

IGOR JOSÉ BOGGIONE SANTOS

**PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO
COM NANOTUBO DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS, ARGILAS,
ÓXIDOS E ALBUMINA SORO BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da
Biblioteca Central da UFV

T

Santos, Igor José Boggione, 1986-
S237p Parâmetros termodinâmicos da interação de ácido húmico com
2013 nanotubo de carbono de paredes múltiplas, argilas, óxidos e albumina soro
bovina / Igor José Boggione Santos. - Viçosa, MG, 2013.
xviii, 143f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Ácido húmico. 2. Adsorção. 3. Termodinâmica. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-
Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 541.3

IGOR JOSÉ BOGGIONE SANTOS

**PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DA INTERAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO COM
NANOTUBO DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS, ARGILAS, ÓXIDOS E
ALBUMINA SORO BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de dezembro de 2013.

Mariane Cristina Schnitzler

Sukarno Olavo Ferreira

Álvaro Vianna Novaes de Carvalho
Teixeira

Adelina Pinheiro Santos

Luis Henrique Mendes da Silva
(Orientador)

*Dedico esta tese aos meus pais, Bernadete e Euler,
e a minha eterna companheira Delaine.*

"Educa e transformarás a irracionalidade em inteligência, a inteligência em humanidade e a humanidade em angelitude"

Emmanuel

"A educação é a obra da minha vida, não faltarei à minha missão, pois penso compreendê-la. Inimigo de todo charlatanismo, não tenho o tolo orgulho de acreditar cumpri-la com perfeição, mas tenho ao menos a convicção de cumpri-la com consciência."

Hippolyte Léon Denizard Rivail

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao Mestre e Guia Jesus, pela oportunidade desta existência física repleta de oportunidades e desafios existenciais que nos conduz ao burilamento espiritual.

À minha família, exemplo de amor terno e profundo, que sempre me envolveram em energias de apoio, incentivo, dedicação e confiança.

À minha eterna e amada companheira Delaine, pelo apoio de sempre e por estar ao meu lado em todos os momentos, fazendo-me acreditar no amor que transcende as barreiras físicas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo. Ao INCTAA e a FAPEMIG pelo apoio.

Ao meu orientador Luis Henrique Mendes da Silva, pelos constantes desafios e crescimentos profissionais.

Aos co-orientadores, principalmente a Carminha, pela dedicação e orientações.

Aos professores da banca, pela contribuição a este trabalho.

Aos amigos do QUIVECOM pela convivência agradável e pela amizade de tantos anos, em especial, à Aparecida, Luciana, Pamela, Rose, Maiby, Vivianne, Anne, Juan e Luiz Felipe.

Ao Leonardus, pelas constantes e valiosas orientações e discussões acadêmicas. Ao Guilherme e Gabriel Max pelas medidas no ITC. Ao Marcel pelas medidas de coeficiente de difusão.

Aos amigos do Centro Espírita Irmã Scheilla, do Grupo de Arte Espírita Transformai e do SJ, pelas conversas edificantes e trabalho no bem que alimentam as nossas almas, na certeza de que a educação só se faz quando ela abrange o homem integral. Em especial, gostaria de agradecer à Viviani Lírio, Renna Mafra, Derly José e Dorinha Henriques por me fazerem acreditar que é possível e necessário fazer diferente para a implementação do “amai-vos e instrui-vos”.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este momento chegasse,

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Igor José Boggione Santos, filho de Euler Santos e de Bernadete Lazzarotti Boggione Santos, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 24 de Janeiro de 1986.

Em Março de 2005 ingressou no curso de Química e em Janeiro de 2010 obteve o título de bacharel e licenciado em Química pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em Março do mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado em Agroquímica com ênfase em Físico-química na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa da tese em Dezembro de 2013.

Sumário

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	1
1.1. Ácido húmico	1
1.2. Nanotubos de carbono	3
1.1.1. Caracterização	5
1.1.2. Aplicações	6
1.3. Termodinâmica de adsorção	7
1.4. Série de Hofmeister	12
1.5. Outras superfícies adsorventes e outras interações	13
1.5.1. Argilominerais	13
1.5.2. Óxidos	16
1.5.3. Proteína albumina do soro bovino (BSA)	17
1.6. Técnicas utilizadas	20
1.6.1. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	20
1.6.2. Método de determinação de caracterização de porosidade	22
1.6.3. Espectroscopia de fluorescência	24
1.6.4. Difusão de Taylor	26
2. Referências bibliográficas	28
OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	34
1. Objetivos	34
2. Materiais e métodos	35
2.1. Equipamentos	35
2.2. Materiais e Reagentes	35
2.3. Solução de ácido húmico	36
2.4. Isotermas de adsorção de ácido húmico em diversas superfícies	37
2.5. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	38
2.6. Espectroscopia de fluorescência	39
2.7. Difusão de Taylor	39
3. Referências bibliográficas	39

CAPÍTULO 1: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes. Part I	41
Abstract.....	42
1. Introduction.....	43
2. Experimental.....	46
2.1. Materials.....	46
2.2 Adsorption experiments.....	46
2.3 Isothermal Titration Calorimetry (microcalorimetry).....	47
3. Results and Discussion.....	48
3.1 Adsorption isotherms.....	48
<u>3.1.1</u> Effects of pH.....	48
<u>3.1.2</u> Effect of ionic strength.....	49
3.2. Thermodynamic properties.....	55
3.3. Microcalorimetric experiments.....	60
4. Conclusion.....	64
5. Acknowledgments.....	65
6. References.....	65
CAPÍTULO 2: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes in presence of Hofmeister series salts. Part II	68
Abstract.....	69
1. Introduction.....	70
2. Experimental.....	73
2.1. Materials.....	73
2.2. Adsorption experiments.....	73
3. Results and Discussion.....	74
3.2 Adsorption isotherms.....	74
<u>3.2.1</u> Effects of Hofmeister series.....	74
3.3. Thermodynamic properties.....	77
3.4. Microcalorimetric experiments.....	80
4. Conclusion.....	85
5. Acknowledgments.....	85
6. References.....	86
CAPÍTULO 3: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acid on clay minerals	70
Abstract.....	89
1. Introduction.....	90
2. Experimental.....	92

2.1. Materials	92
2.2 Specific surface area (S_{BET}) determinations	92
2.3. Adsorption experiments	93
3.1. Adsorption isotherms	94
<u>3.1.1. Effects of pH</u>	94
<u>3.1.2. Effects of ionic strength</u>	97
3.2. Thermodynamic properties	102
3.3. Microcalorimetric experiments	106
4. Conclusion	113
5. Acknowledgments	114
6. References	114
CAPÍTULO 4: Investigação termodinâmica da interação BSA e ácido húmico via espectroscopia de fluorescência e ITC	118
Resumo	119
1. Introdução	120
2. Experimental	121
2.1. Materiais	121
2.2. Espectroscopia de fluorescência.....	122
3. Resultados e discussão	123
3.1. Espectroscopia de fluorescência.....	123
3.2. Experimentos de microcalorimetria	128
4. Conclusão	133
5. Agradecimentos.....	134
6. Referências bibliográficas	134
CONCLUSÃO GERAL	137
ANEXOS	139

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CNTs – nanotubos de carbono

SWCNT – nanotubos de carbono de paredes simples

MWCNT – nanotubos de carbono de paredes múltiplas

NOM – matéria orgânica natural

SOM – matéria orgânica do solo

HS – substâncias húmicas

HA – ácido húmico

PPHA – ácido húmico Pahokee Peat

LHA – ácido húmico Leonardite

TMA – tetrametilamônio

HSe – série de Hofmeister

LSZ - lisozima

ITC – calorimetria de titulação isotérmica

$\Delta_{\text{int}}G$ – variação da energia livre de Gibbs de interação

$\Delta_{\text{ads}}G$ – variação da energia livre de Gibbs de adsorção

$\Delta_{\text{int}}H$ – variação de entalpia de interação

$\Delta_{\text{ads}}H$ – variação de entalpia de adsorção

$\Delta_{\text{int}}S$ – variação de entropia de interação

$\Delta_{\text{ads}}S$ – variação de entropia de adsorção

T - temperatura

Γ – quantidade do componente adsorvido

C_e – concentração de equilíbrio

BSA – proteína albumina do soro bovino

λ_{em} – comprimento de onda de emissão

λ_{exc} – comprimento de onda de excitação

K_L – constante de Langmuir

K_F – constante de Freundlich

PZC – ponto isoelétrico

K_b – constante de ligação

ΔF – diferença de intensidade de fluorescência

ΔF_{max} – diferença de intensidade de fluorescência máxima

IF – intensidade de fluorescência

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1.** Representação dos SWCNTs e MWCNTs4
- Figura 2.** Sistema composto de duas fases e a interface delimitada entre $-\delta$ e $+\delta$7
- Figura 3.** Microcalorímetro de titulação isotérmico..... 21
- Figura 4.** Desenho esquemático do conjunto seringa-torre de titulação. 21
- Figura 5.** Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível..... 24
- Figura 6.** Representação esquemática de um espectrofluorímetro..... 25
- Figura 7.** Representação de um equipamento utilizado na técnica de Taylor. A linha pontilhada indica as unidades termostatizadas..... 27

CAPÍTULO 1: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes. Part I

- Figure 1.** Adsorption isotherms of PPHA and LHA on MWCNT at different pH..... 48
- Figure 2.** Adsorption isotherms of PPHA on MWCNT at different systems.....50
- Figure 3.** Adsorption isotherms of LHA on MWCNT at different systems.....51
- Figure 4.** Diffusion coefficient by Taylor's method for PPHA and LHA at different systems..... 53
- Figure 5.** $\Delta_{\text{ads}}H$ of adsorption (J g^{-1}) versus Γ (mg g^{-1}) for the adsorption process of PPHA and LHA onto MWCNT at pH 2.5 at different systems 61

CAPÍTULO 2: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes in presence of Hofmeister series salts. Part II

