

# UTILIZAÇÃO DE HIDRÓXIDO DE AMÔNIO PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE SOLOS DA REGIÃO DE DOURADOS – MS

Bruno Alves Moreira<sup>1</sup>

Edemar Benedeti Filho<sup>2</sup>

Antonio Rogério Fiorucci<sup>2</sup>

## Resumo:

A produtividade do solo depende em muitas vezes, quantitativamente e/ou qualitativamente das substâncias húmicas presentes no mesmo. O ácido húmico é uma fração destas substâncias húmicas que propicia determinados benefícios como: o aumento da capacidade germinativa, devido à coloração escura e capacidade de armazenamento de água reduzindo os efeitos da seca, entre muitos outros que fazem enfatizar o seu valor ambiental e a importância desse estudo. O processo tradicional de extração do ácido húmico dos solos é realizado com NaOH, este projeto tem o intuito de propor novas metodologias de extração com a utilização de diferentes bases e suas diferenças comprovadas através de técnicas analíticas de potenciometria e condutometria.

Palavras - chave: Substâncias húmicas; metodologias diferenciadas; técnicas eletroanalíticas.

## Abstract:

The soil productivity depends on many occasions, quantitatively and / or qualitatively of humic substances present in it. Humic acid is a fraction of these humic substances that provides certain benefits such as increased germination, due to the dark coloration and storage capacity of water reducing the effects of drought, among many others that emphasize its environmental value and importance of study. The traditional process of extraction of soil humic acid is performed with NaOH, this project aims to propose new methods of extraction using different bases and their differences proved by analytical techniques of potentiometric and conductometric.

Keywords: Humic substances; different methodologies; electroanalytical techniques.

## 1.Introdução

---

<sup>1</sup> Aluno bolsista CNPq, acadêmico UEMS unidade de Dourados.

<sup>2</sup> Profº.Dr. Orientador do projeto e colaborador da UEMS unidade de Dourados.

O solo, tecnicamente conhecido como manto de intemperismo, situa-se acima da litosfera e se constitui como um depósito de matéria orgânica, elementos gasosos e minerais, possui capacidade de armazenar água e nutrientes necessários para sustentar e alimentar vegetais, sendo assim este se estabelece como um dos cerne do ecossistema. Todos estes fatores citados, entre muitos outros, contribuem para realçar a importância do estudo dos solos e suas frações (CHEN,1978).

A região de Dourados-MS tem um forte potencial agrícola e grandes propriedades produtoras das mais diversas culturas. O sucesso nas lavouras esta em grande parte relacionado ao solo ao qual houve determinada plantação. A qualidade do solo diz respeito a sua composição e assim retomamos, mais uma vez, a relevância com a qual deve ser tratado tal enfoque temático (NUNES, 2006).

A matéria orgânica, resultado da decomposição de vegetais e animais e da atividade de síntese de microorganismos, se encontra em grande parte humificada, ou seja, na fração conhecida do solo chamada húmus (SANTOS, et al, 1999). Esta determina, muitas vezes, a produtividade do solo e de certo modo é o objeto de estudo deste projeto (KONONOVA, 1966). O húmus constitui-se por substâncias húmicas que se diferenciam pelas características de solubilidade (PERDUE, et al, 1980 e STEVENSON, 1994). Substâncias húmicas por sua vez, tratam-se da maior forma orgânica distribuída no planeta e por conta disso, o grande valor ambiental (BARROS, et al 1994).

As substâncias húmicas são constituídas dos mais diversos grupos orgânicos, ainda que em sua maioria apresentem grupos carboxílicos e fenólicos, uma infinidade de outros compostos podem estar agregados a este complexo material (CANELLAS, et al, 2001). Além disso suas composições sofrem grandes variações conforme o local em que se encontram, ou seja, suas características se alteram de acordo com as condições de cada região, isso denota a possibilidade de determinar a especificidade das substâncias húmicas relacionando com regiões, procedência (localidades)(PARSONS, 1988).

Dentre os benefícios que estas substâncias podem gerar ao meio ambiente estão: a capacidade germinativa aumentada das sementes e o melhoramento do metabolismo das plantas; estimula a atividade microbiana dos microrganismos benéficos às plantas fornecendo substâncias húmicas, ácidos orgânicos e outros compostos que servem de fonte de energia; aumenta a capacidade dos solos em reter a umidade reduzindo os efeitos de seca; aumenta a

capacidade dos solos em reter os nutrientes catiônicos reduzindo as perdas por lixiviação; e entre outros que também são bastante consideráveis (BARROS, et al, 1994).

