

PROPRIEDADES REDOX E GRUPOS FUNCIONAIS DE ÁCIDOS HÚMICOS ISOLADOS DE ADUBOS ORGÂNICOS⁽¹⁾

Marihus Altoé Baldotto⁽²⁾, Luciano Pasqualoto Canellas⁽³⁾, Maria Cristina Canela⁽⁴⁾, Marcelo Luiz Simões⁽⁵⁾, Ladislau Martin-Neto⁽⁵⁾, Maurício Paulo Ferreira Fontes⁽⁶⁾ & Ary Carlos Xavier Velloso⁽³⁾

RESUMO

Dependendo das condições do sistema, os ácidos húmicos podem atuar como oxidantes ou redutores. Nos sistemas naturais, o fluxo de elétrons está diretamente associado à quantidade e à qualidade do húmus. O potencial do eletrodo e a capacidade de oxidação informam sobre os fatores intensidade e capacidade dos sistemas redox, respectivamente. Estudos prévios têm aventado a hipótese de que radicais livres nos ácidos húmicos participam dessas reações redox. No presente estudo, seis ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos foram titulados com um oxidante (I_2) em atmosfera inerte e condições especificadas. Os ácidos húmicos apresentaram valores do potencial formal-padrão do eletrodo semelhantes: entre 0,773 e 0,794 V a 25 °C. A capacidade de oxidação dos ácidos húmicos variou de 3,88 a 4,39 mol_c kg⁻¹ a pH 5,0 e de 5,35 a 7,89 mol_c kg⁻¹ a pH 7,0. Foi observada correlação positiva e significativa entre a capacidade de oxidação dos ácidos húmicos e as suas concentrações de grupos funcionais fenólicos, quinonas e semiquinonas.

Termos de indexação: química do solo, substâncias húmicas, potencial redox, capacidade de oxidação, humificação.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Trabalho financiado pelo CNPq e pela FAPERJ. Recebido para publicação em setembro de 2006 e aprovado em fevereiro de 2007.

⁽²⁾ Pesquisador do Laboratório de Solos (LSol) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF. Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ). Bolsista Pós-DOC da FAPERJ. E-mail: marihus@uenf.br

⁽³⁾ Professor do LSol do CCTA da UENF. Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ). Bolsista do CNPq. E-mails: canellas@uenf.br; velloso@uenf.br

⁽⁴⁾ Professora do Laboratório de Ciências Químicas (LCQui) do Centro de Ciências e Tecnologias (CCT) da UENF. Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ). Bolsista do CNPq. E-mail: mccanela@uenf.br

⁽⁵⁾ Pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970 São Carlos (SP). Bolsista do CNPq. E-mails: marcelo@cnpdia.embrapa.br; martin@cnpdia.embrapa.br

⁽⁶⁾ Professor do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa - UFV. Av. PH Rolfs s/n, CEP 36571-000 Viçosa (MG). Bolsista do CNPq. E-mail: mpfontes@ufv.br

SUMMARY: REDOX PROPERTIES AND FUNCTIONAL GROUPS OF HUMIC ACIDS ISOLATED FROM ORGANIC RESIDUES

According to the system conditions, humic acids act as oxidants or as reductants. In natural systems the electron flow is directly associated with humus content and quality. Electrode potential and oxidation capacity inform about the intensity and capacity of the redox systems. In previous studies it has been assumed that free radicals participate in humic acid redox reactions. In our study six humic acids isolated from composed organic residues were titrated with an oxidant (I_2) in inert atmosphere and specified conditions. Humic acids presented similar standard formal electrode potentials, with values between 0.773 and 0.794 V, at 25 °C. The oxidation capacity of humic acids varied from 3.88 to 4.39 mol_e kg⁻¹ at pH 5.0 and from 5.35 to 7.89 mol_e kg⁻¹ at pH 7.0. Positive and significant correlations were observed between the oxidation capacity and the concentrations of the phenolic, quinone and semiquinone functional groups in the humic acids.

Index terms: soil chemistry, humic substances, redox potential, oxidation capacity, humification.

INTRODUÇÃO

O aumento e a estabilidade dos estoques de C no sistema solo reduzem a emissão de CO₂ para a atmosfera e o agravamento do efeito estufa, contribuindo com estratégias de desenvolvimento limpo. No solo, a estabilidade química do C ocorre com a formação de substâncias húmicas (SH), por meio de um processo genericamente denominado humificação. Esse processo pode ser estimado pelo aumento da concentração de radicais livres do tipo semiquinonas (CRLS) nos ácidos húmicos (AH), determinados por meio da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (Martin Neto et al. 1994a, b; Pérez et al., 2004). Com o avanço da humificação ocorre a policondensação e a conjugação de estruturas insaturadas nos AH (Piccolo, 2001). Grupamentos fenólicos formados durante o processo de decomposição da matéria orgânica são convertidos em quinonas, via reações de oxidação, as quais são precursoras de radicais livres do tipo semiquinonas nos AH (Milori et al., 2002; Budziak et al., 2004; Rivero et al., 2004), que se estabilizam com o avanço da humificação.

Os radicais livres do tipo semiquinonas dos AH são grupos doadores de elétrons e, por meio de titulações redox iodimétricas, podem ser oxidados pelo iodo (I_2). Dessa forma, tais titulações permitiriam, analogamente à RPE, estimar o grau de humificação dos AH. No entanto, nem toda a atividade redox dos AH pode ser atribuída a CRLS, sendo necessárias informações adicionais sobre a relação entre os diferentes grupos funcionais e o poder redutor dos AH (Helburn & MacCarthy, 1994; Matthiessen, 1995; Lovley et al., 1998; Scott et al., 1998; Struyk & Sposito, 2001).

Scott et al. (1998) e Lovley et al. (1996, 1998) estudaram a atividade redox dos AH e indicaram que os grupos quinonas são os principais responsáveis pela transferência de elétrons entre microrganismos, AH e espécies sólidas de Fe(III). Segundo o mecanismo indicado pelos autores, os radicais semiquinonas po-

dem originar-se quando grupos quinonas presentes nos AH são reduzidos, permanecendo estáveis no ambiente. Os grupos semiquinonas podem ser reduzidos a radicais hidroquinonas, ainda mais estáveis. Alternativamente, grupos fenólicos contidos nos AH também podem sofrer oxidação e formar radicais semiquinonas, que, se oxidados, podem resultar em benzoquinonas (Struyk & Sposito, 2001). Adicionalmente, o segundo mecanismo citado indica que parte da quantidade de elétrons transferíveis pelos AH é proveniente da oxidação do Fe(II) ligado a grupos fenólicos. Na reação, um agente oxidante, como o I_2 , recebe um elétron a partir do complexo AH-Fe(II), reduzindo-o a um grupo semiquinona (Struyk & Sposito, 2001). Dessa forma, a concentração de radicais livres de tipo semiquinona pode ser mantida pela "intra-oxidação" durante a titulação redox dos AH (Struyk & Sposito, 2001). Outros estudos verificaram a ocorrência da ligação entre o Fe(III) e moléculas orgânicas (Schwarzenbach et al., 1990; Martin-Neto et al., 1994 b), entre moléculas poluentes, como os compostos nitroaromáticos e metanos polialogenados, sendo o Fe(III) reduzido a Fe(II). Os autores sugerem que um ciclo similar seja esperado entre a matéria orgânica humificada e espécies de Fe.

