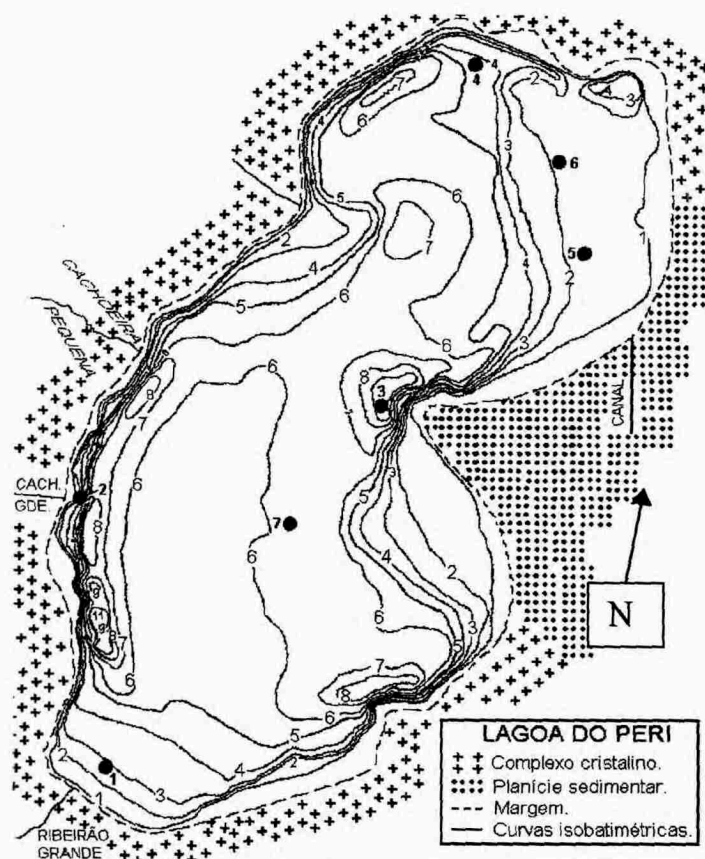


Figura 4 - Localização dos pontos de amostragem da Lagoa do Peri.
Pontos de coleta: 1,3,4,6,7.

3.5 COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras foram coletadas com o auxílio de uma embarcação, utilizando-se amostrador do tipo van Veen com capacidade de 1000g. Foram embaladas em sacos plásticos, e acondicionados para transporte ao laboratório.

3.5.1 SECAGEM DA AMOSTRA

As amostras de sedimentos foram processadas no Laboratório de Hidrogeoquímica do Núcleo de Estudos do Mar (NEMAR), sendo efetuados análise granulométrica e de teor em matéria orgânica. As amostras foram lavadas para retirada de sais solúveis, secas em estufa à temperatura inferior à 60°C, tamizadas, pulverizadas em grau de porcelana e homogeneizadas para posterior separação granulométrica.

Após a passagem em coluna vibratória Produ-test e um jogo de peneiras Granu-test tomou-se 100 g de cada amostra de sedimento e deu-se início à etapa de extração.

3.5.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

O fluxograma abaixo mostra, resumidamente, as várias etapas do processo de extração das SH proposto pela IHSS (International Humic Substance Society).