Devido à natureza complexa e heterogênea destas substâncias se sabe pouco sobre sua estrutura química (KONONOVA, 1966 e SCHNITZER, et al, 1972) que se encontra na forma de moléculas polidispersas e como peso molecular elevado. Existem algumas propostas para a estrutura destas substâncias orgânicas que em geral sugerem uma estrutura composta por OH fenólicos livres e ligados, quinonas, nitrogênio ligado a unidades estruturais aromáticas e grupos carboxílicos distribuídos ao longo da cadeia aromática (HAYES, et al, 1989). Devido a suas características estruturais, os AH podem interagir com metais e compostos orgânicos como, por exemplo, pesticidas presentes nos compartimentos ambientais (KONONOVA, 1966; RICCA, et al, 1993; e SENESI, et al 1986). A estrutura proposta por Schulten e Schnitzer (SHULTEN, et al 1993), uma das mais atuais e coerente, está apresentada em seguida na Figura 1:

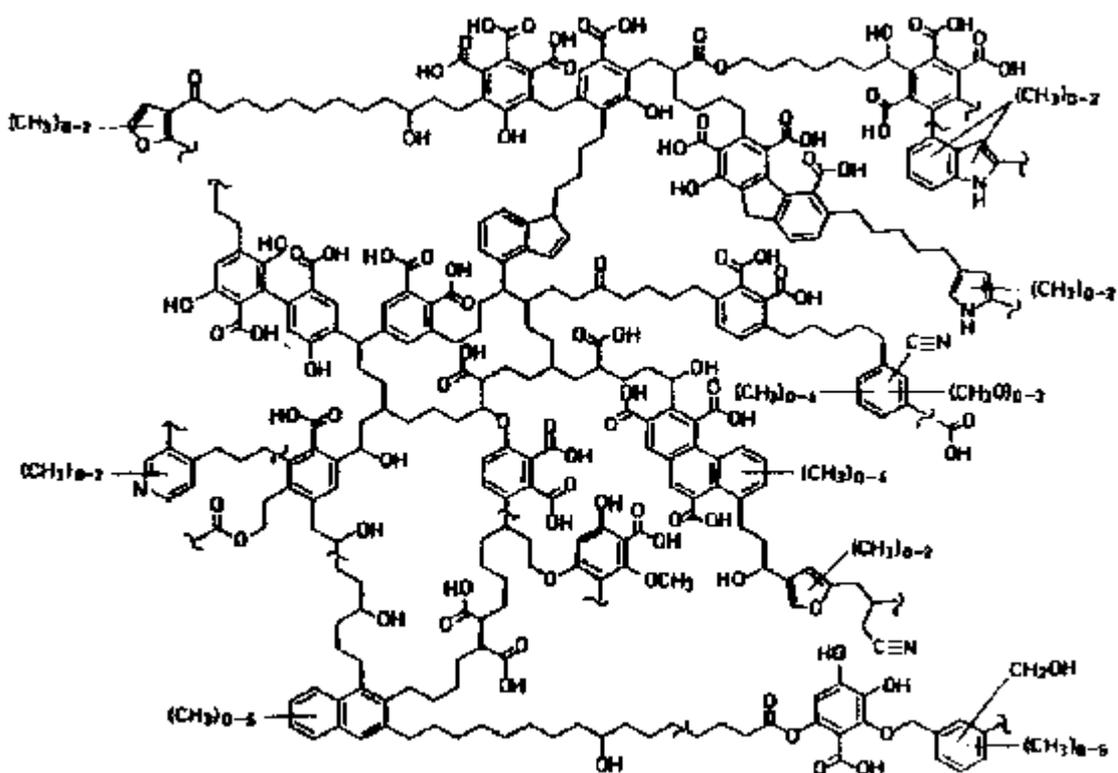


Figura 1 - Modelo do ácido húmico mostrando os diversos grupos funcionais, estruturais aromáticos e alifáticos (Schulten & Schnitzer, 1993).

As substâncias húmicas se classificam em: ácido húmico, ácido fúlvico e humina. Nos limitaremos aos estudos em torno do ácido húmico, o qual acredita-se serem biopolímeros, amorfos e, obviamente como o nome já diz, de caráter predominantemente ácido. Tem elevado peso molecular devido a sua extensão e quantidade de compostos. Para alcançarmos o ácido húmico pronto para a análise, ou seja, precipitado e escuro, passamos por um processo trabalhoso de extração e purificação (BENEDETTI-FILHO, et al, 2003 e ROSA, et al, 1999).