- Figure 1.** Adsorption isotherms of LHA on MWCNT at different systems at pH 2.5 in presence of anionic Hofmeister series 75
- Figure 2.** Adsorption isotherms of LHA on MWCNT at different systems at pH 2.5 in presence of cationic Hofmeister series 76
- Figure 3.** $\Delta_{\text{ads}}H$ of adsorption (J g^{-1}) versus Γ (mg g^{-1}) for the adsorption process of LHA onto MWCNT at pH 2.5 in presence of Hofmeister series..... 82

CAPÍTULO 3: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acid on clay minerals

- Figure 1.** Adsorption isotherms of PPHA at pH 4.0 and pH 6.0 at different clays minerals..... 94

Figure 2. Adsorption isotherms of PPHA at pH 4.0 and pH 6.0 at different oxides.....	95
Figure 3. Adsorption isotherms of PPHA on clay at pH 4.0 at clays in presence of NaCl.....	98
Figure 4. Adsorption isotherms of PPHA on clay at pH 4.0 at oxides in presence of NaCl	99
Figure 5. $\Delta_{ads}H$ of adsorption ($J g^{-1}$) versus Γ ($mg m^{-2}$) for the adsorption process of PPHA at pH 4.0 onto clays	108
Figure 6. $\Delta_{ads}H$ of adsorption ($J g^{-1}$) versus Γ ($mg m^{-2}$) for the adsorption process of PPHA at pH 4.0 onto oxides	109
 CAPÍTULO 4: Investigação termodinâmica da interação BSA e ácido húmico via espectroscopia de fluorescência e ITC	
Figura 1. Espectro de emissão para os sistemas PPHA-BSA em tampão 3,6.....	123
Figura 2. Variação da intensidade de fluorescência (medida em λ_{em} 283,03 nm) em função da concentração de PPHA em tampões acetato:e diferentes forças iônicas.....	124
Figura 3. Gráfico $1/\Delta F$ em função de $1/[PPHA]$ da interação BSA-PPHA em tampão 5,8 na presença de 50 mM de KCl.	125
Figura 4. $\Delta_{int}H$ ($J mg^{-1}$) versus $[PPHA]$ ($mg mL^{-1}$) do processo de interação BSA-PPHA nos tampões de acetato de sódio e em diferentes forças iônicas.....	130

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1. Série de Hofmeister	13
--	----

OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1. Composição elementar e razões isotópicas estáveis de amostras IHSS.....	35
--	----

CAPÍTULO 1: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes. Part I

Table 1. Maximum adsorption capacity of PPHA and LHA on MWCNTs at pH 2.5...	52
--	----

Table 2. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA and PPHA onto MWCNTs on different systems with different models calculated.....	58
---	----

Table 3. Langmuir constants of adsorption of LHA and PPHA.....	59
---	----

Table 4. Thermodynamic parameters of adsorption of PPHA and LHA onto MWCNTs at pH 2.5 in the presence of 10 and 100 mM of salts (TMA, Li ₂ SO ₄ and KSCN) calculated with Langmuir model.....	63
--	----

CAPÍTULO 2: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes in presence of Hofmeister series salts. Part II

Table 1. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA onto MWCNTs, evaluating HSe cations.....	79
--	----

Table 2. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA onto MWCNTs, evaluating the HSe anions.....	79
---	----

Table 3. Langmuir constants and Freundlich constants of adsorption of LHA.....	80
---	----

Table 4. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA onto MWCNTs at pH 2.5 in the presence of HS salts calculated with Langmuir model.....	84
---	----

CAPÍTULO 3: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acid on clay minerals

Table 1. Properties of clay minerals and oxides.....	93
---	----

Table 2. Maximum adsorption capacity of PPHA on clays minerals at different pH...	100
--	-----

Table 3. Thermodynamic parameters of adsorption of PPHA onto clay minerals at different systems.....	105
---	-----

Table 4. Thermodynamic parameters of adsorption of PPHA onto clay minerals at pH 4.0 in the presence of NaCl calculated with Langmuir model.....	111
---	-----

CAPÍTULO 4: Investigação termodinâmica da interação BSA e ácido húmico via espectroscopia de fluorescência e ITC

Tabela 1. Constantes de ligação (K_b), intensidade de fluorescência máxima da ligação BSA-PPHA e $\Delta_{int}G$ em diferentes sistemas estimada pela equação (1)..... 126

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos da interação BSA-PPHA nos tampões de acetato de sódio e na presença de diferentes concentrações de KCl..... 132

RESUMO

SANTOS, Igor José Boggione, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013. **Parâmetros termodinâmicos da interação de ácido húmico com nanotubo de carbono de paredes múltiplas, argilas, óxidos e albumina soro bovina.** Orientador: Luís Henrique Mendes da Silva. Coorientadores: Maria do Carmo Hespanhol da Silva e Jairo Tronto.

Mudanças climáticas globais causadas pelo aumento da concentração de CO₂ atmosférico tem estimulado uma melhor compreensão do ciclo global do C. Os solos representam um dos maiores compartimentos de carbono na Terra, contendo mais C que na biomassa vegetal e na atmosfera. Portanto, compreender a interação de uma das substâncias majoritárias da matéria orgânica do solo, o ácido húmico (HA), com diferentes superfícies e substâncias é extremamente importante, especialmente para países como o Brasil, onde a maioria das emissões de gases causadores do efeito estufa são provenientes de mudanças de uso do solo e atividades agropecuárias. O objetivo geral deste trabalho foi estudar os parâmetros termodinâmicos de interação entre HA e o nanotubo de carbono de paredes múltiplas (do inglês MWCNT), argilas, óxidos e proteína albumina do soro bovino (BSA), visando contribuir para uma melhor compreensão dos fatores que levam à estabilização do carbono no solo. Para isso foram investigados a interação HA-MWCNT em diferentes pHs e em diferentes forças iônicas por meio da isoterma de adsorção e da técnica de calorimetria de titulação isotérmica, ITC, (Capítulo 1), a influência da Série de Hofmeister na interação HA-MWCNT via isotermas de adsorção e ITC (Capítulo 2), a interação entre HA e argilominerais em diferentes forças iônica via isotermas de adsorção e ITC (Capítulo 3) e a interação BSA-HA em diferentes pHs e forças iônicas via espectroscopia de fluorescência e ITC (Capítulo 4). A análise termodinâmica em todos os capítulos demonstrou que o processo de interação do HA com diferentes superfícies e substâncias é espontâneo ($\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$). Do primeiro estudo (Capítulo 1) resultaram que o HA adsorve em MWCNT, principalmente, em pH mais ácido e que a força iônica, o tipo

de sal e a origem do HA influenciam no processo de adsorção. O modelo que mais se ajustou às isotermas foi o de Langmuir. A análise termodinâmica demonstrou que a adsorção é entalpicamente favorável para todos os sistemas estudados. O segundo estudo (Capítulo 2) apresenta altos valores de Γ , o que demonstra um grande potencial do MWCNT em adsorver HA. Além disso, verifica-se que a adsorção depende da natureza dos sais da Série de Hofmeister e que a adsorção não segue esta série. A análise termodinâmica mostra que o processo é entalpicamente favorável para a série aniônica de Hofmeister. O terceiro capítulo mostrou que o mecanismo de adsorção de HA em argilominerías depende da natureza da superfície, da concentração do polieletrólito e do pH. O modelo que melhor se ajustou aos sistemas estudados foi o de Langmuir, com exceção da montmorinólita em pH 4,0 e 6,0. O processo de adsorção será entálpica e/ou entropicamente favorável dependendo do sistema. No capítulo 4, os espectros de emissão demonstraram que há uma intensa interação BSA-HA. Houve um efeito da força iônica do sal KCl na interação BSA-HA nos sistemas estudados. A entropia foi positiva para os sistemas em tampão 3,6 e 4,8 na presença de 50 mM de KCl, sendo que no primeiro a variação entálpica foi desfavorável. Nos demais sistemas estudados, não houve uma contribuição entrópica favorável ao processo de interação BSA-HA, sendo, portanto, o processo dirigido pela entalpia.

ABSTRACT

SANTOS, Igor José Boggione, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2013. **Thermodynamic parameters of the interaction of humic acid with multi wall carbon nanotube, clays, oxides and bovine serum albumin.** Adviser: Luís Henrique Mendes da Silva. Co-advisers: Maria do Carmo Hespanhol da Silva e Jairo Tronto.

Climate changes caused by increased atmospheric concentration of CO₂ have stimulated a better understanding of the global carbon cycle. Soils represent one of the largest compartments of C on Earth, with higher C content than plant biomass and atmosphere. Therefore, understanding the interaction of one of the major compounds in soil organic matter, humic acid (HA) with different surfaces and substances is extremely important, especially for countries like Brazil, once the majority of its greenhouse gases emissions come from agriculture. The aim of this work was to study the thermodynamic parameters of interaction between HA and multi wall carbon nanotube (MWCNT), clays, oxides and bovine serum albumin (BSA), to contribute to a better understanding of the factors that lead to stabilization of carbon in the soil, even with agricultural activities. For this, we investigated MWCNT-HA interaction at different pHs and ionic strength through adsorption isotherm and the technique of isothermal titration calorimetry, ITC (Chapter 1); the influence of the Hofmeister series in interaction HA- MWCNT via adsorption isotherm and ITC (Chapter 2); the interaction between HA and clay minerals at different ionic strengths via adsorption isotherms and ITC (Chapter 3) and HA-BSA interaction at different pHs and ionic strengths via fluorescence spectroscopy and ITC (Chapter 4). The thermodynamic analysis in all chapters demonstrated that the interaction of HA with different surfaces and substances is spontaneous ($\Delta_{ads}G^{\circ} < 0$). On the first study (Chapter 1) we provided that MWCNT HA adsorbed mainly in the more acidic pH. Ionic strength, salt type and origin of HA influence on the adsorption process. The model that best fitted was Langmuir isotherm. Thermodynamic analysis showed that the adsorption enthalpy is favorable for all systems studied. The second study (Chapter 2) shows high

values of Γ , which shows great potential of MWCNT in to adsorb HA. Moreover, it appears that the adsorption depends on the nature of the salts of the Hofmeister series and that the adsorption does not follow this series. Thermodynamic analysis shows that the process is enthalpically favorable for anionic Hofmeister series. The third chapter shows that the adsorption mechanism of HA on clay minerals depends on the nature of surface, of polyelectrolyte concentration and pH. The model that best fitted the systems studied was the Langmuir, except for montmorillonite at pH 4.0 and 6.0. The adsorption process is enthalpy and / or entropically favorable depending on the system. In chapter 4, the emission spectra showed that there is an intense BSA-HA interaction. There was an effect of ionic strength of the salt KCl in BSA-HA interaction. Entropy was positive for buffer systems 3.6 and 4.8 in the presence of 50 mM KCl, while in the first to enthalpy variation was unfavorable. The other systems, there was not a favorable entropic contribution for BSA-HA interaction, therefore, the process being driven by enthalpy.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Ácido húmico

Os quatro principais compartimentos de carbono na Terra são: oceanos, atmosfera, formações geológicas contendo carbono fóssil e mineral e ecossistemas terrestres, sendo que o maior compartimento de carbono na Terra está presente no oceano, seguido do compartimento presente nas formações geológicas. O carbono das formações geológicas está presente no carvão, no petróleo e no gás natural. Já o compartimento de carbono do solo é o maior nos ecossistemas terrestres, aproximadamente quatro vezes o compartimento de C da vegetação e 3,3 vezes o carbono da atmosfera, e é constituído pelo carbono orgânico e mineral ¹. Compreender a relação destes compartimentos de carbono e a ação antropogênica no aumento do efeito estufa pode contribuir para a mitigação da liberação dos gases causadores deste efeito.