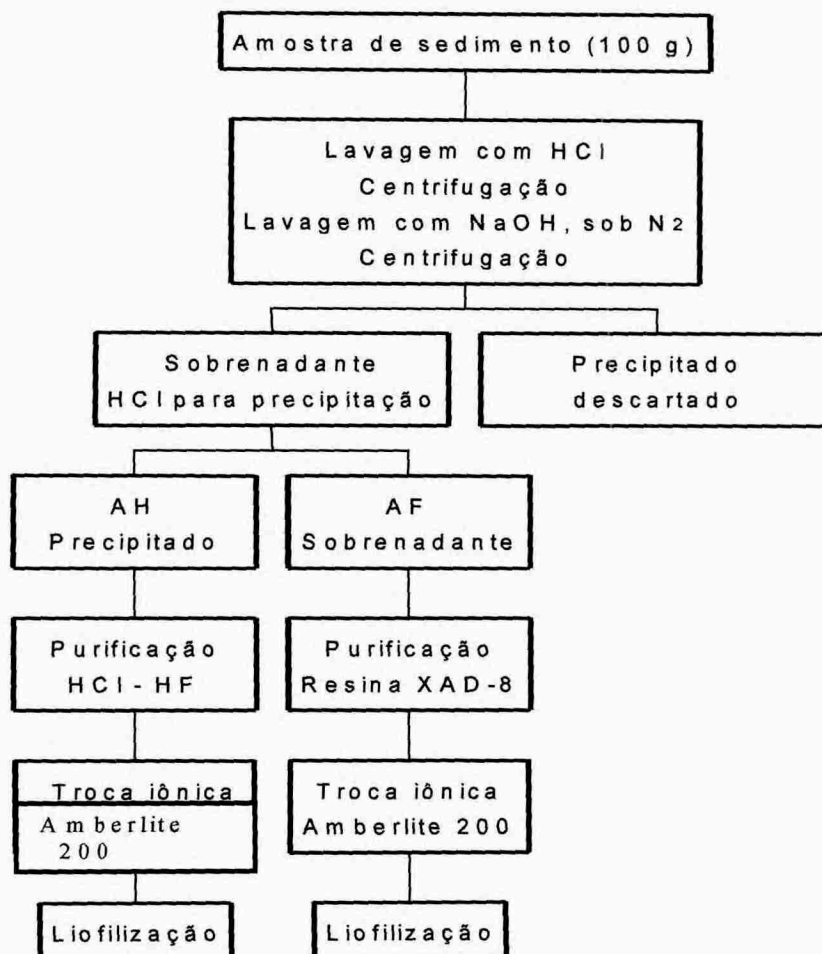


Figura 5- Fluxograma simplificado do processo de extração das SH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPOSIÇÃO ELEMENTAR

A composição elementar é a distribuição percentual dos átomos que compõe a rede estrutural das substâncias húmicas. A análise do conteúdo relativo de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre revela que

essas substâncias apresentam uma natureza química muito particular, distinta de qualquer substância de natureza vegetal ou animal (Kononova, 1982).

Em relação à composição elementar média dos organismos vivos (animais e vegetais), as SH apresentam enriquecimento no teor de carbono devido principalmente, às reações de polimerização e condensação ocorridas durante a humificação.

A Tabela 2 apresenta os valores de composição elementar obtidos neste trabalho bem como suas razões.

Tabela 2. Composição Elementar das substâncias húmicas da Lagoa do Per.

Amostra	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O + P (%)	C/N	C/H
AF 7	41.9	4.7	3.0	nd	50.4	13.9	9.0
AH 7	46.7	5.5	4.8	2.84	40.0	9.6	8.4
AH 1	48.7	5.3	3.2	2.28	40.6	15.3	9.2
AH 3	46.4	4.7	2.7	nd	46.1	16.9	9.9
AH 4	46.6	5.3	4.6	nd	43.6	10.2	8.8
AH 6	44.8	6.0	5.2	nd	44.0	8.5	7.5

Obs.: Os AF 1,3,4 apresentaram valores de C menor que 20%

Observa-se que ocorre diminuição no conteúdo de oxigênio para os AH em relação ao AF. Esta diminuição é consequência, principalmente das reações de descarboxilação, uma vez que além de menor conteúdo de oxigênio os AH também apresentam menor conteúdo de grupamentos carboxílicos do que os AF. A percentagem de oxigênio é obtida, na maior parte dos trabalhos, de forma indireta, pela diferença entre o somatório da composição de C,H,N e S.

Analisando os dados da literatura observamos que os percentuais de carbono para as SH deste trabalho estão de acordo com os da Tabela 1.

As razões entre as concentrações dos elementos (C/H, C/N e C/O) refletem o grau de humificação ou seja o grau de condensação, o que está ligado às condições ambientais no processo de diagênese nas SH. As SH que apresentam razões C/H variando 6 e 10 são identificadas com locais de constante renovação e menos aeróbicos (Rashid e King, 1970; Nissebaum e Kaplan, 1972; Stuermer *et al.*, 1978; Nissenbaum, 1979). Os valores de C/H da Tabela 2 situam-se entre 7,5 e 9,9 o que demonstra que as amostras de sedimentos da Lagoa do Peri exibem um comportamento típico de um local pouco aeróbico e com deposição contínua de matéria orgânica. Razões C/H classificadas entre 16 e 21 refletem matéria orgânica mais condensada com pouco hidrogênio. (Kononova 1966).

As razões C/N têm sido usadas para identificar a origem da matéria orgânica. O material proveniente de organismos marinhos, por exemplo é, geralmente, rico em nitrogênio apresentando baixos valores de C/N (entre 10 e 15). O material orgânico de solos, por outro lado, devido ao consumo de N pelas plantas tem valores C/N mais altos (Rashid e King 1970). Os valores aqui encontrados são variáveis mas baixos o suficiente para classificar o material como sendo de origem fitoplanctônico.