A partir da amostra bruta, o solo em si, separamos as três substâncias húmicas já mencionadas, através de um processo, ou melhor, metodologia proposta pela “Internacional Humic Substances Society” (IHSS) que leva em conta as diferenças de solubilidades das substâncias húmicas nos diferentes meios. A fração húmica conhecida como humina é insolúvel em meio básico e ácido, o ácido húmico é solúvel em meio básico e insolúvel em ácido e, finalmente, o ácido fúlvico é solúvel em meio ácido e básico. Assim através de etapas de solubilização, filtração e precipitação, é possível separar e purificar as substâncias em questão.

Uma variedade de técnicas podem ser empregadas, dependendo da natureza do material a ser examinado. O método propõe um processo meticuloso com etapas de purificação necessárias para a diminuição dos conteúdos de cinzas (material inorgânico) e a remoção de moléculas orgânicas de baixo peso molecular, que não são constituintes estruturais dessa fração húmica. Estas impurezas orgânicas são substâncias não húmicas coprecipitadas ou coadsorvidas como aminoácidos, carboidratos, gorduras, ceras, resinas, ácidos orgânicos, e outros (STEVEVENSON, 1994). Vários fatores influenciam no procedimento de extração e muitas questões ainda estão sem resposta (FERNANDEZ, et al, 1999; MOTONAKA, et al, 1998; e PARSONS, 1988).

O presente estudo trata da utilização de hidróxido de amônio para a extração e caracterização de ácidos húmicos de solos da região de Dourados – MS. Optamos por acrescentar a extração usando hidróxido de potássio, para termos 3 amostras a se comparar. Tradicionalmente é utilizado hidróxido de sódio(BENEDETTI-FILHO, et al, 2000; BURBA, et al, 1994; MASINI, et al, 1998; e RAIJ, et al, 2001), etapa que confere à elevação do pH, para esta extração, o desenvolvimento de uma nova metodologia é no sentido de obter melhores resultados com respeito ao nível do teor de cinzas e de grupos ácidos tituláveis. Para analisar as amostras extraídas em diferentes processos utilizamos técnicas potenciométricas e condutométricas.

## 2. Metodologia

Descreveremos, detalhadamente, os procedimentos utilizados ao longo de todo o projeto iniciando pela etapa de coleta do solo e depois da preparação da amostra, ou seja, da extração do ácido húmico.

Primeiramente foi necessário realizar estudos a respeito do local a ser coletado e qual quantidade coletar de solo, e com isso chegamos ao passo da coleta em si. Utilizando metodologia proposta por RAIJ, et al 2001 realizou-se a coleta e armazenou-se em frasco adequado, isso seguido de catalogação e identificação.

A partir do solo já coletado, realizou-se uma certa uniformização em uma porção da amostra de solo, isto é, fazemos uma catação minuciosa de pedaços de pedras e galhos, entre outros materiais para que assim fique somente o solo em si. A uniformização trata-se também de desfazer determinados pedaços de solo compactados, e assim manter um controle aproximado do tamanho das partículas ou grãos de solos, a fim de estabelecer uma boa área de contato e assim facilitar a solubilização.

Com a amostra já uniformizada transferiu-se para um recipiente adequado para em seguida adicionarmos solução de hidróxido de sódio com concentração  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Adicionou-se a cada 100g de solo e 1000 ml, aproximadamente, da solução básica. Geralmente iniciamos o procedimento de solubilização em um béquer e adicionamos em torno de 700 ml da solução de hidróxido de sódio, isso se dá por conta da facilidade de agitarmos a mistura com um bastão no béquer, e também porque a agitação deve ser realizada vigorosamente; só então transferiu-se a mistura para uma proveta com capacidade de 1000 ml e adicionou-se o restante da base até atingir 1000 ml. Como não determinamos quantitativamente o ácido húmico de cada amostra os valores citados de massa de solo e volume de base são grosseiramente ajustados.

Com o auxílio de suportes e argolas metálicas montou-se um aparato para realizar as filtrações com o intuito separar a fase insolúvel. Usando funis de vidro e filtros de qualidade analítica filtrou-se toda a mistura obtida na adição da base. Esta etapa é demasiadamente lenta, pois a mistura é bastante densa. O resultado da filtração é submetido mais uma vez à filtração, ou seja, esta etapa é repetida, a fim de garantirmos uma boa extração e purificação(RAIJ, et al, 2001).