Os ecossistemas terrestres são considerados atualmente como um grande sumidouro de carbono, especialmente os solos. Há várias maneiras pelas quais o manejo apropriado da biosfera terrestre, particularmente do solo, possa resultar em significativa redução no aumento dos gases de efeito estufa.

Existem dois momentos no manejo do solo de forte emissão de CO₂ para a atmosfera: um no desmatamento seguido da queimada e outro no preparo do solo pela aração seguida de sucessivas gradagens niveladoras. Este último processo predispõe o solo à erosão hídrica, que contribui para o agravamento das emissões de CO₂ para a atmosfera.

A ideia contida no cenário mundial foi que promovendo a adoção de práticas agrícolas com conservação do solo seria possível não apenas aumentar a produtividade agrícola como, também, transformar os solos agrícolas em drenos ou sumidouros de CO₂ atmosférico, ou seja, transformar o carbono presente na atmosfera (na forma de CO₂) em carbono estocado no solo, compondo a matéria orgânica do solo ¹.

O solo pode ser decomposto em quatro grandes componentes: compostos minerais, orgânicos, solúveis e gases, sendo que a matéria orgânica do solo tem sido reconhecida como uma das principais fontes de estudo, devido à agricultura e, principalmente, a possibilidade de sequestro de carbono e a consequente diminuição de emissão dos gases geradores do efeito estufa ².

A matéria orgânica é o resultado das ações biológicas, químicas e físicas, climáticas e edáficas, por isso é denominado como um complexo sistema de substâncias carbônicas. Grande parte da matéria orgânica do solo é composta por material humificado (> 90%), o que torna este material um representante da matéria orgânica ³.

Em acordo com Konova (1982), as substâncias húmicas constituem de 85 a 90% a reserva total do carbono orgânico e são encontradas em quase todos os solos, sedimentos e águas naturais. São formadas por transformações físicas, químicas e biológicas de plantas, animais e microrganismos e apresentam papel fundamental nas características do solo ².

Apesar de Achard (1786) ter sido o primeiro a isolar e fracionar as substâncias húmicas, foi Berzelius (1806) que propôs uma classificação que ainda é muito utilizada ². Ele baseou a classificação na solubilidade das frações húmicas em meio alcalino ou ácido. Assim, este pesquisador considerou como HA a fração solúvel em meio alcalino e a humina a fração inerte tanto em meio básico quanto em meio ácido. Além destes, há ainda os ácidos fúlvicos e o ácido hmatomelânicos (surgido em estudos posteriores). Os primeiros são solúveis em meio alcalino e em meio ácido diluído, porém apresentam um baixo peso molecular quando comparado aos HA; e os segundos, são as frações de ácidos húmicos solúveis em álcoois ².

A presença das substâncias húmicas no solo é essencial para uma agricultura de qualidade. Ela promove maior porosidade no solo, maior capacidade de troca iônica e retenção de umidade, complexação com cátions divalentes e outras propriedades que

influenciam na estruturação da fauna e da flora ². Além disso, a característica mais importante destas substâncias é a sua estabilização no solo para evitar a liberação de gases de efeito estufa ².

Apesar de sua importância, essas substâncias não são muito bem compreendidas. Portanto, a compreensão da físico-química e da estrutura desta substância é essencial para uma aplicação orientada e segura.

Os HA são os componentes majoritários das substâncias húmicas, o que tornam os HA um bom representante das substâncias húmicas ³. Os HA são compostos de coloração escura formados pela associação de macromoléculas heterogêneas de baixo peso molecular. Devido as suas características estruturais, estes ácidos podem interagir com metais e compostos orgânicos, por exemplo, pesticidas e metais pesados presentes no ambiente ^{4,5}.

Dessa forma, acredita-se que a elucidação das forças motrizes das interações entre o HA e outras superfícies e substâncias possibilitarão inferir sobre a estrutura, a organização e o comportamento daquela substância no meio ambiente. Assim, ampliará a compreensão do processo de sequestro de carbono no solo e, então, melhorar a eficiência desse processo. Além disso, possibilitar a formação de um nanoagregado para aplicações direcionadas e controladas.

Um dos parâmetros utilizados para este objetivo é a variação da entalpia de interação, medida, por exemplo, pela técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Além deste parâmetro termodinâmico, há outros que auxiliam na compreensão de todo o processo, como por exemplo, a variação da entropia (ΔS) e a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) ⁶. A ITC, portanto, possibilita o monitoramento do processo de ligação ^{7,8}.

1.2. Nanotubos de carbono

O carbono tem quatro elétrons na camada de valência, cuja configuração, no

estado fundamental, é $2s^2 2p^2$. O diamante e o grafite são considerados como duas formas cristalinas naturais de carbono puro que se diferenciam pela natureza da ligação entre dois carbonos adjacentes. Outras formas de ligação entre os átomos de carbono podem gerar estruturas fechadas, como os fulerenos e os nanotubos de carbono (CNTs) ^{9,10,11}.

Os CNTs podem ser visualizados como nanoestruturas cilíndricas com diâmetros da ordem de nanômetros e comprimentos de microns, acarretando a grandes razões comprimento/diâmetro. Eles podem ser de duas categorias: (i) nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs, do inglês single-wall carbon nanotubes), que são constituídos por apenas uma camada cilíndrica de grafite; (ii) nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês multi-wall carbon nanotubes), que são constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite, espaçados de 0,34-0,36 nm um do outro ¹². As propriedades diferentes e únicas destas estruturas se encontram relacionadas com a combinação da dimensão, da estrutura e da topologia.

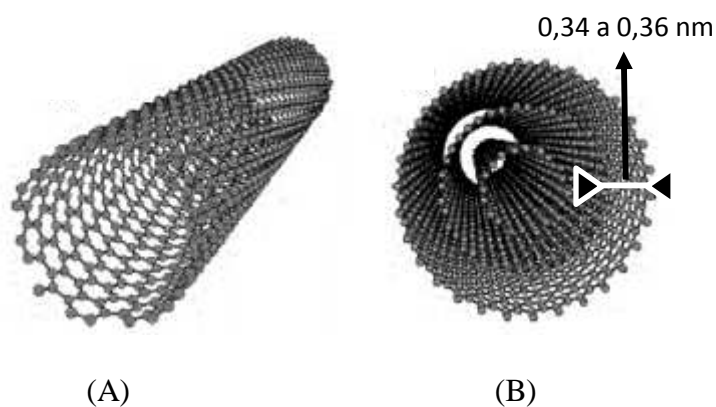


Figura 1. (A) Nanotubos de carbono de parede simples e (B) nanotubos de carbono de paredes múltiplas. (Adaptação) ¹³.

Possivelmente, a primeira série de imagens de CNTs em microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução foi obtida por Endo, em meados de 1970 ¹⁰. Endo desejava analisar a estrutura interna das fibras de carbono produzidas por pirólise de benzeno e ferroceno a 1000 °C e, com isso, elucidar e controlar o mecanismo de crescimento das mesmas. Por isso, as estruturas nanométricas não causaram grande impacto, já que os pesquisadores da época estavam mais interessados nas fibras de

carbono.

Somente 21 anos depois, Iijima, usando a microscopia eletrônica de transmissão e difração de elétron, reportou a existência dos nanotubos de carbono ¹¹. Este material foi gerado num reator de descarga por arco de fulerenos.

Atualmente, os CNTs podem ser obtidos por uma ampla variedade de processos, tais como descarga por arco, ablação por laser, deposição química de vapor e outros.

As diferentes direções do enrolamento fornecerão três tipos de CNTs: *armchair*, *zigzag* e quiral. Cada um deles terá uma propriedade diferenciada, pois a maneira com que a camada de grafite foi enrolada influencia diretamente na posição das bandas de valência e condução das nanoestruturas. Desta forma, dependendo da sua simetria, os CNTs terá propriedade metálica ou semicondutora.

As diferentes propriedades elétricas, magnéticas, ópticas e mecânicas dos nanotubos de carbono tornam-os interessantes para diversas aplicações. Uma vez que determinadas aplicações exigem nanotubos de carbono com um grau maior de uniformidade de diâmetro e quiralidade, com maior pureza, com ausência de defeitos estruturais e em grande quantidade, verifica-se a necessidade de caracterizar essas estruturas após a síntese.

1.2.1. Caracterização

A caracterização dos produtos formados na síntese de CNTs é uma etapa importante para a nanotecnologia, uma vez que a qualidade, a simetria e a pureza dos materiais é que direcionarão as suas aplicações. Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para caracterização morfológica e estrutural destas nanoestruturas, porém as mais amplamente utilizadas são: microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de raios X (DRX) e análise termogravimétrica (TG) e espectroscopia Raman, principalmente para os SWCNT.