A metilação dos AH com diazometano (CH₂N₂) converte grupos ácidos em R-OCH₃, que, no caso de SH, são denominados humatos de metila. Especificamente, grupos fenólicos e quinonas dos AH podem ser acetilados com anidrido acético em piridina, formando ésteres (Stevenson, 1994; Sachs et al., 2002). A titulação redox desses derivados metilados e acetilados permite verificar a participação dos grupos ácidos e dos resíduos de quinonas nas reações redox envolvendo AH.

As titulações redox de AH permitem estimar o potencial formal-padrão do eletrodo ($^{\circ}E_{H}$) e a capacidade de oxidação (COx), os fatores intensidade e capacidade da atividade de elétrons, respectivamente, análogos ao pH e a capacidade de neutralização para o caso de prótons (Sposito, 1989). O $^{\circ}E_{H}$ pode ser medido

utilizando-se um eletrodo combinado, constituído de um eletrodo sensível em contato com um eletrodo de referência. O eletrodo sensível responde à transferência de elétrons na semi-reação redox da espécie da qual se deseja medir o potencial, e o eletrodo de referência mantém seu potencial constante, gerando uma força eletromotriz (f.e.m.), que é resultante da diferença de potencial eletroquímico entre os dois eletrodos (Stumm & Morgan, 1996). O valor do $F E_H^0$ possibilita a determinação das atividades de oxidantes e redutores para um determinado par redox. A COX de uma substância pode ser utilizada na determinação da quantidade de elétrons transferíveis nas reações redox e é definida como o número de mols de carga por unidade de massa que um composto é capaz de transferir a um forte oxidante ($\text{mol}_e \text{ kg}^{-1}$).

Este estudo teve como objetivos determinar, por meio de titulações redox iodimétricas, a capacidade de AH isolados de adubos orgânicos, e de seus derivados químicos acetilados e metilados, transferirem elétrons e relacioná-la com a concentração de grupos funcionais carboxílicos, fenólicos, quinonas e semiquinonas presentes em sua estrutura.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de ácidos húmicos

Para isolamento dos AH, seis adubos orgânicos foram escolhidos: (a) vermicomposto; (b) composto de esterco de curral; (c) composto de esterco de aviário; (d) composto da mistura em partes iguais, de esterco de curral e de aviário; (e) composto de torta de filtro e (f) composto de resíduo orgânico de lixo domiciliar urbano.

O vermicomposto foi preparado a partir de esterco de curral e de minhocas vermelhas da Califórnia (*Eisenia foetida*). A coleta do material foi realizada 90 dias após a instalação das pilhas de esterco, o que corresponde a 45 dias depois de colocadas as minhocas. Os estercos de curral e de aviário foram coletados na "Fazendinha Agroecológica" da Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ. A torta de filtro e o lixo urbano foram amostrados, respectivamente, na Usina Paraíso, localizada no município de Campos dos Goytacazes-RJ e na Companhia de Limpeza Urbana (Comlurb) do município do Rio de Janeiro. A compostagem da matéria orgânica foi realizada conforme os procedimentos usuais adotados na "Fazendinha Agroecológica", que envolvem, principalmente, o controle diário da temperatura e o revolvimento semanal das pilhas durante a fase termófila.

Os AH foram isolados dos adubos orgânicos conforme as recomendações da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2006), usando-se NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob atmosfera de N_2 . Após agitação por 24 h, o material foi centrifugado a 5.000 g por 30 min. O sobrenadante foi coletado e o pH do extrato

foi imediatamente ajustado a 1,5 com HCl 6 mol L^{-1} . Depois de 18 h, a fração ácidos fúlvicos foi sifonada e descartada. O material remanescente (precipitado de AH) foi solubilizado em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e centrifugado a 5.000 g por 10 min, e o sobrenadante, descartado. A dissolução e a reprecipitação dos AH foi repetida por mais duas vezes. A seguir, o precipitado de AH foi solubilizado e permaneceu em HF + HCl 5 % por 48 h, visando à remoção de resíduos de minerais de argila e de íons paramagnéticos, sendo a seguir centrifugado a 5.000 g . Os AH foram lavados com 200 mL de HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, centrifugados a 5.000 g . A seguir, o precipitado de AH foi lavado com água destilada até teste negativo para Cl^- , usando-se AgNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e depois transferido para membranas de diálise de 10 mL (cut-off 14 KDa, Thomas Sci.). Após a diálise, até a obtenção de condutividade elétrica igual à da H_2O destilada ($1,0 \mu\text{S cm}^{-1}$), os AH foram liofilizados e armazenados em dessecador.

Derivados acetilados e metilados

Os AH isolados foram submetidos à derivação química por metilação e acetilação (Sachs et al., 2002). Os derivados acetilados foram obtidos após a reação com anidrido acético em presença de piridina, sob agitação magnética contínua à temperatura ambiente, durante uma semana. O processo de metilação de AH foi conduzido com diazometano (CH_2N_2), produzido a partir do reagente N-metil-N-nitrosotolueno-*p*-sulfonamida em éter etílico, na presença de metanol. O procedimento de metilação dos AH foi repetido por três vezes e finalizado quando a incorporação do diazometano aos AH foi completada, indicada pela coloração amarela do CH_2N_2 .

As reações de metilação e acetilação dos AH foram monitoradas por meio da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF), entre as faixas de 400 e $4.000 \text{ número de ondas cm}^{-1}$. Os espectros foram obtidos usando-se pastilhas com 1 mg de AH em 100 mg de KBr, em um aparelho Shimadzu 83000 (Stevenson, 1994).

Titulações redox

As titulações redox consistiram da oxidação dos AH estudados com I_2 (iodimetria), sob atmosfera inerte (Struyk & Sposito, 2001). Utilizou-se um frasco hermético (Figura 1), mantendo-se a temperatura do titulado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por meio de fluxo de água contínuo, proporcionado pelo acoplamento do frasco de titulação a um equipamento de "banho termostatizado" (Microquímica® Banho MQBCT 99-20).