Com o filtrado em mãos passamos ao próximo passo que consiste no abaixamento do pH até 2,00 aproximadamente, para precipitarmos o ácido húmico. Gotejando ácido sulfúrico concentrado e controlando o pH através de um pHmetro de bancada obtemos a separação do ácido húmico (precipitado). Segue foto (figura 2) ilustrando a precipitação :



Figura 2: Precipitação do ácido húmico do solo da região de Dourados.

Aguardou-se em torno de 24 horas para que o precipitado decantasse e retirou-se cuidadosamente o sobrenadante com ajuda de uma pipeta de Pasteur. O precipitado foi levado ao forno a uma temperatura próxima de 90°C até que estivesse seco o suficiente para a maceração.

Após a secagem, macerou-se o material até obtermos um pó bem fino, e finalmente armazenou-se em recipiente adequado com boa vedação e identificamos o mesmo. O mesmo procedimento foi realizado utilizando hidróxido de amônio e hidróxido de potássio ao invés de hidróxido de sódio.

Para a etapa seguinte foi necessário primeiro a preparação das soluções que seriam usadas nas análises. Preparou-se solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, cloreto de potássio 3 mol.L<sup>-1</sup> e Triton X-100 0,1%. A solução de hidróxido de sódio foi padronizada com o padrão secundário, ácido clorídrico, portanto padronizou-se estas duas soluções.

Padronização do HCl 0,1mol.L<sup>-1</sup> com tris (hidroximetil) aminometano, através de titulação em triplicata de 25,00mL do ácido e aproximadamente 0,1817g de tris, com medição dos potenciais a cada 0,50mL de ácido titulado.

Padronização do NaOH  $0,1\text{mol.L}^{-1}$  com o HCl já padronizado, através de titulação em triplicata de 25,00mL da base e 15,00mL do ácido, com medição dos potenciais a cada 0,50mL de base titulada.

Com as soluções padronizadas e a amostra preparada, partiu-se para as titulações condutométricas e potenciométricas. Primeiro a titulação potenciométrica. Para tal utilizamos o banho termostatizado para controle da temperatura a  $25^{\circ}\text{C}$ . Pesou-se aproximadamente 0,2000 g de ácido húmico fruto da extração anterior, mais 50,00 ml de Triton X-100 0,1 %, 10,00 ml de KCl  $3\text{ mol.L}^{-1}$  e fez-se medidas a cada 0,10 ml despejados da solução padronizada de NaOH até 25,00 ml, com intervalos de 3 minutos. A seguir uma foto (figura 3) ilustrando a aparelhagem usada na titulação potenciométrica:

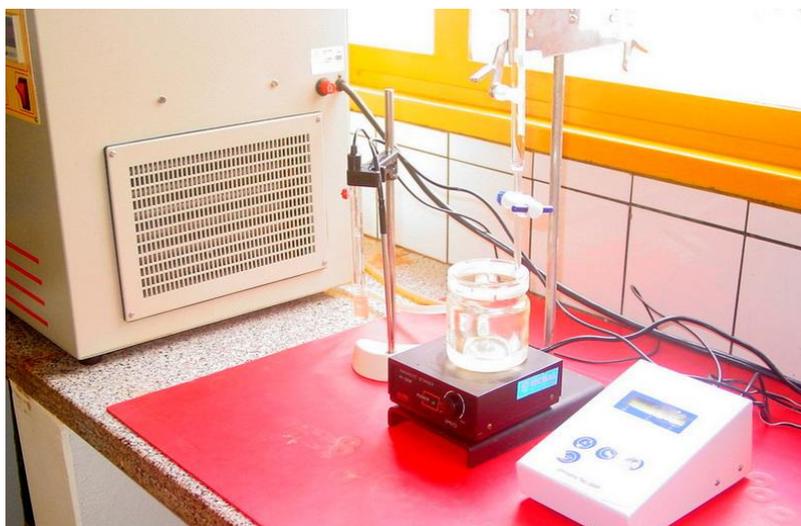


Figura 3: Instrumentação utilizada na análise potenciométrica.

Para a titulação condutométrica o procedimento é bastante parecido; também no banho termostatizado controle da temperatura a  $25^{\circ}\text{C}$ . Pesou-se aproximadamente 0,2000 g de ácido húmico fruto da extração anterior, mais 50,00 ml de Triton X-100 0,1 %, 10,00 ml de água destilada e fez-se medidas a cada 0,10 ml despejados da solução padronizada de NaOH até 10,00 ml, com intervalos de 1 minutos.