A MEV permite visualizar a morfologia da estrutura, enquanto que a MET fornece

tanto a informação da forma do nanotubo quanto do diâmetro interno e externo, além do número de paredes e do espaçamento entre elas. Já a difração de raios X permite obter informações sobre o espaçamento entre as camadas de grafeno, tensão estrutural e a pureza da síntese. A análise termogravimétrica é utilizada para verificar a pureza do material ⁹.

1.2.2. Aplicações

As propriedades únicas dos nanotubos de carbono fazem deste material um alvo de estudos que visam suas aplicações em diversas áreas. Algumas propriedades de interesse são a alta resistência mecânica, a capilaridade, a estrutura eletrônica peculiar e a elevada área superficial.

Algumas das muitas aplicações em potenciais destas estruturas são:

- i. Aditivos para materiais poliméricos: criação de nanocompósitos com características específicas, como o aumento em 40% da tensão elástica e 25% mais de resistência à tração ¹⁴;
- ii. Materiais adsorventes de gases: remoção de gases prejudiciais ao meio ambiente ¹⁵;
- iii. Aplicações biotecnológicas: desenvolvimento de biossensores e biorreatores ^{16,17};
- iv. Adsorventes de metais pesados em efluentes ¹⁸;
- v. Peneira molecular ¹⁹.

Um estudo recente e de grande motivação para o estudo atual mostrou a utilização de CNTs na germinação de sementes de tomates, cuja presença da nanoestrutura proporcionou uma taxa de germinação mais rápida e maior produção de biomassa para as plantas. Desta forma, este efeito pode significar uma importância econômica para a agricultura, horticultura e o setor de energia ²⁰.

1.3. Termodinâmica de adsorção

A elucidação das propriedades termodinâmicas do processo de interação do HA em superfícies possibilitará uma aplicação mais direcionada e controlada do produto deste processo, ou seja, o controle da formação de filmes moleculares com propriedades óticas, elétricas e mecânicas moduláveis bem como o preparo de suspensões ou dispersões termodinamicamente estáveis. Para elucidar e compreender essas propriedades e a estabilidade dessas suspensões é preciso que se compreendam determinados conceitos fundamentais, como fase, interface e tensão interfacial de um sistema.

O que vai caracterizar uma fase é a igualdade das propriedades termodinâmicas intensivas em todos os pontos pertencentes à fase no equilíbrio termodinâmico. Entre duas fases distintas em contato tem-se a interface. Esta é uma região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas têm valores intermediários entre as duas fases em contato e estes valores dependem da posição de z , onde poderemos determinar que a fase α é a fase líquida e a fase β a fase sólida ^{8,21}.

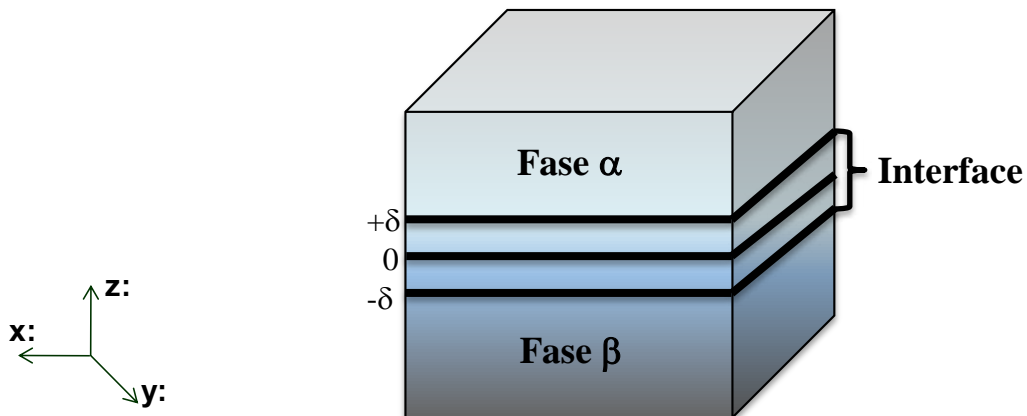


Figura 2. Sistema composto de duas fases e a interface delimitada entre $-\delta$ e $+\delta$.

J.W. Gibbs foi o primeiro a propor um método para idealizar a interface. Ele propôs uma superfície que dividia as duas fases matematicamente. Assumiu que as fases α e β são separadas por uma camada limite infinitesimalmente fina, conhecida como o

plano de divisão de Gibbs, como pode ser visto na Figura 2 (eixo 0). Apesar de Gibbs considerar essa superfície apenas como um plano, desconsiderando o volume, e, portanto, se afastar da realidade, o seu conceito é consistente e permite aplicar a termodinâmica nos processos de superfície ²².

Geralmente, a influência dos efeitos de superfície sobre as propriedades termodinâmicas do sistema é negligenciável. No entanto, em alguns casos, onde a relação entre a área de superfície e o volume é elevada, tais como nos sistemas coloidais (por exemplo, interação HA-CNTs), os efeitos de superfície são significativos ²³. Nestes sistemas, a mistura termodinamicamente desfavorável na interface gera um excesso de energia livre de Gibbs em relação às energias livres de Gibbs em cada uma das fases, num mesmo elemento de volume, altera a energia livre de Gibbs do sistema ^{8,21}.

Este excesso de energia livre de Gibbs pode ser definido termodinamicamente como o incremento de energia livre de Gibbs quando se expande a área interfacial reversivelmente por uma unidade, mantendo como constantes a temperatura, a pressão e a composição do sistema ²³. Para uma variação da energia livre de Gibbs de um sistema heterogêneo num processo reversível, temos:

$$dG = Vdp - TdS + \sum \mu dn_i + \gamma dA \quad (1)$$

onde G é a energia livre de Gibbs do sistema, T é a temperatura, S é a entropia, p é a pressão, V o volume, μ é o potencial químico do componente i, n_i é a quantidade de substância de i no sistema, γ é a tensão interfacial e A a área da interface. Todavia, na prática processos a p, T e n_i são constantes e, portanto, a tensão interfacial pode ser definida como:

$$\gamma = \left(\frac{\delta G}{\delta A} \right)_{T,P,n_i} \quad (2)$$

Um dos processos para diminuir o excesso de energia livre de Gibbs da interface e, conseqüentemente, reduzir a energia livre de Gibbs do sistema é a adsorção de uma molécula na interface. A adsorção é um fenômeno espontâneo no qual um dos

componentes do sistema se concentra mais na interface do que nas duas fases em contato. Dessa forma, qualquer alteração na interface irá alterar o processo adsorptivo, ou seja, as atrações eletrostáticas, as ligações covalentes, as ligações de hidrogênio, as interações apolares e laterais irão contribuir para este fenômeno, sendo que as quatro primeiras envolvem as interações adsorbato e adsorvente e a última somente as interações intra-adsorbatos. Matematicamente, podemos definir a adsorção como a quantidade de material adsorvido por unidade de área que seria igual ao número total de moléculas subtraído do número de moléculas de cada fase e dividido pela área interfacial ²³.

$$\Gamma_i = \frac{N_{T,i} - N_{\alpha,i} - N_{\beta,i}}{S} \quad (3)$$

onde Γ_i é a quantidade do componente i adsorvido por unidade de área da interface, $N_{T,i}$ é o número de mols total do componente i , $N_{\alpha,i}$ e $N_{\beta,i}$ são os números de mols do componente i nas fases α e β , respectivamente, e S é a área superficial. Todavia, o término de uma fase e o início da outra não ocorre de forma pontual em uma área ou plano conforme definiu Gibbs.

Para se considerar toda a extensão da interface no eixo z , considera-se uma interface delimitada entre $+\delta$ e $-\delta$ e dividida pelo eixo 0 , conforme a Figura 1.

Dessa forma a equação 3 torna-se:

$$\Gamma_i = \int_{-\infty}^{-\delta} [C_i^s(z) - C_i^\alpha] dz + \int_{-\delta}^0 [C_i^s(z) - C_i^\alpha] dz + \int_0^{+\delta} [C_i^s(z) - C_i^\beta] dz \quad (4)$$

$$+ \int_{+\delta}^{+\infty} [C_i^s(z) - C_i^\beta] dz$$

Onde o sobrescrito s corresponde a superfície/interface. Considerando que a concentração do componente i nas fases α e β não variam ao longo do eixo z , temos:

$$\Gamma_i = \int_{-\delta}^0 [C_i^s(z) - C_i^\alpha] dz + \int_0^{+\delta} [C_i^s(z) - C_i^\beta] dz \quad (5)$$

Considerando que o componente i não se move espontaneamente para a fase β , o segundo termo da equação 5 é nulo, então:

$$\Gamma_i = \int_{-\delta}^0 [C_i^s(z) - C_i^\alpha] dz \quad (6)$$

Aplicando o teorema do valor médio obtemos:

$$\Gamma_i = [\bar{C}_i^s - \bar{C}_i^\alpha] \delta \quad (7)$$

Onde δ é a espessura da interface e \bar{C}_i^s é um valor médio da concentração do componente i , já que a concentração do componente i varia ao longo do eixo z na interface.

Considerando Γ_i muito grande temos que $\bar{C}_i^s \gg \bar{C}_i^\alpha$, assim:

$$\Gamma_i = [\bar{C}_i^s] \delta \quad (8)$$

Pela análise desta equação observa-se que a quantidade de componente i adsorvida na interface de um sistema é a multiplicação da concentração deste componente na superfície pela espessura da mesma ²¹.

Se em um experimento ocorrer alteração da tensão interfacial do sistema ao adicionar um componente, pode-se concluir que houve transferência de moléculas do seio da solução para a interface do sistema ²⁴. Portanto, temos:

$$G_T = \gamma + \Gamma_i \mu_i \quad (9)$$

Sendo G_T a energia livre de Gibbs necessária para ocorrer adsorção. Assim, a adsorção de moléculas na interface tem duas contribuições: a alteração na tensão interfacial (γ), devido a mudanças das interações e orientações das moléculas da interface, e o trabalho químico ($\Gamma_i \mu_i$) referente à transferência de moléculas do soluto da solução para a interface.