4.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV)

A aplicação da espectroscopia de IV na análise de substâncias húmicas é relativamente comum, existindo, na literatura, uma quantidade razoável de informações e dados resultantes dessa técnica (Stevenson, 1971; Celi *et al.*, 1997; Dick *et al.* 1997).

Segundo Stevenson (1994), a importância da espectroscopia de IV no estudo de substâncias húmicas reside no fato de através dela ser possível:

a) obter informações sobre a natureza, a reatividade e o arranjo estrutural dos grupos funcionais oxigenados presentes; b) identificar a ocorrência de estruturas de carboidratos e proteínas; c) estabelecer a presença ou ausências de impurezas inorgânica (metais, argilo-minerais); d) realizar análise quantitativa; e) analisar as interações entre matéria orgânica - metal e matéria orgânica - pesticida. Os espectros de infravermelho de AH da Lagoa do Peri são mostrados na FIG. 6.

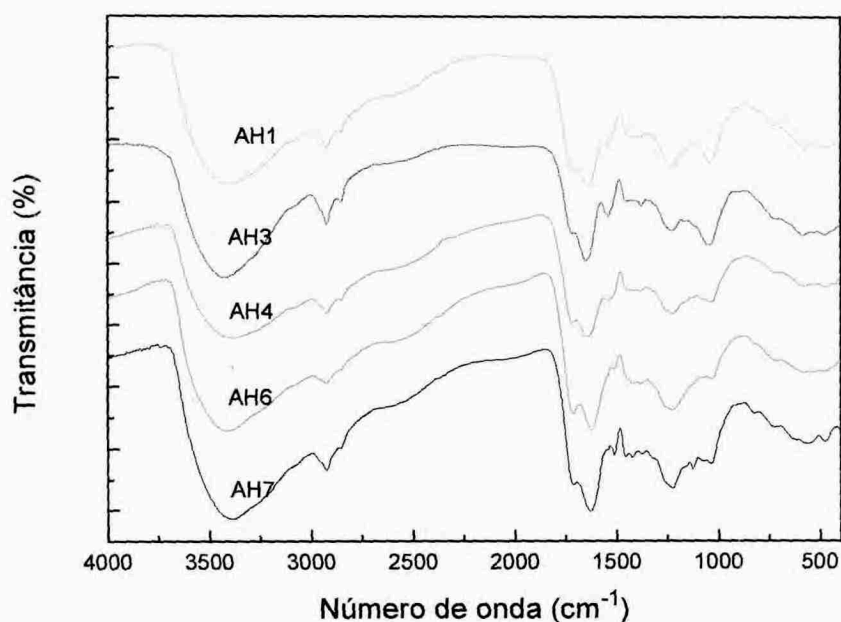


Figura 6. Espectros de infravermelho dos ácidos húmicos da Lagoa do Peri.

Os espectros de infravermelho de AH exibem predominantemente a presença de grupos funcionais oxigenados na região de 3300 à 3400 cm^{-1} , relativo ao estiramento do grupo OH. Na região de 2900 cm^{-1} o estiramento da ligação C-H é relativo a metilas de grupamentos alifáticos. Em 1628 cm^{-1} o estiramento do grupo C=C é característico dos anéis aromáticos. Na região

de 1512 cm^{-1} é devido a deformação N-H e o estiramento C=N. Na região de 1226 cm^{-1} relativo ao estiramento C-O ou Si-O.

Os espectros de infravermelho de AF são mostrados na FIG.7, e exibem comportamento semelhante aos AH.