Preparou-se a tampa do frasco para acomodar um eletrodo combinado para pH (peagâmetro Quimis Q400A) e um eletrodo redox combinado (Analyser 6A05-GK AgCl, Ag || Pt), além de um tubo para entrada de gás (Ar) e uma microbureta de 2 mL (Gilmont® GS-1200-A, com subdivisões de $2 \mu\text{L}$), usando-se silicone para vedação.

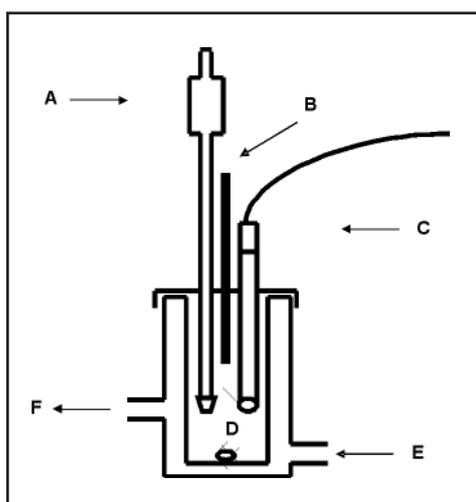


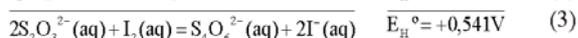
Figura 1. Esquema do equipamento de titulação redox. A: microbureta; B: tubo para entrada de Ar; C: eletrodo de Pt combinado (referência AgCl, Ag); D: agitador magnético; E e F: entrada e saída de água a 25 °C, respectivamente.

No preparo do titulado, adicionaram-se ao frasco de titulação 125 mL de solução-tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,05 mol L⁻¹ e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 mol L⁻¹) contendo KCl 0,05 mol L⁻¹ e, em seguida, ajustou-se o pH com HCl ou NaOH para pH 5,00 ou 7,00.

A solução foi agitada magneticamente e borbulhada com Ar por 60 min, para depleção de O₂. Acrescentou-se AH à solução para obter uma concentração em suspensão de 50 mg L⁻¹ (6,25 mg AH suspensos em 125 mL de solução-tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ com KCl 0,05 mol L⁻¹). Novamente, agitou-se e borbulhou-se a suspensão com Ar durante 30 min. Em seguida, ajustou-se o pH da suspensão para 5 ou 7 com HCl ou NaOH, para início da titulação.

Para cada titulação, calibrou-se o peagâmetro utilizando soluções-tampão a pH 4 e a pH 7. O eletrodo redox foi calibrado com solução-tampão redox férrico-ferrosa, preparada com sulfato ferroso amoniacal 0,100 mol L⁻¹, sulfato férrico amoniacal 0,100 mol L⁻¹ e H₂SO₄ 1,00 mol L⁻¹. A leitura da f.e.m._{cela} em 439 ± 2 mV indicou o correto funcionamento do eletrodo (Light, 1972).

Padronizou-se a solução de I₂, para cada titulação, utilizando tiosulfato de sódio, de acordo com as reações propostas por Bard et al. (1985):



Nas titulações utilizaram-se incrementos de 2 µL de solução 0,025 mol kg⁻¹ de I₂ (mol kg⁻¹ = molalidade, ou seja, o número de mols de I₂ por kg de solução) com densidade conhecida e, após cada incremento de

titulante, a solução foi agitada e borbulhada com Ar por mais 30 segundos, para facilitar a homogeneização do sistema. Em seguida, registrou-se a leitura da f.e.m._{cela} após cada adição de titulante, sempre quando a variação no aparelho foi menor ou igual a 2,0 mV min⁻¹. O ponto final da titulação redox de AH foi atingido quando valores constantes de f.e.m._{cela} foram registrados após a adição de oxidante.

As curvas de titulação redox foram obtidas relacionando-se num gráfico os valores de f.e.m._{cela} (eixo das ordenadas) de acordo com a CO_x dos AH (eixo das abscissas). O valor da CO_x foi determinado pelo número de mols de I₂ (aq) reduzidos a I⁻(aq) na reação por unidade de massa de AH (mol_c kg⁻¹), usando-se a equação (Struyk & Sposito, 2001):

$$\text{mol}_c \text{ kg}^{-1} = \frac{2 \text{ mol}_c}{\text{mol I}_2} \times \frac{\text{densidade da solução de I}_2 \times \text{molalidade da solução I}_2}{\text{Massa de AH}} \quad (4)$$

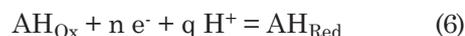
Determinou-se o ponto de inflexão de cada curva de titulação redox, obtendo-se a segunda derivada da função usando o software Origin[®]. No ponto de inflexão, a f.e.m._{cela} foi estimada por interpolação (Struyk & Sposito, 2001). Adicionalmente, realizaram-se titulações de amostras em branco, sem adição de AH.

Análise dos dados das titulações redox

Analisaram-se os dados obtidos com a titulação redox dos AH de acordo com estudo desenvolvido inicialmente por Struyk & Sposito (2001). Os valores de força eletromotriz (f.e.m._{cela}), medidos durante as titulações redox, foram relacionados com o potencial formal do eletrodo (^FE_H), de acordo com a equação:

$$\text{f.e.m.}_{\text{cela}} = {}^{\text{F}}E_{\text{H}}(\text{HA}_{\text{Ox}}, \text{HA}_{\text{Red}}) - E^{\circ}_{\text{H}}(\text{AgCl}, \text{Ag}) \quad (5)$$

em que E_H^o(AgCl, Ag) = 222 mV é o potencial-padrão do eletrodo de referência (AgCl, Ag a 25 °C) relativo ao eletrodo-padrão de hidrogênio e ^FE_H(HA_{ox}, HA_{red}) é o potencial formal de eletrodo da meia reação AH_{Ox}, AH_{Red}, que correspondem, respectivamente, às formas oxidada e reduzida de AH, de acordo com a reação de redução global:



No ponto de inflexão (Stumm & Morgan, 1996; Struyk & Sposito, 2001):

$$\text{f.e.m.}_{\text{cela}} = {}^{\text{F}}E^{\circ}_{\text{H}}(\text{AH}_{\text{Ox}}, \text{AH}_{\text{Red}}) - (q/n) 0,05916 \text{ pH} - E^{\circ}_{\text{H}}(\text{AgCl}, \text{Ag}) \quad (7)$$

na qual ^FE_H^o(AH_{ox}, AH_{red}) indica o potencial formal-padrão do eletrodo de AH.

A relação q/n indica o número de mols de prótons (q) por mols de elétrons (n) transferidos durante a oxidação de 1 mol de AH. Foi calculada utilizando-se os valores da f.e.m._{cela}, obtidos para dois valores de pH (5,0 e 7,0), por meio da equação:

$$-\frac{q}{n} = \frac{\Delta f.e.m.}{\Delta pH} \quad (8)$$

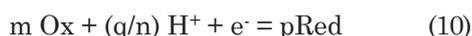
em que $\Delta f.e.m.$ é a variação da f.e.m._{cela} por unidade log de variação do pH (ΔpH) no ponto de inflexão da titulação.