Derivando a equação 9 em relação a μ_i , tem-se:

$$\frac{\delta G_T}{\delta \mu_i} = \frac{\delta \gamma}{\delta \mu_i} + \frac{\delta(\Gamma_i \mu_i)}{\delta \mu_i} \quad (10)$$

Considerando que todos as outras condições do sistema encontram-se constantes, iremos multiplicar e dividir o termo $\frac{\delta G}{\delta \mu_i}$ da equação 10 por $\delta \Gamma_i$ tem-se $\frac{\delta G}{\delta \Gamma_i} \cdot \frac{\delta \Gamma_i}{\delta \mu_i}$.

Considerando $\frac{\delta G}{\delta \Gamma_i} = \mu_i$ e substituindo essas considerações na equação 10 e resolvendo a diferencial do produto $\Gamma_i \mu_i$, tem-se:

$$\Gamma_i = -\frac{\delta \gamma}{\delta \mu_i} \quad (11)$$

A equação 11 é a equação fundamental de adsorção de Gibbs para qualquer substância. É importante ressaltar que pela análise desta equação verificamos exatamente a causa do processo adsorptivo. Só haverá adsorção se a razão entre a taxa de variação da tensão interfacial pela variação do potencial químico for negativa, de tal forma que o produto desta equação seja positivo. Isto indica que houve maior transferência de moléculas para a interface quando comparado com as fases. Isso só ocorrerá quando houver a diminuição do excesso de energia livre de Gibbs na interface e concomitantemente o aumento do potencial químico da substância. Todavia, determinar a quantidade do componente i adsorvida por esta equação é complexo pela necessidade de determinar o potencial químico experimentalmente.

Para resolver esta questão, é importante lembrar que $\mu_i = \mu_i^\theta + RT \ln a_i$ e que para soluções ideais e idealmente diluídas tem-se: $\mu_i = \mu_i^\theta + RT \ln C_i$. Além disso, derivando em relação a C_i , esta equação torna-se:

$$\frac{\delta \mu_i}{\delta C_i} = \frac{\delta \mu_i^\theta}{\delta C_i} + RT \frac{1}{C_i} \quad (12)$$

Como μ_i^θ não varia com C_i , $\frac{\mu_i^\theta}{C_i}$ é constante e $\frac{\delta \mu_i^\theta}{\delta C_i} = 0$, assim:

$$\frac{\delta \mu_i}{\delta C_i} = RT \frac{1}{C_i} \quad (13)$$

Substituindo a equação 13 na equação 11 tem-se:

$$\Gamma_i = - \frac{C_i}{RT} \frac{\delta\gamma}{\delta C_i} \quad (14)$$

A equação 14 é válida apenas para soluções ideais ou idealmente diluídas e é mais facilmente obtida experimentalmente do que a equação 11. Para a determinação Γ_i pode-se medir γ em função de C_i e por meio de um gráfico obter Γ_i . Para aqueles sistemas em que é difícil determinar a tensão interfacial, pode-se construir uma isoterma de adsorção e obter a tensão interfacial.

A isoterma de adsorção é uma função que relaciona a quantidade de substância adsorvida por unidade de área interfacial ou quantidade de substância do soluto adsorvida por grama de adsorvente com a concentração de equilíbrio do adsorbato na solução. A isoterma permite a compreensão do mecanismo de adsorção ²⁵.

1.4. Série de Hofmeister

Os íons têm um papel fundamental em muitos processos naturais, biológicos e tecnológicos e, por isso, o estudo e a compreensão do mecanismo de atuação de cátions e ânions são importantes ²⁶.

Franz Hofmeister foi o primeiro pesquisador a estudar o efeito de íons na precipitação de proteínas ²⁷. Embora, ainda hoje, haja um debate sobre a importância relativa de interações diretas íon-íon e de interações íon-água para explicar ou prever o efeito destes íons, existem modelos que procuram elucidar este mecanismo. Um dos modelos propostos se baseia no efeito destes íons na estrutura tridimensional das moléculas de água ²⁸. Aqueles íons que aumentam a organização entre as moléculas de água seriam denominados de íons cosmotrópicos e ocasionariam a diminuição da solubilidade da proteína. Aqueloutros que diminuem a organização entre as moléculas de água seriam os íons caotrópicos e promoveriam a solubilidade da proteína. Dessa forma, a série de Hofmeister ou série liotrópica consiste em uma ordem de sais de acordo com o seu efeito

na precipitação das proteínas ²⁹ estudada pelo Hofmeister, sendo representado pela Tabela 1.

Tabela 1. Série de Hofmeister

	Cosmotrópico		Estabilizante		Desestabilizante			Caotrópico	
Ânions	F ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	SCN ⁻	
Cátions	(CH ₃) ₄ N ⁺	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺ Ba ²⁺

1.5. Outras superfícies adsorventes e outras interações

1.5.1. Argilominerais

A literatura sobre argilas é extensa e apresenta algumas divergências devido à heterogeneidade das mesmas. No entanto, pode-se definir argila como sendo uma rocha constituída essencialmente por um grupo de minerais que recebem o nome de argilominerais, sendo que estes últimos são silicatos de Al, Fe e Mg hidratados, com estruturas cristalinas em camadas (filossilicatos), constituídos por folhas contínuas de tetraedros de SiO₄, ordenados de forma hexagonal, condensados com folhas octaédricas de hidróxidos de metais tri e divalentes ².

A maioria dos argilominerais, naturalmente, é constituída essencialmente por partículas com algumas dimensões geralmente abaixo de 2 µm, podendo conter uma fração com dimensões na faixa de 1 a 100 nm. Os argilominerais são classificados em grupos com base nas semelhanças em composição química e na estrutura cristalina. As estruturas cristalinas são classificadas em 2 tipos: estruturas 1:1 e estruturas 2:1.

Nas estruturas 1:1 estão os grupos: caulinita, serpentinas e ferríferos. Nas estruturas 2:1 estão os grupos: talco-pirofilita, micas, esmectitas, vermiculitas, cloritas e paligorsquita–sepiolita. Além destes argilominerais, existe um pequeno número de argilominerais componentes das argilas industriais: caulinita, montmorilonita, talco, vermiculita e amianto crisotila (amianto) ³⁰.

Grim (1968) diz que não é possível descrever uma argila por um número pequeno

de propriedades e que geralmente os fatores que controlam as propriedades de uma determinada argila são ³¹:

- A composição mineralógica dos argilominerais e a distribuição granulométrica destas partículas;
- A composição mineralógica dos não-argilominerais, qualitativa e quantitativa, e a distribuição granulométrica destas partículas;
- Teor de eletrólitos;
- Natureza e teor de componentes orgânicos;
- Características texturais da argila.

Outras propriedades das argilas estão diretamente relacionadas com suas aplicações, como por exemplo: tamanho das partículas, plasticidade, retração, refratariedade ³².

As argilas são utilizadas pelo homem desde a antiguidade nas mais diversas aplicações. É responsável por uma série de processos considerados naturais, atuando como catalisadores, como por exemplo, em transformações químicas em solos e formação de petróleo ³³.

Inúmeros estudos são atualmente desenvolvidos pela ciência de novos materiais com o objetivo de criar materiais capazes de atuar com grande eficácia em processos adsorptivos e catalíticos ³⁴. Neste contexto, estes materiais são conhecidos por formar complexos com moléculas orgânicas naturais e antropogênicas encontrados nos solos e sedimentos ³⁵. Esta complexação pode afetar a atividade biológica destes compostos orgânicos ³⁶. Alguns pesquisadores sugerem seis mecanismos de adsorção de matéria orgânica em superfícies minerais: troca de ligantes, pontes de cátions, troca de ânion, troca de cátion, interações de van der Waals e efeito hidrofóbico ³⁶⁻³⁷.

A troca de ligantes envolve a troca de grupos ácidos da matéria orgânica, por exemplo grupos carboxílicos e fenólicos para grupos hidroxílicos na superfície. É

provável que é este o mecanismo dominante para a adsorção de substâncias húmicas e matéria orgânica em alumínio hidratado e superfícies de óxido de ferro em água doce.

Pontes de cátions são formadas quando os cátions funcionam como uma ponte entre as cargas negativas da superfície mineral e grupos aniônicos ou grupos polares do polímero orgânico. Muitas vezes, uma molécula de água permanece entre o cátion e o grupo funcional de modo que o polímero esteja ligado por ligações de hidrogênio. Neste caso, as pontes são denominadas pontes de água. Cátions polivalentes estabelecem pontes mais eficazes do que os monovalentes.

Na troca de ânions, um ânion orgânico é trocado por um ânion inorgânico e associados com uma superfície positivamente carregada por atração coulombiana simples.

A troca de cátions é semelhante à troca aniônica, exceto pelo cátion orgânico e por associar-se a uma superfície carregada negativamente. Isto é importante para os as superfícies de aluminossilicatos carregadas negativamente.

Interações de van der Waals são de curto alcance, apresentam associações aditivas, e só se tornam significativas em força iônica elevada ou quando o sistema pode ser desidratado. Essas interações são muito importantes na água do mar, devido à elevada força iônica que ocasiona a diminuição da espessura de dupla camada elétrica, conduzindo a uma redução das forças de repulsão eletrostáticas entre polímeros orgânicos carregados negativamente e as superfícies de argila de carga negativa. Isto permite maior aproximação do polímero orgânico para a superfície, e, por conseguinte, o aumento da interação de van der Waals.

Os efeitos hidrofóbicos envolvem as interações desfavoráveis entre as porções apolares da matéria orgânica e a água, o que torna o processo dirigido pela entropia ³⁶.

Apesar do conhecimento destes seis mecanismos, a adsorção de substâncias húmicas em argilas ainda tem sido bastante investigada com o objetivo de compreender

mais profundamente estes mecanismos e conseguir controlá-los no solo ³⁸.