### 3. Resultados e Discussões

Obtivemos a partir de uma amostra de solo intitulada “MATA” coletada na região de Dourados-MS, três amostras de ácido húmico, cada um extraído com uma base diferente.

Utilizamos a mesma amostra de solo e bases na mesma concentração para a extração, com o intuito obtermos resultados possíveis de serem comparados com uma única variável, a base extratora. Portanto todas as extrações e purificações, bem como as análises foram realizadas em condições muito semelhantes.

Segue foto (figura 4) ilustrando o resultado da extração da amostra “MATA” com a base NaOH, em seu recipiente adequado:



Figura 4: Ácido húmico extraído e pronto para a análise.

Com as amostras devidamente preparadas pudemos partir às análises, lembrando que o agente titulante usado foi NaOH em concentração padronizada de  $0,0786 \text{ mol.L}^{-1}$ , inicialmente com as titulações potenciométricas das amostras de ácido húmico extraídas com as diferentes bases, obteve-se os resultados contidos na tabela a seguir:

Tabela 1: Volumes de equivalência e massa de ácido húmico obtidos nas titulações potenciométricas, utilizando NaOH  $0,0786 \text{ mol.L}^{-1}$ .

Amostra	Massa pesada de ácido húmico (g)	Volumes de equivalência (mL)
“MATA” NaOH	0,2006	9,30
“MATA” KOH	0,2002	4,76 e 6,65
“MATA” $\text{NH}_4\text{OH}$	0,2003	1,82 e 4,67

Os volumes de equivalência foram determinados a partir de uma análise gráfica. Cada estudo gerou uma curva de titulação potenciométrica e para a determinação do volume de equivalência realizamos a primeira derivada de cada um deles. Como trata-se de uma análise comparativa uniu-se os gráficos a fim de facilitar o entendimento, abaixo portanto encontram-se os gráficos de cada extração unidos (figura 5) e os volumes de equivalência determinados:

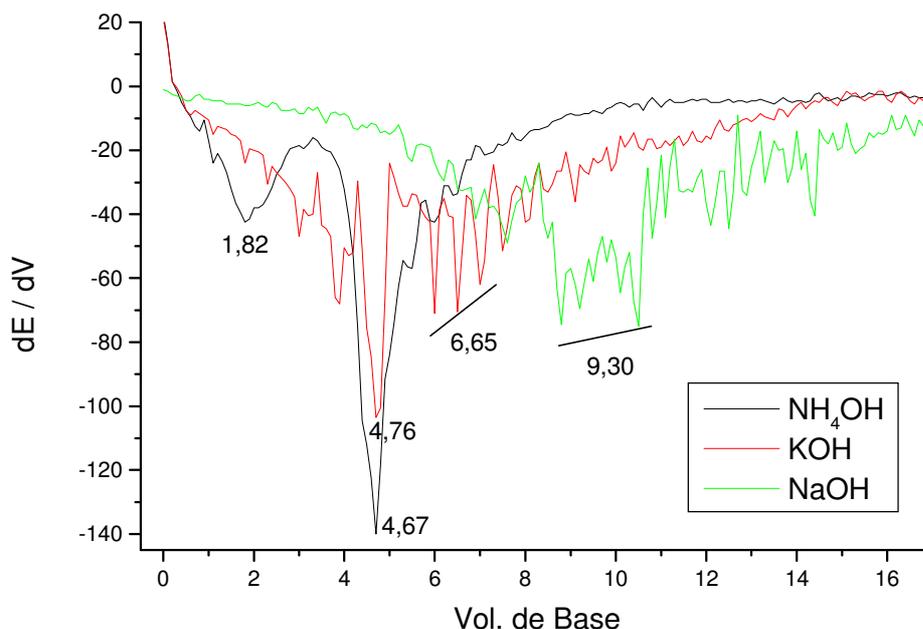


Figura 5: 1° derivada das curvas de titulação das amostras obtidas por diferentes bases.

É possível determinar a quantidade de hidrogênio ionizável presente na amostra de ácido húmico atribuído aos grupos ácidos carboxílicos (-COOH) e aos grupos fenólicos (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH). Percebemos a existência de picos, alguns bastante determinados geralmente dois. O primeiro pico é atribuído à neutralização dos grupos ácidos carboxílicos das moléculas de ácido húmico e o segundo pico é atribuído à neutralização dos grupos fenólicos, pois os grupos carboxílicos apresentam um pKa entre 2 e 5; e os grupos fenólicos apresentam um pKa entre 7 e 9 (BENEDETTI-FILHO, et al, 2003 e BENEDETTI-FILHO, et al, 2000).