De posse dos valores da relação q/n e da f.e.m._{cela} no ponto de inflexão, calculou-se o ${}^F E_H^o$ para a meia reação redox (AH_{Ox}, AH_{Red}), usando-se a equação 7.

O ${}^F E_H^o$ de cada amostra de AH foi convertido na constante de equilíbrio condicional, usando-se a seguinte relação (Stumm & Morgan, 1996):

$$\log K_c = \frac{{}^F E_H^o}{0,05916} \quad (9)$$

na qual K_c é a constante de equilíbrio condicional, a 298 K, correspondendo à reação de redução genérica para um elétron transferido (Struyk & Sposito, 2001):



O p_e para o par redox AH_{Ox}, AH_{Red} foi obtido conforme a equação (Stumm & Morgan, 1996):

$$p_e = \log K_c - (q/n) \text{ pH} \quad (11)$$

Determinação dos grupos funcionais

A determinação dos grupos funcionais ácidos dos AH foi realizada de acordo com Schnitzer & Gupta (1965). Determinou-se a acidez total e a carboxílica experimentalmente e, pela sua diferença, a acidez fenólica.

Para determinação da acidez total foram adicionados, em um erlenmeyer de 125 mL, 100 mg de AH e 20 mL de $Ba(OH)_2$ 0,125 mol L⁻¹. Simultaneamente, foi preparada uma amostra em branco. O ar do frasco foi trocado por N₂ através do borbulhamento por cinco minutos, e o sistema foi agitado por 24 h à temperatura ambiente (25 °C). A seguir, a suspensão foi filtrada e o resíduo lavado com água destilada livre de CO₂ (água fervida e resfriada para 25 °C). O excesso de $Ba(OH)_2$ da suspensão foi titulado potenciometricamente com HCl 0,5 mol L⁻¹, até pH 8,4.

A extração da acidez carboxílica (teor de grupos COOH) foi realizada com acetato de cálcio e determinada por titulação com hidróxido de sódio. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 100 mg de AH, 10 mL de $Ca(OAc)_2$ 1,0 mol L⁻¹ e 40 mL de água destilada livre de CO₂. Simultaneamente, foi preparado o teste em branco. Sob atmosfera de N₂, o sistema foi agitado por 24 h à temperatura ambiente. A seguir, a suspensão foi filtrada e o resíduo lavado com água destilada livre de CO₂. O ácido acético produzido pela reação do acetato com o H⁺ do grupo carboxílico foi titulado com NaOH 0,1 mol L⁻¹,

previamente padronizado com biftalato de potássio, até pH 9,8.

A concentração de grupos quinonas nos AH foi estimada pelo método da redução a hidroquinona, usando-se o cloreto de estanho (II) em meio alcalino como redutor, conforme Schnitzer & Riffaldi (1972). Adicionaram-se ao frasco 20 mg de AH, 0,2 mL de etanol e 10 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ sob agitação constante até a solubilização. Em seguida, foram adicionados 20 mL de NaOH 2,5 mol L⁻¹ e 10 mL de SnCl₂ 6H₂O 0,05 mol L⁻¹ e o frasco foi fechado. Procedeu-se à reação por uma hora sob agitação constante e sob atmosfera inerte de N₂. O excesso do redutor (Sn²⁺) foi titulado potenciometricamente, usando-se o Cr₂O₇²⁻ como oxidante, a partir da solução titulante K₂Cr₂O₇ 0,05 mol L⁻¹.

Os espectros de RPE foram obtidos à temperatura ambiente, usando um espectrômetro Bruker EMX 9 GHz, conforme Martin-Neto et al. (1994a, b). Para obtenção das áreas dos sinais foi utilizada a aproximação $I \times (\Delta H_{pp})^2$ (Poole, 1967), em que I é a intensidade do sinal e ΔH_{pp} é a largura deste, tomada de pico a pico. Na determinação da CRLS utilizou-se o método do padrão secundário com um cristal de rubi e o padrão *strong pitch* da Bruker com concentração de radicais livres (spins g⁻¹) conhecida. As condições experimentais foram: potência das microondas de 0,1 mW, determinada por saturação de potência; frequência de modulação de 100 kHz; amplitude de modulação de 0,1 mT; constante de tempo de 2,56 ms; e tempo de conversão de 10,24 ms. As análises foram realizadas com, no mínimo, oito varreduras por determinação.

Resíduos de Fe

A presença de resíduos de Fe nos AH foi detectada usando-se energia dispersiva de raios X acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (MEV-ESEM 962–Zeiss). Obtiveram-se os seguintes espectros: geral (presença do elemento) e pontual (localização do elemento) do campo analisado (Vidal-Torrado et al., 2006).

Análises estatísticas

Estimaram-se o erro-padrão da média para cada variável experimental e a correlação linear de Pearson entre a capacidade de oxidação e a concentração de grupos funcionais dos AH. As estimativas dos coeficientes de correlação foram submetidas ao teste F a 1 e 5 % (Steel & Torrie, 1960).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Potencial do eletrodo

As curvas de titulação potenciométrica dos AH foram semelhantes às obtidas por Struyk & Sposito (2001), usando três amostras-padrão de AH da IHSS. Um exemplo de curva de titulação redox iodimétrica encontra-se na figura 2.

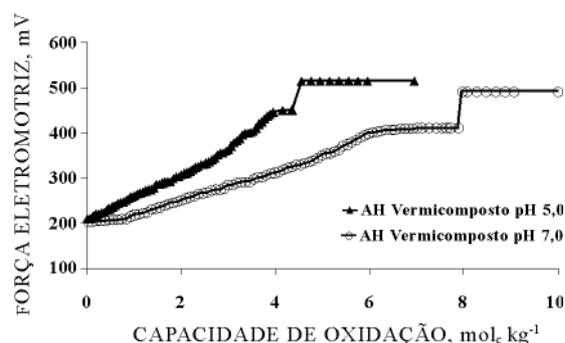


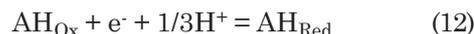
Figura 2. Titulações redox de 6,25 mg de ácido húmico (AH), suspenso em KCl 0,05 mol L⁻¹ e solução-tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, a pH 5,00 e 7,00.