1.5.2. Óxidos

A decomposição dos resíduos de origem vegetal tem papel fundamental na dinâmica da matéria orgânica, nas características químicas, físicas e biológicas do solo e grande importância no fenômeno de aquecimento global ³⁹. Durante os processos de decomposição e mineralização dos resíduos de culturas, compostos orgânicos e nutrientes são liberados para o solo, onde podem sofrer vários tipos de interação com a fase mineral.

Dessa forma, íons ou moléculas da solução podem ser adsorvidos nas superfícies de argilominerais ou óxidos, modificando o seu comportamento no solo, principalmente quanto à disponibilidade para as plantas e transporte no perfil ³⁷. Considerando essa interação, as moléculas orgânicas podem tornar-se protegidas fisicamente, dificultando o uso do carbono orgânico como um substrato pelos microrganismos ⁴⁰. Este fenômeno pode, portanto, alterar a taxa de decomposição dos materiais orgânicos adicionados e, conseqüentemente, influir na dinâmica e na estabilização da matéria orgânica no solo. Desta forma, compreender o mecanismo de interação entre a matéria orgânica e os óxidos possibilitaria um maior controle da estabilização e uma mitigação no efeito estufa antropogênico ⁴¹.

Os processos de intemperização liberam cátions e ânions, originalmente presentes na rocha matriz, que se recombina formando outros minerais mais estáveis. Particularmente, Al e Fe, associados ao O, formam os óxidos, hidróxidos ou oxidróxidos que são estáveis em solos intemperizados ³⁵. De maneira genérica, estes minerais são chamados de óxidos de Fe e Al. Os óxidos são resultados de altíssima intemperização, que resulta em minerais não silicatados. Não apresentam carga estrutural com resultado de substituição isomórfica, portanto, apresentam baixa capacidade de troca catiônica. Sua carga é de superfície apenas, limitada ao pH do meio em que se encontram ^{42,43}.

As formas cristalinas mais freqüentes e abundantes dos óxidos de Fe do solo são:

goethita (α -FeOOH) e hematita (α -Fe₂O₃). Ocorrem também nos solos óxidos de Fe mal cristalizados ou amorfos chamados de ferrihidrita, considerada como precursora da hematita e sem fórmula definida ⁴⁴.

A formação dos óxidos de Fe é dependente do teor de ferro do material de origem e das condições ambientais, sendo que por processos de cristalização e desidratação, a ferrihidrita pode transformar-se em hematita. Entretanto, ausência de oxigênio e a presença de agentes complexantes de Fe inibem a cristalização. Assim, os principais fatores que favorecem a formação da goethita em detrimento da hematita no solo são: menores teores de Fe no material de origem, baixas temperaturas, maiores graus de umidade e matéria orgânica e valores de pH mais baixos ⁴⁴.

Normalmente, os óxidos de Fe determinam a cor e influenciam a estrutura e reações de troca iônica dos solos. A presença da goethita no solo é constatada pela sua coloração amarelada; já a hematita confere ao solo uma coloração avermelhada ⁴⁵.

Outro óxido de grande ocorrência nos solos são os de Al na forma de gibbsita - (α -Al(OH)₃) ⁴⁶. A gibbsita é um dos minerais mais comumente encontrados nos solos altamente intemperizados, sendo um dos principais componentes da fração argila dos mesmos. O mineral é constituído pela união de octaedros de Al, de forma que os átomos de Al ficam na parte interna da estrutura, com uma camada de hidroxilas na parte inferior e outra na superior, onde a ligação entre as unidades cristalográficas é feita por ligações de hidrogênio ⁴³.

A adsorção de metais pesados pela superfície da gibbsita, assim como da hematita e goethita, é considerada específica, devido ao forte caráter covalente da ligação do cátion com o oxigênio da superfície do mineral ⁴³.

1.5.3. Proteína albumina do soro bovino (BSA)

Proteínas são biopolímeros constituídos por monômeros denominados aminoácidos ligados por ligações peptídicas e existentes em todos os organismos vivos.

De acordo com sua composição, são classificadas em dois grandes grupos: as proteínas simples, como a albumina, que quando hidrolisadas geram apenas os aminoácidos; e as proteínas conjugadas que, quando hidrolisadas, geram os aminoácidos junto com outros componentes como carboidratos e gorduras ⁴⁷.

As proteínas podem ter quatro diferentes tipos de classificação estrutural, dependendo do tipo de aminoácidos que possui, do tamanho da cadeia e da configuração espacial da cadeia polipeptídica. A estrutura primária é definida pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dela deriva todo o arranjo espacial da molécula e são específicas para cada proteína. A estrutura secundária é atribuída ao arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína. As estruturas secundárias podem ser duas: a alfa-hélice, mais comum, que ocorre por ligações covalentes e pontes de dissulfeto intramoleculares caracterizada por uma hélice em espiral; e a folha-beta (ou folha pregueada), é formada por ligações extra moleculares, que envolve dois ou mais segmentos polipeptídicos da mesma molécula. Já a estrutura terciária de uma proteína resulta do enrolamento da hélice ou da folha pregueada, ou ainda das duas simultâneas. Esta estrutura confere a atividade biológica às proteínas ⁴⁷.

As proteínas podem ser classificadas também de acordo com a sua forma tridimensional em: fibrosas (insolúveis, como por exemplo o colágeno e a queratina), as quais são formadas por cadeias de polipeptídios organizados “lado a lado” em longos filamentos; e globulares (solúveis, são exemplos a hemoglobina e a insulina), que têm estrutura compacta e quase esférica ⁴⁷.

As forças que estabilizam a estrutura terciária das proteínas são as interações hidrofóbicas, as pontes de dissulfetos e as forças por atração iônica entre sítios positivos e negativos das várias cadeias laterais de aminoácidos do interior da proteína, contribuem para complementar a estrutura terciária ⁴⁷.

As albuminas constituem uma classe de proteína cuja função é transportar moléculas menores no organismo, como metabólitos, anti-coagulantes, ácidos graxos entre outras ⁴⁸. Em especial, as albuminas ligam ácidos graxos sendo responsáveis pela remoção destas substâncias livres da corrente sanguínea. A soroalbumina é a maior proteína globular existente no plasma (peso molecular de ≈ 66 kDaltons). Sua concentração média é de 5 g/100 mL e contribui com 80% da pressão sanguínea osmótica do sistema circulatório ^{48,49,50}. Além disso, essa proteína está presente também no soro do leite.

A estrutura primária da BSA é constituída de uma única cadeia com 581 resíduos de aminoácidos. Cerca de 67% da estrutura secundária é formada por α -hélice de 6 voltas e 17 pontes de dissulfeto e, sua estrutura terciária é globular, composta por 3 domínios que conferem à molécula a forma de um coração, com raio de giro $\approx 32 \text{ \AA}$ ^{50,51,52}.

O domínio I estende-se do resíduo 1 ao 191 e neste domínio ocorre uma grande afinidade para Hg^{2+} , Au^+ , ácidos graxos, triptofano, corantes e compostos com anéis alicíclicos ⁵¹. O domínio II estende-se do resíduo 192 ao 379 e nesta região se verifica a maior afinidade para compostos como bilirrubina, digitoxina, ácidos graxos de cadeias curtas, corantes e outros fármacos. O domínio III estende-se do resíduo 380 ao 580 e, nesta região, verifica-se grande afinidade por ácidos graxos de cadeias curtas e constitui o maior sítio de ligação de fármacos ^{50,51,53}.

A BSA possui seu ponto isoelétrico em pH 4,7. Estruturalmente, a BSA é muito semelhante à albumina do soro humano, HSA, mantendo cerca de 76% da identidade sequencial da HSA e, sob o ponto de vista espectroscópico, difere por ter dois resíduos de triptofano, o W131 e o W214, enquanto que a HSA possui apenas o W214 ^{50,51,54,55}.

1.6. Técnicas utilizadas

1.6.1. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os experimentos de titulação calorimétrica para determinação da variação de entalpia são realizados em equipamentos denominados de calorímetros. Neste trabalho, os experimentos foram realizados em um microcalorímetro de titulação isotérmica. Tal equipamento consegue detectar fluxos de energia da ordem de $0,02 \mu\text{W}$ através de termopilhas que se encontram entre as celas de amostra e referência. O equipamento utiliza duas torres, as quais se conectam celas com volume de aproximadamente 1,8 mL. Em uma das celas adiciona-se a amostra que será titulada e na outra, uma amostra de referência.

Os experimentos de titulação calorimétrica consistem em adições consecutivas de soluções concentradas de um analito num vaso calorimétrico de volume total igual a 1,8 mL, contendo o adsorvente em uma solução ou outra substância de interesse. Experimentos comparativos, nos quais são colocados no vaso calorimétrico somente o solvente, sempre são realizados para cada conjunto, objetivando assim a determinação dos parâmetros termodinâmicos associados aos processos de diluição do analito.

O ITC utilizado apresenta dois canais de titulação, um contendo a cela para a amostra e outra uma cela de referência (preferencialmente com material inerte ou possuindo a mesma capacidade calorífica e condutividade térmica). A energia liberada ou absorvida na cela de reação é detectada por um trocador de calor que fica à sua volta, geralmente um bloco de alumínio. O fluxo de calor é registrado pelas termopilhas posicionadas entre a amostra e o trocador de calor. A diferença de temperatura entre a amostra e o trocador de calor irá gerar um potencial elétrico sobre a termopilha, fornecendo uma corrente elétrica que será medida.

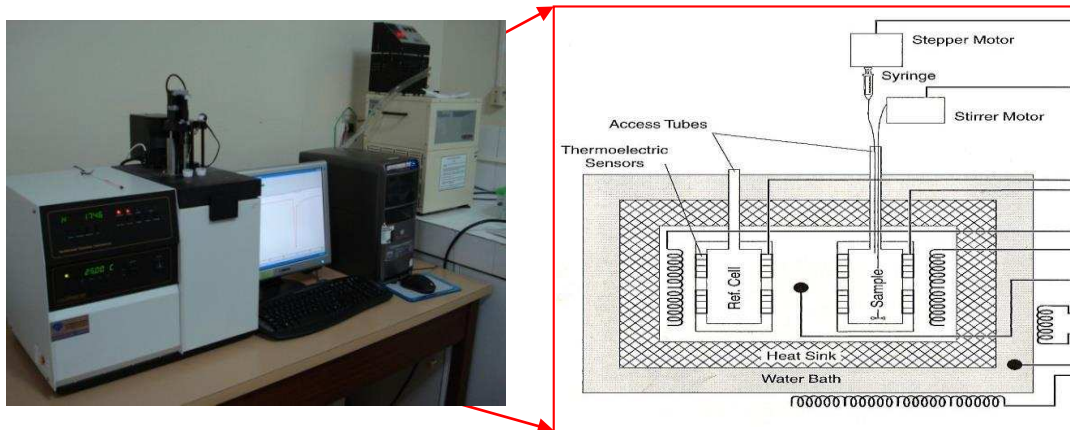


Figura 3. Microcalorímetro de titulação isotérmico.