Abaixo encontram-se expressões matemáticas usadas na determinação da quantidade de grupos carboxílicos e fenólicos. Os resultados das quantidades e bem como a razão entre estes grupos ( $n_{C_6H_5OH}/n_{COOH}$ ) se encontram na tabela 2:

$$n\text{-COOH} = \frac{V_{\text{eq1}} \times [\text{NaOH}]}{m_{\text{AH}}}$$

$$m_{\text{AH}}$$

$$n\text{-C}_6\text{H}_5\text{OH} = \frac{(V_{\text{eq2}} - V_{\text{eq1}}) \times [\text{NaOH}]}{m_{\text{AH}}}$$

$$m_{\text{AH}}$$

em que:

$V_{\text{eq1}}$  é o primeiro volume de equivalência, o qual foi atribuído aos grupos carboxílicos;

$V_{\text{eq2}}$  é o segundo volume de equivalência, o qual foi atribuído aos grupos fenólicos;

$m_{\text{AH}}$  é a massa de ácido húmico utilizada em cada titulação e

$[\text{NaOH}]$  é a concentração do titulante utilizado em cada titulação.

Tabela 2: Razão entre as quantidades estimadas dos grupos carboxílico e fenólico presentes na amostra de ácido húmico.

Amostra	- COOH mmol H <sup>+</sup> / g AH	- C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH mmol H <sup>+</sup> / g AH	total mmol H <sup>+</sup> / g AH	(n <sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH</sub> /n <sub>COOH</sub> )
“MATA” NaOH	3,643	--	3,643	--
“MATA” KOH	1,868	0,777	2,646	0,41
“MATA” NH <sub>4</sub> OH	0,714	1,118	1,832	1,57

Analisando a tabela 2 e considerando que se trata da mesma amostra e que as análises foram realizadas em condições iguais, os valores encontrados demonstram a dependência e/ou influência da base com a qual foi realizada a solubilização do ácido húmico e fúlvico no

processo de extração, ou seja, percebemos uma variação bastante considerável nos valores de quantidades total de grupos ácidos, bem como variações elevadas de cada grupo em separado, além de razões entre os grupos consideravelmente diferentes. Na extração obtida através de  $\text{NH}_4\text{OH}$  encontramos uma quantidade um pouco maior de grupos fenólicos do que carboxílicos, por isso a razão entre eles está acima de 1. Na extração obtida através de  $\text{KOH}$  os valores apresentam o oposto, a quantidade de grupos fenólicos é menor do que grupos carboxílicos, por isso a razão entre eles é menor que 1.

Efeito mais curioso observou-se na amostra de ácido húmico extraído através do método padronizado pela “Internacional Humic Substances Society” (IHSS), ou seja, com  $\text{NaOH}$ , pois nesta amostra encontramos apenas um volume de equivalência o que impossibilitou os demais cálculos. Não podemos dizer se este pico representa a protonação do ácido carboxílico e nem fenólico, ou ainda se ou dois encontram-se muito próximos; apenas outras análises podem aferir o grupo, ou os grupos indicados naquele pico.

Foram realizadas titulações condutométricas também, com o intuito de reforçar os resultados obtidos nas análises anteriores. Para estas titulações trataremos os dados de forma bastante parecida. Então a seguir tabela 3 com os volumes de equivalência e as massas pesadas de ácido húmico para cada titulação, lembrando que a base para a titulação é a mesma anteriormente utilizada:

Tabela 3: Volumes de equivalência e massa de ácido húmico obtidos nas titulações potenciométricas, utilizando  $\text{NaOH}$   $0,0786\text{mol.L}^{-1}$ .

Amostras	Massa pesada de ácido húmico (g)	Volumes de equivalência (mL)
“MATA” $\text{NaOH}$	0,2005	1,34; 3,31 e 4,18
“MATA” $\text{KOH}$	0,2007	2,41 e 3,67
“MATA” $\text{NH}_4\text{OH}$	0,2006	7,89

Os volumes de equivalência também foram obtidos a partir de uma análise gráfica, mas não houve necessidade de efetuar o gráfico da primeira derivada, pois as inflexões são mais visíveis. Mais uma vez unimos os gráficos a fim de facilitar o entendimento e as discussões, uma vez que se trata de uma análise comparativa. A seguir encontra-se o gráfico (figura 6) com as três curvas de titulação condutométrica e os volumes de equivalência determinados:

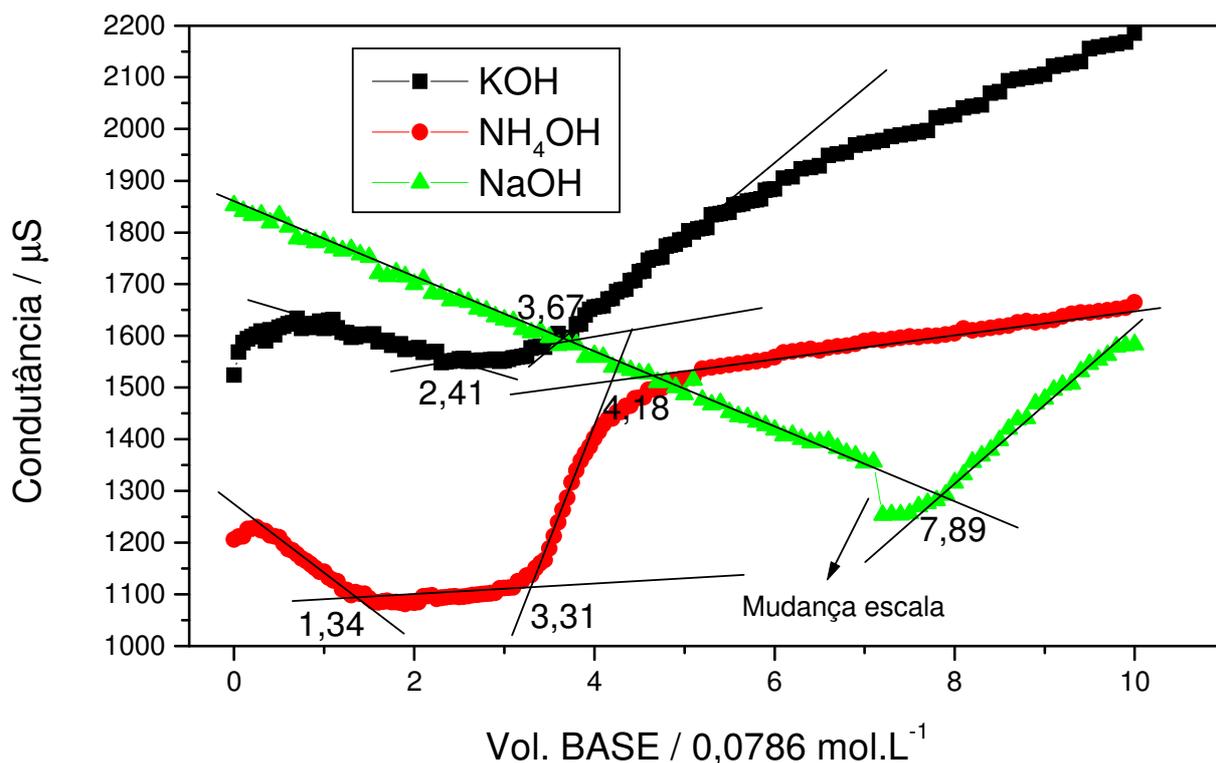


Figura 6: As curvas de titulação condutométricas das amostras extraídas por diferentes bases.

É possível determinar tal qual foi feito na análise potenciométrica quantidade total de grupos ácidos, bem como de grupos carboxílicos e fenólicos. O primeiro ponto de inflexão mais uma vez indica a protonação do ácido carboxílico e o segundo o ácido fenólico. Através das expressões matemáticas já citadas encontramos os valores contidos na tabela 4 a seguir:

Tabela 4: Razão entre as quantidades estimadas dos grupos carboxílico e fenólico presentes na amostra de ácido húmico.

Amostra	- COOH mmol H <sup>+</sup> / g AH	- C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH mmol H <sup>+</sup> / g AH	total mmol H <sup>+</sup> / g AH	(n <sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH</sub> /n <sub>COOH</sub> )
“MATA” NaOH	3,093	--	3,093	--
“MATA” KOH	0,944	0,493	1,437	0,52
“MATA” NH <sub>4</sub> OH	0,525	0,772	1,297	1,47

Percebemos que a utilização de diferentes bases extratoras causam variações nos resultados que obtemos. Determinamos agora que a amostra extraída com  $\text{NH}_4\text{OH}$  possui mais grupos fenólicos do que carboxílicos mais em proporção bem menor. A amostra extraída com  $\text{KOH}$  apresentou valores próximos do obtidos na outra análise, no entanto apresentou mais um volume de equivalência o qual só seria possível determinar através de outro estudo. E mais uma vez a amostra extraída com  $\text{NaOH}$  obteve apenas um volume de equivalência.