Foi possível observar um nítido ponto de inflexão nessas curvas de titulação, que apresentaram a variação característica da f.e.m._{cela} com a depleção do redutor e adição de oxidante, e, também, uma região com pequena variação da f.e.m._{cela}. Assumiu-se a inflexão da curva como o ponto final da titulação potenciométrica. Segundo Struyk & Sposito (2001), a pequena variação da f.e.m._{cela} está associada à presença de resíduos de Fe(II) nos AH, não removidos mesmo após o processo de purificação recomendado pela IHSS.

Os dados das titulações redox dos AH revelaram diminuição média de 40 mV na f.e.m._{cela} com o aumento do pH de 5,0 para 7,0 (Quadro 1). Essa tendência foi observada por Struyk & Sposito (2001) e por Matthiessen (1995). A equação 7, apresentada anteriormente, indica que a f.e.m._{cela} varia inversamente com o pH do sistema redox. Todos os AH isolados no presente trabalho transferiram ao I₂(aq), na reação de oxidação, aproximadamente um próton para

cada três elétrons, ou seja, a relação q/n foi igual a 0,33. Esse valor médio também foi observado por Struyk & Sposito (2001) para amostras-padrão de AH da IHSS.

Considerando a reação redox entre AH_{Red} e I₂, com a relação q/n de aproximadamente 0,33 (1/3 de H⁺ por e⁻ transferido), os resultados permitem supor que o par redox AH_{Ox}, AH_{Red} resulte na reação de redução genérica dependente do pH:



No presente estudo, os valores de $^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$ para a semi-reação de redução dos AH isolados dos adubos orgânicos foram semelhantes e, em média, iguais a 0,782 V. Struyk & Sposito (2001), usando três amostras de AH obtidas de solo e de sedimentos, observaram valores de $^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$ próximos a 0,780 V. Ambos os trabalhos usaram o I₂ como oxidante. Os AH estudados apresentaram $^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$ e log K_c análogos aos de compostos o-quinona (Helburn & MacCarthy, 1994). No entanto, diferenciam-se pela mais ampla relação q/n verificada nos grupos o-quinona (1,00) em relação aos AH (0,33).

A comparação entre os valores das propriedades redox de alguns pares comuns nos sistemas naturais (Quadro 2) permitiu alocar o par redox AH_{Ox}, AH_{Red}, com a média de $^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ} \sim 0,782$ V, na “seqüência redox” indicada por Stumm & Morgan (1996). Os resultados apresentados confirmaram que os AH podem reduzir Hg(II) e Mn(IV), conforme observaram, respectivamente, Alberts et al. (1974) e Sunda & Kieber (1994), incubando tais íons metálicos com bactérias redutoras e AH.

Introduzindo os dados médios dos AH estudados no diagrama pe vs pH adaptado de Bartlett & James (1993), contendo os dados das amostras-padrão de AH

Quadro 1. Capacidade de oxidação (CO_x) e potencial formal-padrão do eletrodo ($^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$) de ácidos húmicos

Ácido húmico	CO _x		f.e.m. _{cela}		q/n	$^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$	log K _c	pe _c
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7				
	———— mol _c kg ⁻¹ ————		———— mV ————			V		
Vermicomposto	4,39 ± 0,05	7,89 ± 0,09	451 ± 3	411 ± 5	0,34	0,773	13,1	10,7
Torta de Filtro	4,20 ± 0,04	6,23 ± 0,06	459 ± 5	420 ± 3	0,33	0,779	13,2	10,9
Esterco de Curral	4,25 ± 0,07	7,35 ± 0,09	460 ± 4	421 ± 5	0,33	0,780	13,2	10,9
Esterco de Aviário	4,35 ± 0,05	7,64 ± 0,08	465 ± 2	425 ± 4	0,34	0,787	13,3	10,9
Curral + Aviário	4,28 ± 0,06	6,99 ± 0,09	455 ± 2	415 ± 6	0,33	0,777	13,1	10,8
Lixo Urbano	3,88 ± 0,05	5,35 ± 0,05	472 ± 3	432 ± 4	0,34	0,794	13,4	11,0

As médias dos valores determinados experimentalmente para a CO_x e a f.e.m._{cela} estão acompanhadas pelo seu erro-padrão. As demais variáveis foram calculadas como descrito na seção Material e Métodos.

Quadro 2. Propriedades redox de alguns pares comuns em sistemas naturais

Pares redox	E_H°	log K_c	pe_c ⁽¹⁾ (pH5)	pe_c (pH7)
	V			
$\frac{1}{2} MnO_2 (s) + 2H^+ + e^- = \frac{1}{2} Mn^{2+} (aq) + H_2O$	0,76	12,8	12,8	8,8
$Fe(OH)_2^+ (aq) + e^- + H^+ = Fe^{2+} (aq) + H_2O$	0,90	15,2	10,2	8,2
$\frac{1}{2} Hg^{2+} (aq) + e^- = Hg^0 (g)$	0,85	14,4	14,4	14,4
$AH_{ox} + 1/3 H^+ + e^- = AH_{red}$	0,78	13,2	11,5	10,9
$FeOOH (s) + e^- + 3H^+ = Fe^{2+} (aq) + H_2O$	0,77	13,0	2,0	-4,0
$Fe^{3+} (aq) + e^- = Fe^{2+} (aq)$	0,77	13,0	13,0	13,0

⁽¹⁾ Os valores de pe foram calculados usando-se os valores de $\log K_c$, concentração de redutores e oxidantes = $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de espécies solúveis, atividade das fases sólidas iguais a 1 e $P_{O_2} = 0,21 \text{ atm}$. Os valores em negrito são as médias dos dados obtidos com os ácidos húmicos (AH) isolados dos adubos orgânicos.

da IHSS (Struyk & Sposito, 2001), foi possível obter informações sobre a atividade das suas espécies (AH_{Ox} , AH_{Red}) nos sistemas naturais (Figura 3). De acordo com o diagrama pe vs pH , assumiu-se que todos os AH estudados predominavam na forma AH_{Red} , podendo atuar como doadores de elétrons nas reações redox ocorrentes nos sistemas naturais. Assim, o Fe^{3+} solúvel seria uma espécie termodinamicamente favorável à redução por AH, embora $Fe(OH)_2^+$ possa ser a espécie predominante em solução a pH entre 5 e 7, respectivamente. Como o par redox Fe^{2+} , $FeOOH$ está abaixo do par redox $AH_{Ox, Red}$ entre os valores de pH 5 e 7, $FeOOH$ e AH_{Red} poderiam predominar termodinamicamente. Segundo Lovley et al. (1996, 1998) e Scott et al. (1998), os AH poderiam mediar a redução microbiana de $Fe(III)$ a partir da fase sólida. Se bactérias redutoras podem acessar $Fe(III)$ em óxidos como, por exemplo, os da espécie $FeOOH$ (Lovley et al., 1996, 1998, 2000; Scott et al., 1998), é possível que após a redução microbiana os AH apresentem potencial abaixo do determinado no presente estudo (na ausência de microrganismos).