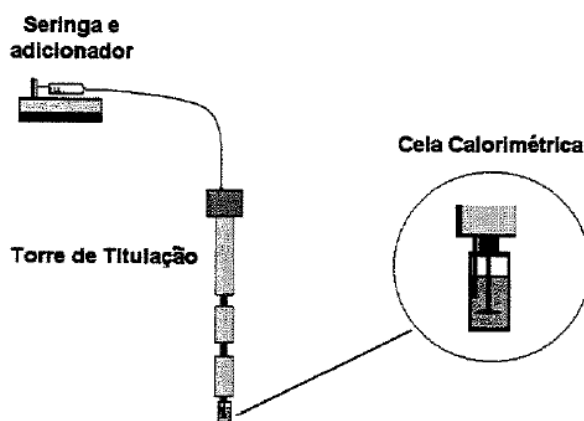


Figura 4. Desenho esquemático do conjunto seringa-torre de titulação.

Todo o experimento de titulação é programado, sendo automatizado em todas as etapas: as adições das soluções do analito são realizadas por meio de seringas *gastight* Hamilton (250 μ L), utilizando-se cânulas capilares feitas de teflon que conduzem a solução até a cela calorimétrica da amostra. As injeções do analito são controladas por um motor de passo comandado por um microprocessador. O intervalo de tempo entre cada injeção é ajustado para cada sistema e a homogeneidade da amostra é garantida por um agitador (350 rpm).

Os valores da energia liberada ou absorvida na forma de calor são obtidos por integrações das deflexões ocorridas a partir da linha base, na curva de potência versus tempo. Em condições de temperatura e pressão constantes, tem-se que a variação de entalpia é numericamente igual à energia na forma de calor envolvido no processo. Assim,

pode-se obter a variação de entalpia ($\Delta_{\text{obs}}H$) associada ao processo, para cada injeção do analito. $\Delta_{\text{obs}}H$ é corrigido pela variação de entalpia de diluição do analito ($\Delta_{\text{dil}}H$) para obter variação de entalpia líquida de interação ($\Delta_{\text{int}}H$). Divisão de $\Delta_{\text{int}}H$ pela estimativa do número de mols do analito que interage com a superfície tem como resultado a variação de entalpia de adsorção do HA ($\Delta_{\text{ads}}H$ em kJ mol^{-1}). Caso, estejamos trabalhando com interação teremos a variação da entalpia de interação. A variação de entalpia padrão de adsorção e interação ($\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ ou $\Delta_{\text{int}}H^{\circ}$) são determinadas considerando a diluição infinita.

Todas as medidas são realizadas mantendo-se a temperatura constante por meio de um banho termostático.

1.6.2. Método de determinação de caracterização de porosidade

Vários métodos foram desenvolvidos a fim de se determinar a distribuição de poros de acordo com seu tamanho. Dentre esses citam-se a microscopia eletrônica^{56,57} e a absorção de raios gama⁵⁸, sendo o método mais comum a determinação da quantidade de um adsorvato necessária para recobrir com uma monocamada a superfície de um adsorvente. Os adsorvatos normalmente utilizados para esse fim são gases, sendo o nitrogênio e o argônio os mais comuns, pois apresentam sempre uma adsorção não-específica com qualquer tipo de sólido^{59,60}.

Quando um sólido é exposto a um gás ou vapor em um sistema fechado à temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, ocorrendo assim um aumento da massa do sólido e um decréscimo da pressão do gás. Após um determinado tempo, a massa do sólido e a pressão do gás assumem um valor constante. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido.

A primeira teoria que relaciona a quantidade de gás adsorvida com a pressão de equilíbrio do gás foi proposta por Langmuir em 1918, no entanto essa teoria só considera

a formação de uma monocamada do gás ⁶¹. Langmuir chegou a formular uma outra proposta que considerasse a formação de camadas múltiplas através do mecanismo de evaporação e condensação, porém a equação era muito complexa.

Na década de 30, Brunauer, Emmett e Teller derivaram uma equação para a adsorção de gases em multicamadas na superfície de sólidos. A equação, denominada BET (letras iniciais dos nomes dos três autores), se baseia na hipótese de que as forças responsáveis pela condensação do gás são também responsáveis pela atração de várias moléculas para a formação de multicamadas. Brunauer, Emmett e Teller generalizaram a equação de Langmuir obtendo a expressão denominada equação de BET:

$$P/V(P_0 - P) = 1/V_m c + [(c-1)/V_m c]P/P_0 \quad (15)$$

Onde $c = \exp[(Q_1 - Q_L)/RT]$, sendo Q_1 é a energia na forma de calor envolvida no processo de adsorção da primeira camada, Q_L é a energia na forma de calor envolvida na condensação do gás e P é a pressão. O volume da monocamada V_m pode ser calculado pela resolução do sistema:

$$b = 1/V_m c \text{ e } a = (c - 1)/V_m c \quad (16)$$

Onde **b** é o coeficiente linear e **a** o coeficiente angular da reta obtida.

A equação de BET foi desenvolvida com o objetivo de relacionar valores obtidos a partir das isotermas de adsorção com a área específica de um sólido. Para tal, obtém-se o volume da monocamada V_m através do volume de gás adsorvido V a uma determinada pressão, equação 16. Todo o tratamento matemático desenvolvido leva em consideração a formação de multicamadas, porém, observou-se que a equação não é válida em toda a faixa de valores de pressão. A relação linear só é obedecida, para a maioria dos sistemas adsorvente/adsorvato, na faixa de valores de pressão relativa entre 0,05 e 0,35. O valor máximo dessa faixa determina o ponto onde começa a formação de camadas múltiplas. Mesmo em sistemas com valores de c altos, para os quais o início da formação da multicamada é bastante evidente, a faixa de validade da equação se mantém a mesma,

diminuindo quando c assume valores menores que 100 ou maiores que 200 ⁵⁹.

1.6.3. Espectroscopia de fluorescência

A luminescência envolve vários tipos de fenômenos óticos, sendo os mais difundidos à fluorescência molecular, à fosforescência e à quimiluminescência. Os métodos baseados nos dois primeiros fenômenos envolvem a excitação da molécula pela absorção de fótons. Assim, a molécula ao absorver o fóton é excitada a um estado eletrônico de maior energia e ao retornar ao estado fundamental emite radiação eletromagnética, se houver emissão de fóton ⁶².

A Figura 5 apresenta o diagrama de Jablonski que representa os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia na faixa ultravioleta ou visível.

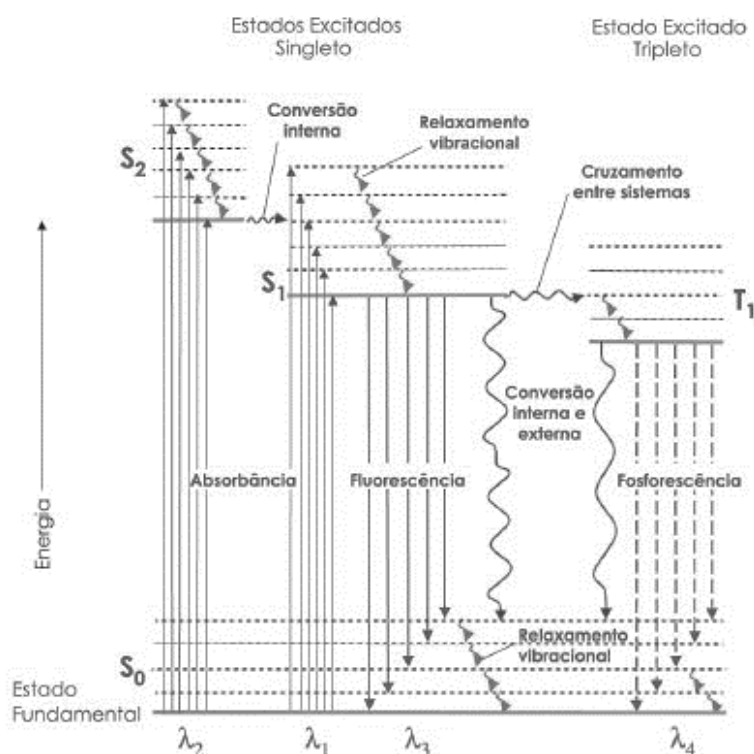


Figura 5. Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia nas regiões ultravioleta ou visível. S₀ é o estado eletrônico fundamental, S₁ e T₁ são os estados excitados singlete e tripleto de menor energia, respectivamente. S₂ é um segundo estado excitado singlete. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas são as transições não-radioativas. (Adaptação) ⁶³

Como observado nesta figura, a transição fluorescente ocorre quando o elétron passa do nível S_0 para o S_1 , emitindo radiação desde o nível excitado S_1 para algum dos níveis vibracionais do estado eletrônico S_0 e sem envolver a mudança no número quântico do spin do elétron. Dessa forma, a fluorescência possui tempos de vida por volta de 10^{-9} a 10^{-6} s. A fluorescência é emitida em comprimentos de onda maiores do que o comprimento de onda da luz usado para a excitação da molécula ^{63,64}.

Quando ocorre uma mudança no número quântico do spin do elétron, ocorre as emissões fosforescentes, o que envolve transições proibidas de elétrons provenientes de um estado excitado tripleto (com spin diferente ao original) para um estado fundamental singlete. Neste caso, a radiação existirá por um tempo maior do que a fluorescência (10^{-4} e 10 s), o que facilita a detecção após o término da irradiação. Todavia, este tipo de transição é menos provável que a transição da fluorescência, uma vez que processos paralelos de desativação como a conversão interna e externa e o relaxamento vibracional, podem competir com a fosforescência ⁶⁴.