Uma análise de espectroscopia no infravermelho nos ajudaria na interpretação dos resultados e esclareceriam algumas incógnitas.

#### 4.Considerações finais

As análises comprovam alteração nas características dos ácidos húmicos coletados na região de Dourados-MS, e extraídos com diferentes bases. Lembrando que as condições experimentais a qual foi submetida as amostras foram muitos semelhantes e por se tratar da mesma amostra as variações podem denotar a formulação de outros métodos de eficácia para a extração do ácido húmico de solos.

#### 5.Agradecimentos

Deixo expressos meus sinceros agradecimentos às seguintes instituições e pessoas, sem as quais o presente trabalho teria sido impossível: ao CNPq pela concessão da bolsa do projeto; à UEMS pelo incentivo ao desenvolvimento deste trabalho; e ao colega Osmar Luís Nascimento Gotardi, pelos ensinamentos e sugestões no decorrer do trabalho.

#### 6. Referências

1. Barros, M. C. P.; Paula, J. R.; Rezende, M. O. O, *Química Nova* 1994,
2. Benedetti-Filho, E.; Neves, E. F. A.; Souza, D. R. & Javaroni, R. *Journal of Coordination Chemistry*, 56 (7): 623, 2003.

3. Benedetti-Filho, E.; Neves, E. F. A. & Javaroni, R. C. Potentiometric determination of acid groups in humic substances. In: 3<sup>rd</sup> International Colloquium on Process Related Environmental Chemistry (PREACH), Leipzig, 2000.
4. Burba, P. Rocha, J. C. & Klockow, D. *Fresenius J. Anal. Chem.* 349: 800, 1994.
5. Canellas, L. P.; Santos, G. A.; Rumjanek, V. M.; Moraes, A. A. & Guridi, F. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 12, 2001.
6. Chen, Y.; Schnitzer, M.; *Soil Sci.* 1978, 125, 7.
7. Fernandez, O. I.; Facal, P.; Gonzalez, M. & Rey, F. *Anal. Chim. Acta*, 401: 251, 1999.
8. Hayes, M.H.B., Macharty, P., Malcolm, R.L., *et al.* Structures of humic substances: the emergence of forms (3-31). In: HAYES, M.H.B., MaCARTHY, P., MALCOLM, R.L., *et al.* *Humic Substance II: In search of structure: setting the scene.* New York : John Wiley & Sons, 1989. 764p.
9. Kononova, M. M. *Soil Organic Matter, it's Nature, it's Role in Soil Formation and in Soil Fertility.* 2<sup>a</sup> ed. Pergamon Press: Nova Iorque, 1966.
10. Masini, J. C.; Abate, G.; Lima, E. C.; Hann, L. C.; Nakamura, M. S.; Lichtig, J. & Nagatomy, H. R. *Anal. Chim. Acta*, 364: 223, 1998.
11. Motonaka, J.; Naruyama, K.; Mishima, Y. & Ikeda, S. *Analytical Sciences*, 14: 961, 1998.
12. Nunes, Walder Antonio Gomes de Albuquerque. *Solos do Município de Dourados.* Embrapa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006.
13. Parsons, J. W. In: *Humic substances a b d their role in the environment.* John Wiley, Chichester, 1988.
14. Perdue, E. M.; Reuter, J. H. & Ghosal, M. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44: 1841, 1980.
15. Raij, B. V.; Andrade, J. C.; Antarella, H. & Quaggio, J. A. Instituto Agronômico. Campinas, 2001.
16. Ricca, G.; Frederico, L.; Astori, C.; Gallo, R. *Geoderma* 1993, 57, 263.
17. Rosa, A. H.; Rocha, J. C.; Furlan, M. *Química Nova*, 23: 4, 1999.

18. Santos, G.A. & Camargo, F.A.O. Fundamentos da matéria orgânica do solo. Ed. Genesis, Porto alegre, 1999. 491p.
19. Schnitzer, M. & Khan, S. U. Humic Substances in the Environment. Marcel Dekker: Nova Iorque, 1972.
20. Senesi, N.; Sposito, G.; Martin, J. D.; *The Sci. Total. Environ.* 1986, 55, 351.
21. Shulten, H. R. & Schmitzer, M. *Naturwissenschaften*, 1993, 80: 29.
22. Stevenson, N.F.J. Humus chemistry. New York: Wiley, 1994. 443p.