Capacidade de oxidação

As titulações realizadas a pH 7,0 resultaram em incrementos médios na CO_x dos AH de 64 % sobre os valores a pH 5,0, indicando que tal propriedade foi dependente do pH . Esses resultados são corroborados pelos estudos de Szilágyi (1973) e de Struyk & Sposito (2001). O aumento da CO_x com o pH pode ser entendido de acordo com a equação 6.

A origem dos adubos orgânicos também modificou a CO_x dos AH, que variou entre 3,88 e 4,39 $\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$ nas titulações redox a pH 5,0 e de 5,35 a 7,89 $\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$ a pH 7,0. Struyk & Sposito (2001), em três amostras-padrão da IHSS, encontraram CO_x variando de 1,09 a 6,5 $\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$ e 3,30 a 11,50 $\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$, nas titulações a pH 5,0 e 7,0, respectivamente. Matthiessen (1995), em amostras de AH sintético e usando o I_2 como

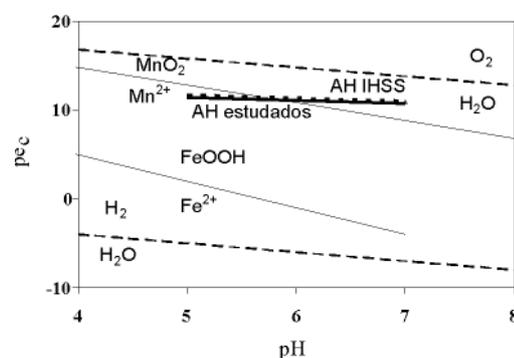


Figura 3. Diagrama pe vs pH , mostrando pares redox comuns em sistemas naturais e AH isolados de adubos orgânicos e de amostras-padrão da IHSS (Struyk & Sposito, 2001). Adaptado de Bartlett & James (1993).

oxidante, encontrou valores médios de 7,5 $\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$ a pH 5,0 e de 10,5 $\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$ a pH 7,0.

Os valores da CO_x dos AH decresceram na ordem: vermicomposto > esterco de curral e de aviário > torta de filtro > lixo urbano. Essa diminuição da CO_x foi acompanhada pelo decréscimo das concentrações de grupos funcionais (Quadro 3).

Grupos funcionais

A correlação entre a CO_x e a concentração de grupos funcionais semiquinonas (0,97 a pH 5 e 0,99 a pH 7), quinonas (0,96 a pH 5 e 0,98 a pH 7) e fenólicos (0,92 a pH 5 e 0,99 a pH 7) dos AH foi positiva e significativa ($P \leq 0,01$). Não se verificou, entretanto, correlação com a concentração de grupos carboxílicos.

Scott et al. (1998) obtiveram correlações positivas e significativas entre a CO_x determinada na presença de microrganismos e a concentração de quinonas de AH. Helburn & MacCarthy (1994) atribuíram os valores obtidos de CO_x nas titulações redox de AH

Quadro 3. Concentração de grupos funcionais em ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos

Ácido húmico	Grupos funcionais ⁽¹⁾			
	Carboxílicos	Fenólicos	Quinonas	Semiquinonas
	cmol _c kg ⁻¹			(×10 ¹⁷) spins g ⁻¹
Vermicomposto	304 ± 2,53	385 ± 2,87	105 ± 0,96	3,13 ± 0,09
Torta de Filtro	351 ± 3,11	294 ± 1,54	94 ± 0,84	2,53 ± 0,06
Esterco de Curral	299 ± 2,39	320 ± 1,82	99 ± 0,91	2,89 ± 0,08
Esterco de Aviário	318 ± 3,08	335 ± 2,01	104 ± 0,98	3,01 ± 0,08
Curral + Aviário	302 ± 2,15	310 ± 1,77	101 ± 0,89	2,67 ± 0,07
Lixo Urbano	322 ± 2,61	98 ± 0,89	88 ± 0,78	1,95 ± 0,06

⁽¹⁾ As médias experimentais estão acompanhadas pelo seu erro-padrão.

sintéticos à presença de grupos fenólicos, dada a estreita relação com a acidez fenólica dos AH estudados. Struyk & Sposito (2001) não estimaram as correlações, mas sugeriram a relação entre a COx e a concentração de grupos funcionais semiquinonas dos AH. Todos os trabalhos supracitados também relataram a ausência de correlação entre a concentração de grupos carboxílicos e a COx dos AH.

Struyk & Sposito (2001) estimaram as contribuições de grupos funcionais semiquinonas no poder redutor dos AH e concluíram que os valores da COx dos três AH estudados não foram suficientemente explicados pela CRLS. Seguindo a estimativa apresentada por Struyk & Sposito (2001), as titulações redox dos AH isolados dos adubos orgânicos também resultaram em valores de COx superiores à potencial contribuição da CRLS, determinada por RPE. Para exemplificar, usou-se a CRLS do AH isolado do vermicomposto, igual a 4,64 10¹⁷ spins g⁻¹. Esses radicais livres contribuiriam com uma fração de aproximadamente 7,71 10⁻⁴ mol_c (kg AH)⁻¹, aquém da COx determinada, igual a 7,89 mol_c kg⁻¹. Dados indiretos sobre o poder redutor dos AH, obtidos a partir da medição das espécies reduzidas de metais como o Fe (Wilson & Weber, 1979; Scott et al., 1998), após incubação com microrganismos e AH, indicaram que a CRLS poderia ser responsável por no máximo 10 % da quantidade de elétrons transferidos. Os resultados permitem inferir as contribuições de grupos quinonas e fenólicos dos AH na sua capacidade de transferência de elétrons.

Dois mecanismos, anteriormente usados na interpretação da capacidade redox das SH, podem, concomitantemente, explicar a alta correlação (0,97 a pH 5 e 0,99 a pH 7, P ≤ 0,01) obtida entre a COx e a CRLS dos AH, considerando também as relações da COx com grupos quinonas e fenólicos: (a) a redução de grupos quinonas e fenólicos a semiquinonas - proposta por Scott et al. (1998); e (b) a oxidação

iodimétrica do complexo Fe-grupos fenólicos dos AH, gerando radicais livres semiquinonas - propostos por Struyk & Sposito (2001). Adicionalmente, o sinal de RPE desaparece com as reações citadas por Scott et al. (1998) para a formação das espécies hidroquinonas e benzoquinonas a partir de semiquinonas, durante a titulação redox. Apesar de não serem determinados por RPE, esses radicais podem ter sido oxidados pelo I₂ nas condições especificadas no presente estudo, contribuindo para o aumento dos valores da COx dos AH.