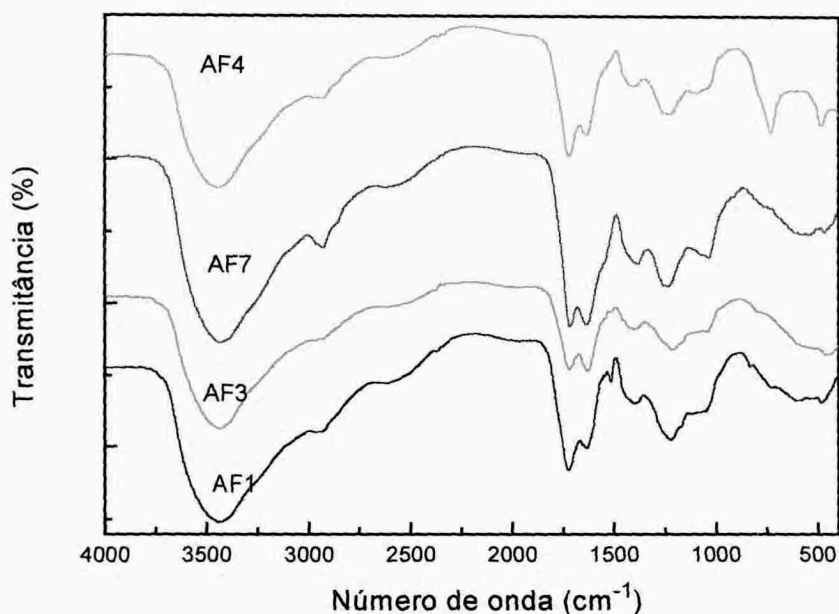


Figura 7. Espectros de Infravermelho de ácidos fúlvicos referente as estações 4,7,3,1 (mapa da Lagoa do Peri, página 9).

Os espectros de IV para os AF (FIG.7), apresentam uma maior intensidade em relação aos AH na região de 1700 cm^{-1} devido ao estiramento C=O dos grupamentos dos ácidos carboxílicos os quais são mais abundantes nestes compostos.

4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) baseia-se na obtenção de uma imagem formada por um feixe de elétrons. Esta técnica tem sido empregada, principalmente, em estudos sobre a morfologia dos AF e AH e

sobre os efeitos do meio (concentração da amostra, pH, força iônica da solução), na mudança conformacional dessas macromoléculas.

Nas FIGS. 8 A e 8 B pode-se observar as fotos de MEV com a formação de agregados (empacotada).

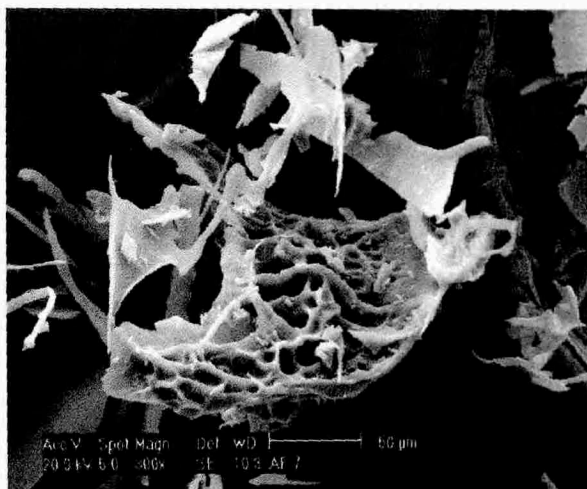
É importante salientar que o aspecto de fibras também observado neste trabalho é usado para descrever a aparência morfológica das SH para a MEV, após a passagem da SH na resina de troca iônica, seguida do processo de congelamento e liofilização provavelmente diferenciando-se da estrutura original no sedimento. Nas condições aqui usadas as soluções foram congeladas quando estavam a pH 2. Chen & Schnitzer (1976) observaram que a pH 2,0 os AF e AH consistem de macromoléculas unidas formando um agregado, exibindo a forma de fibras e/ou feixe de fibras. Com a elevação do pH do meio até 4,0 estas fibras tendem a ficar mais finas, e o aspecto de feixes mais evidente. Em pH alcalino as substâncias húmicas tornam-se amorfas, ou mais próximas de uma estrutura em lâminas.

Os AF apresentam um aspecto mais fibroso, já os AH apresentam uma característica mais empacotada, evidenciando-se assim diferenças no comportamento morfológico dos mesmos. Levando-se em consideração que os AH são mais ricos em *estruturas aromáticas* os mesmos poderiam estar relacionados a uma *estrutura mais empacotada*.

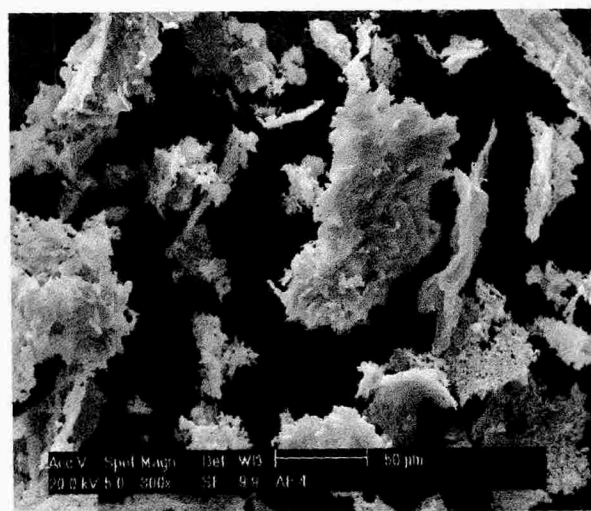
Algumas amostras de AF apresentaram na MEV interações com a fração mineral do solo (FIG. 8 C). Nestes casos os AF mostraram fraturas e interações com frações minerais do solo o que está de acordo com os baixos valores de carbono (menores que 20%) nos AF das estações 1,3,4.