Derivados metilados e acetilados

As curvas de titulação potenciométrica foram drasticamente modificadas pela metilação e acetilação dos AH (Figura 4). Esses processos reduziram em 94 % a COx dos AH, permitindo mostrar a importante contribuição dos grupos fenólicos e quinonas livres na transferência de elétrons nos AH.

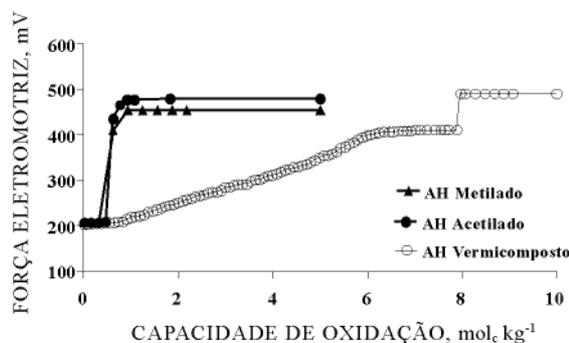


Figura 4. Titulações redox de 6,25 mg de ácido húmico e de 6,25 mg de seus derivados obtidos por metilação e acetilação, suspensos em 125 mL de KCl 0,05 mol L⁻¹ e solução-tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, a pH 7,00.

O monitoramento das reações de metilação e de acetilação dos AH, realizado por meio da espectroscopia na região do IV (Figura 5), indicou que a metilação dos AH converteu grupos oxigenados em ésteres. A acetilação “bloqueou” os grupos fenólicos e quinonas livres. Os espectros de IV-TF mostraram que a intensidade de absorção em $1.735\text{--}1.742\text{ cm}^{-1}$ aumentou consideravelmente com a metilação dos AH. A absorção, devido ao estiramento C-H ($2.927\text{--}2.942\text{ cm}^{-1}$), foi também aumentada pela metilação e acetilação.

Os resultados das titulações redox dos derivados metilados e acetilados dos AH indicaram que, em média, 6 % da COx poderia ser atribuída, por exemplo,

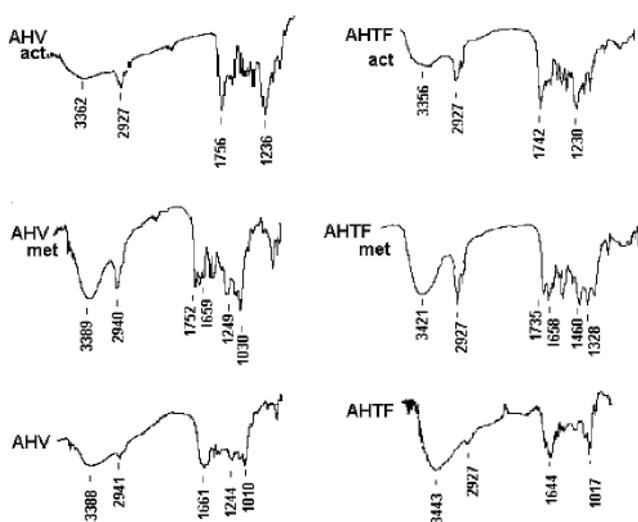


Figura 5. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier e atribuições das regiões de absorção (número de onda, cm^{-1}) para os ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AHV) e seus derivados metilados (AHVmet) e acetilados (AHVact) e de torta de filtro (AHTF) e seus derivados metilados (AHTFmet) e acetilados (AHTFact).

ao mecanismo do Fe(II) ligado aos AH. Struyk & Sposito (2001), com base na concentração de cinzas de amostras-padrão de AH da IHSS, estimaram a participação do Fe na COx dos AH. Os autores consideraram um teor de cinzas nos AH de 3,10 %. Assim, usando os 6,25 mg de AH das titulações e assumindo que a espécie Fe_2O_3 determinava toda a concentração de cinzas, indicaram que aproximadamente $0,14\text{ mol kg}^{-1}$ de Fe estava presente nos AH. Cada mol de Fe(II) pode transferir 1 mol_e para o I_2 . Sendo a média da COx das amostras-padrão de AH estudadas por Struyk & Sposito (2001) igual a $6,91\text{ mol}_e\text{ kg}^{-1}$ a pH 7,0, a porcentagem indicada de Fe resultou na COx de $0,41\text{ mol}_e\text{ kg}^{-1}$.

Nos AH dos adubos orgânicos foi detectada a presença de resíduos de Fe, por meio da microscopia eletrônica de varredura (Figura 6). De posse dos resultados da microscopia analítica, indicando a presença de Fe nos AH, usou-se o procedimento apresentado por Struyk & Sposito (2001) para estimar a participação do Fe na capacidade de oxidação dos AH isolados dos adubos orgânicos. As amostras estudadas apresentaram, em média, 3,6 % de cinzas, indicando que esses AH poderiam apresentar COx proveniente do Fe(II), com magnitude de aproximadamente $0,17\text{ mol}_e\text{ kg}^{-1}$. Os teores de cinza dos AH variaram de 3,45 a 3,82 % e correlacionaram-se com a COx em ambos os valores de pH ($r = 0,89$ a pH 5 e $r = 0,97$ a pH 7, $P \leq 0,01$). Dessa forma, sendo ambas as estimativas citadas convergentes e provindo de diferentes formas de aproximação, admitiu-se sua semelhança.

Assumindo-se que o $\text{Fe}_{\text{H}}^{\text{O}}$ do par redox AH_{Ox} , AH_{Red} defina o seu poder redutor e a COx a quantidade de elétrons transferíveis, a soma das contribuições dos grupos semiquinonas dos AH, já presentes ou alterados durante a titulação, poderia explicar a magnitude dos valores de COx encontrados. A relação direta entre a COx e a CRLS indica a oxidação desses radicais pelo I_2 , possibilitando estimar o seu grau de humificação.

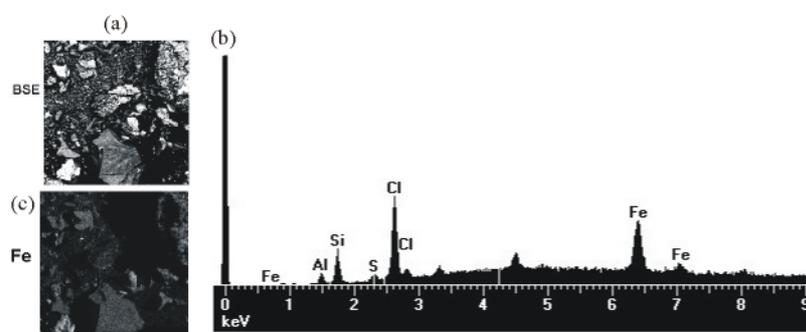


Figura 6. Presença de ferro em ácido húmico (AH) isolado de vermicomposto, obtida por microscopia eletrônica de varredura. (a) imagem em *backscattered* elétrons (BSE) da amostra de AH; (b) espectro obtido por microscopia analítica, utilizando detector de energia dispersiva de raios X, indicando a presença de ferro no AH; (c) distribuição do ferro na amostra de AH.

CONCLUSÕES

1. Os valores do $F_{E_H}^0$ para a semi-reação de redução do par redox AH_{Ox} , AH_{Red} foram semelhantes entre os AH estudados, sendo, em média, de 0,782 V.

2. A CO_x dos AH variou com o pH do sistema e com o tipo de resíduo orgânico estudado, sendo de 3,88 a 4,39 mol_c kg⁻¹ a pH 5,0 e de 5,35 a 7,89 mol_c kg⁻¹ a pH 7,0.

3. As reações de derivação química por metilação e acetilação reduziram drasticamente e de forma semelhante a CO_x dos AH.

4. Os AH com maiores teores de grupos fenólicos, quinonas e semiquinonas apresentaram CO_x mais elevada.

5. Foi possível prever a CRLS, bem como o grau de humificação dos AH estudados, a partir da sua CO_x .

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Fábio Lopes Olivares (Prof. do Laboratório de Biociências e Biotecnologia-UENF) e Carlos Roberto Matos (Laboratório de Ciências Químicas-UENF), pelas análises microscópicas e reações de metilação, respectivamente. Aos Profs. Gabriel de Araújo Santos (Departamento de Solos-UFRRJ) e Nelson Garcés Pérez (Facultad de Agronomía de la UNAH, Cuba), pelas valiosas sugestões ao trabalho.

LITERATURA CITADA

- ALBERTS, J.J.; SCHINDLER, J.E. & MILLER, R.W. Elemental mercury evolution mediated by humic acid. *Science*, 184:895-896, 1974.
- BARD, A.; PARSON, R. & JORDAN, J., eds. Standard potentials in aqueous solution. New York, Marcel Dekker, 1985. 185p.
- BARTLETT, R.J. & JAMES, B.R. Redox chemistry of soils. *Adv. Agron.*, 50:151-208, 1993.
- BENZ, M.; SCHINK, B. & BRUNE, A. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ.*, 64:4507-4512, 1998.
- BUDZIAK, C.R.; MAIA, C.M.B.F. & MANGRICH, A.S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. *Química Nova*, 27:399-403, 2004.
- CHEN, Y.; SENESI, N. & SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratio. *Soil Sci. Am. J.*, 41:352-358, 1977.
- HELMBURN, R.S. & MACCARTHY, P. Determination of some redox properties of humic acids by alkaline ferricyanide titration. *Anal. Chem. Acta*, 295:263-272, 1994.
- INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY - IHSS. Products. Disponível em: <<http://www.ihss.gatech.edu/products.html>> Acesso em 20 Jul. 2006.
- LIGHT, T.S. Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chem.*, 44:1038-1039, 1972.
- LOVLEY, D.R.; COATES, J.D.; BLUNT-HARRIS, E.L.; PHILLIPS, E.J.P. & WOODWARD, J.C. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382:445-448, 1996.
- LOVLEY, D.R.; KASHEFI, K.; VARGAS, M.; TOR, J.M. & BLUNT-HARRIS, E.L. Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms. *Chem. Geol.*, 169:289-298, 2000.
- LOVLEY, D.R.; WOODWARD, J.C.; BLUNT-HARRIS, E.L.; HAYES, L.; PHILLIPS, E.J.P. & COATES, J.D. Humic substances as mediator for microbially-catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 26:152-157, 1998.
- MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A.E. & TRAGHETTA, D. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol. *Soil Sci.*, 157:365-372, 1994a.
- MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, E.M. & SPOSITO, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. *Environ. Sci. Technol.*, 28:1867-1873, 1994b.
- MATTHIESSEN, A. Determining the redox capacity of humic substances as a function of pH. *Vom Wasser*, 84:229-235, 1995.
- MILORI, D.M.B.P.; MARTIN NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUCK, J. & BAGNATO, V.S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, 167:739-749, 2002.
- PÉREZ, M.G.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S.C.; NOVOTNY, E.H.; MILORI, D.M.B.P.; BAGNATO, V.S.; COLNAGO, L.A.; MELO, W.J. & KNICKER, H. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma*, 118:181-190, 2004.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.*, 166:810-832, 2001.
- POOLE, C.P. Electron spin resonance: A comprehensive treatise on experimental techniques. New York, Wiley-Interscience, 1967. 921p.
- RIVERO, C.; CHIRENGE, T.; MA, L.Q. & MARTINEZ, G. Influence of compost on organic soil matter quality under tropical conditions. *Geoderma*, 123:355-361, 2004.
- SACHS, S.; BUBNER, M.; SCHMEIDE, K.; CHOPPIN, G.R.; HEISE, K.H. & BERNHARD, G. Carbon-13 NMR spectroscopy studies on chemically modified and unmodified synthetic and natural humic acids. *Talanta*, 57:999-1009, 2002.

- SCHNITZER, M. & GUPTA, U. C. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29:274-277, 1965.
- SCHNITZER, M. & RIFFALDI, R. The determination of quinone groups in humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36:772-777, 1972.
- SCHWARZENBACH, R.P.; STIERLI, R.; LANZ, K. & ZEYER, J. Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.*, 24:1566-1574, 1990.
- SCOTT, D.T.; MCKNIGHT, D.M.; HARRIS, E.; KOLESAR, S. & LOVLEY D. Quinone moieties act as electron acceptors in the reducing of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.*, 32:2984-2989, 1998.
- SPOSITO, G. *Chemistry of soil*. New York, Oxford University Press, 1989. 277p.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistics with special referende to the biological sciences*. New York, McGraw-Hill Book Company, 1960. 453p.
- STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1994. 496p.
- STRUYK, Z. & SPOSITO, G. Redox properties of standard humic acids. *Geoderma*, 102:329-346, 2001.
- STUMM, W. & MORGAN, J.J. *Aquatic chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters*. New York, Wiley-Interscience, 1996.
- SUNDA, W.G. & KIEBER, D.J. Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates. *Nature*, 367:62-65, 1994.
- SZILÁGUY, M. The redox properties and the determination of the normal potential of peat-water system. *Soil Sci.*, 115:434-437, 1973.
- VIDAL-TORRADO, P.; MACIAS, F.; CALVO, R.; CARVALHO, S.G. & SILVA, A.C. Gênese de solos derivados de rochas ultramáficas serpentinizadas no sudoeste de Minas Gerais. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:553-541, 2006.
- WILSON, S.A. & WEBER, J.H. An EPR study of the reduction of vanadium (V) to vanadium (IV) by fulvic acid. *Chem. Geol.*, 26:1240-1246, 1998.