(A)



(B)



(C)

Figura 8. Micrografias dos AH (A) e AF (B e C). Ampliação 300x

5. CONCLUSÃO

A análise espectroscópica de infravermelho das SH da Lagoa do Peri mostrou que os principais grupos funcionais típicos dessas substâncias estão presentes. A maior solubilidade dos AF deve-se principalmente aos grupos carboxílicos evidenciados nos espectros de IV dos mesmos.

Na análise elementar pode-se constatar que as SH da Lagoa do Peri possuem características diferenciadas de ambientes terrestres e aproximando-se de ambientes aquáticos.

As SH extraídas da Lagoa do Peri possuem um comportamento particular devido as condições do meio em constante renovação influenciado pelos principais canais que drenam a lagoa (Ribeirão do Peri, Cachoeira Grande) e o fluxo interno na lagoa. Portanto, um material pouco humificado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, Y. e Schnitzer, M., Electron microscopy of a húmic acid and a fulvic acid and its metal and clay complexes. *Soil Science Society of America Journal*. Madison. 40: 682 - 686. 1976

FLORENCE, T. M.; Powel, H.K.J.; Stauber, J.L. e Town, R.M., Toxicity of lipid-soluble copper (II) complexes to the marine : amelioration by humic substances. *Wat.Res.* 26: 1187-1193. 1992

NISSENBAUM, A.; Baedecker, M.J.; Kaplan, I.R., Studies on dissolved organic matter from interstitial waters of reducing marine . *Advances in Organic Geochemistry*. p 427-440. 1972.

PINHEIRO, L.B.A., Estudo da macrofauna de solos cultivados com cana-de-açúcar, sob diferentes manejos de colheita crua e queimada. *Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo)* - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

RASHID, M.A., *Geochemistry of Marine Humic Compound*, New York, p300. 1985.

RASHID, M.A., King, L.H., Major oxygen-containing functional groups present in humic and fulvic acid fraction isolated from contrasting marine environments. *Geochimica et Cosmochimica acta*. 34: 293-201. 1970.

RICCA, G.; Frederico, L.; Astori, C. e Gallo, R., *Geoderma*. 57: 193. 1993.

SAAR, R. A. e Weber, J. H., Fulvic Acid: Modifer of Metal-ion Chemistry, *Eviron. Sci. Technol.* 16: 866 - 872. 1982.

SAMANIDON, V.; Papadoyamis, I. e Vasilikiotis, G., Mobilization Of Heavy Metals from River Sediments of Northern Greece, by Humic Substance, *J. Environ. Sci. Health*. 126: 1055 - 1068. 1991.

SASTRIQUES, F.O., La materia orgánica de los suelos y el humus de los suelos de Cuba. Havana: *Ed. academia de Ciencias de Cuba*. p.136. 1982.

SCHNITZER, M., Humic Substances: Chemistry and Reactions. *Soil Organic. Amesterdam*, 1- 64. 1978.

SENESI, N.; Miano, T.M.; Provenzano, M.R. e Bruneti; G., Spectroscopic and Comparational Comparative Characterization of I.H.S.S.. Reference Standard Fulvic and Humic Acid of Various Origins. *Sci. Total Environ.*, 81/82, p.143 - 156. 1989.

SENESI, N.; Rizzi, F.R.; Delino, P., Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH and time. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 60: 1773 - 1778. 1996.

STEVENSON, F.J., *Humus Chemistry - genesis, composition, reaction*. 2.ed. New York: John Willey, p.496. 1994.

STEVENSON F.J. e Goh K.M., Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochm.cosmochim. Acta* 35: 471 - 483. 1971.

STEVENSON, F.J., *Humus Chemistry, Genesis Composition and Reaction*, New York. 1982.

SUNDA, G. W. e Lewis, J.A.M., Effect of complexation by natural organic ligantes on the toxicity of copper to a unicelular alga, *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 870 - 876. 1978.