A Figura 6 é uma representação esquemática de um espectrofluorímetro típico. A fluorescência proveniente da amostra é propagada em todas as direções, porém é mais convenientemente observada em ângulos retos ao feixe de excitação, empregando arranjo óptico adequado de lentes e espelhos ⁶³.

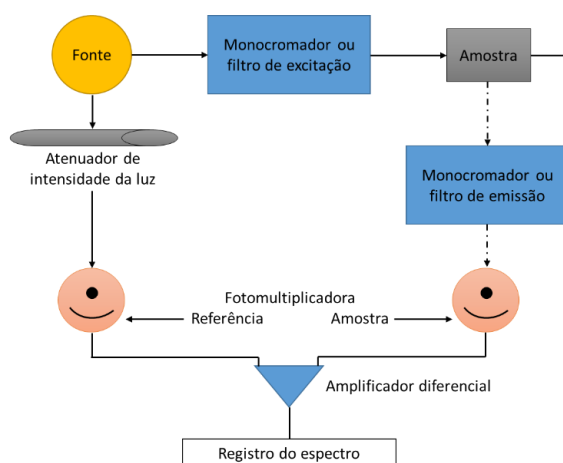


Figura 6. Representação esquemática de um espectrofluorímetro típico.

A fluorescência convencional envolve a obtenção de um espectro de emissão pela varredura em uma determinada faixa de comprimentos de onda (λ_{em}) quando uma amostra é irradiada com um comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) fixo. De maneira similar, um espectro de excitação é obtido pela varredura nos diferentes comprimentos de onda de excitação enquanto se registra o sinal de emissão em um único comprimento de onda ⁶³.

A fluorescência permite obter informações acerca da estrutura da molécula, da conformação, da heterogeneidade, das interações intra e intermoleculares ⁶⁵, além de ser uma ferramenta analítica na determinação de compostos de interesse. Como esta técnica apresenta vantagens como alta sensibilidade, alta seletividade, ampla faixa linear de resposta, dentre outras, a espectroscopia de fotoluminescência tem encontrado amplo uso na análise de numerosos compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial ^{66,67}. Esta técnica é utilizada tanto no estudo dos ácidos húmicos quanto da proteína albumina sérica bovina ^{65,68,69,70}.

1.6.4. Difusão de Taylor

O fenômeno de difusão molecular ocorre em diferentes processos da natureza, sendo este fenômeno muito utilizado em técnicas cromatográficas ⁷¹. O método de Taylor ou Taylor-Aris foi desenvolvido por Taylor no estudo de dispersão de solutos em um fluido em escoamento no interior de um tubo longo ^{72,73} e, posteriormente, este método foi complementado por Aris ⁷⁴. Todavia, foram os pesquisadores Wakeham e colaboradores ⁷⁵ que demonstraram que esta técnica é tão confiável para a determinação do coeficiente de difusão quanto os métodos tradicionais de estudo da difusão.

O método consiste na injeção em um fluido de escoamento laminar (número de Reynolds menor que 2000) por um tubo longo e estreito. O soluto é, então, disperso pela diferença de potencial químico e pelo perfil de velocidade do eluente. Devido à difusão molecular, o perfil da concentração do soluto no interior do tubo adquire uma forma quase

gaussiana. Assim, o coeficiente de difusão pode ser obtido a partir dos parâmetros desta curva, utilizando a equação 17:

$$D = \frac{0,231r^2t_R}{W_{1/2}^2} \quad (17)$$

Onde r é o raio interno do tubo onde ocorre a dispersão, t_R é o tempo de retenção do soluto (tempo decorrido entre a injeção e o máximo na curva de dispersão) e $W_{1/2}$, a largura da curva de dispersão à meia-altura ⁷⁶.

O equipamento normalmente utilizado para a difusão de Taylor está representado na Figura 7.

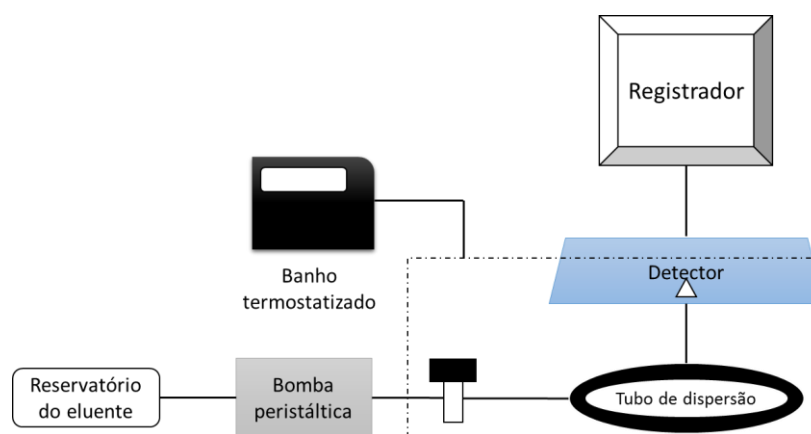


Figura 7. Representação de um equipamento utilizado na técnica de Taylor. A linha pontilhada indica as unidades termostalizadas.

O equipamento utilizado para as medidas proporcionou o escoamento do eluente por uma bomba peristáltica a baixa velocidade (valores menores ou iguais a 20 rpm). A amostra foi injetada por um injetor HPLC e o tubo onde ocorre a dispersão era de aço inoxidável com a sua extremidade ligada por um tubo de Teflon em uma cela de quartzo para microfluídica. O detector utilizado foi o espectrofotômetro UV/Visível. Todo o sistema foi termostalizado à 298,15 K ⁷⁶. Essas condições experimentais apresentam as condições necessárias para aplicação deste método, de tal forma que a determinação de coeficientes de difusão apresenta uma exatidão e reprodutibilidade menores que 2 a 3 % ⁷⁶.

2. Referências bibliográficas

1. Machado, P. L. O. d. A., Carbono do solo e a mitigação da mudança climática global. *Química Nova* **2005**, 28, 329-334.
2. Senesi, N.; Xing, B.; Huang, P. M., *Biphysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. A John Willey & Sons, Inc., Publication: New Jersey, 2009; p 884.
3. Kelleher, B. P.; Simpson, A. J., Humic substances in soils: are they really chemically distinct? *Environmental Science & Technology* **2006**, 40 (15), 4605-4611.
4. Lopes da Silva, W. T.; Thobie-Gautier, C.; Rezende, M. O. O.; El Murr, N., Electrochemical behavior of Cu(II) on carbon paste electrode modified by humic acid, cyclic voltammetry study. *Electroanalysis* **2002**, 14 (1), 71-77.
5. Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O., Comportamento sortivo dos herbicidas s-triazinas e em ácidos húmicos. *Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **1998**, 8.
6. Barbosa, A. M.; Santos, I. J. B.; Ferreira, G. M. D.; Hespanhol da Silva, M. d. C.; Teixeira, A. I. V. N. d. C.; da Silva, L. H. M., Microcalorimetric and SAXS determination of PEO–SDS interactions: the effect of cosolutes formed by ions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114 (37), 11967-11974.
7. Harding, S. E.; Chowdhry, B. Z., Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. In *Isothermal titration calorimetry of biomolecules*, Press, O. U., Ed. Oxford, 2001; pp 263-286.
8. Pires, A. C. d. S.; Da Silva, L. H. M.; Da Silva, M. d. C., Physical Chemistry of Colloidal Systems Applied to Food Engineering. In *Engineering aspects of milk and dairy products*, Group, T. F., Ed. Boca Raton, 2009; pp 1-26.
9. Terrones, M., Science and technology of the twenty-first century: synthesis, properties, and applications of carbon nanotubes. *Annual Review of Materials Research* **2003**, 33 (1), 419-501.
10. Oberlin, A.; Endo, M.; Koyama, T., Filamentous growth of carbon through benzene decomposition. *Journal of Crystal Growth* **1976**, 32 (3), 335-349.
11. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, 354.
12. Rao, C. N. R.; Satishkumar, B. C.; Govindaraj, A.; Nath, M., Nanotubes. *ChemPhysChem* **2001**, 2 (2), 78-105.
13. Zarbin, A. J. G., Química de (nano)materiais. *Química Nova* **2007**, 30 (6), 1469-1479.
14. Iijima, S.; Ajayan, P. M.; Ichihashi, T., Growth model for carbon nanotubes. *Physical Review Letters* **1992**, 69 (21), 3100-3103.
15. Thostenson, E. T.; Ren, Z.; Chou, T.-W., Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology* **2001**, 61 (13), 1899-1912.

16. Herbst, M. H.; Macêdo, M. I. F.; Rocco, A. M., Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Química Nova* **2004**, *27*, 986-992.
17. Moser, J.; Naughton, M., Carbon nanotube tweezers for Biological Applications. *NNUN Abstracts 2002 Materials, Physics, Processes & Characterization* **2002**.
18. Davis, J. J.; Green, M. L. H.; Allen O. Hill, H.; Leung, Y. C.; Sadler, P. J.; Sloan, J.; Xavier, A. V.; Chi Tsang, S., The immobilisation of proteins in carbon nanotubes. *Inorganica Chimica Acta* **1998**, *272* (1-2), 261-266.
19. Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Eklund, P. C., *Science of fullerenes and carbon nanotubes*. New York, 1996; p 965.
20. Khodakovskaya, M.; Dervishi, E.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Li, Z.; Watanabe, F.; Biris, A. S., Carbon Nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano* **2009**, *3* (10), 3221-3227.
21. Tam, K. C.; Wyn-Jones, E., Insights on polymer surfactant complex structures during the binding of surfactants to polymers as measured by equilibrium and structural techniques. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (8).
22. Erbil, H. Y., *Surface chemistry of solid and liquid interfaces*. Blackwell Publishing Ltd: Oxford, 2006.
23. Norde, W., *Colloids and interfaces in life sciences*. CRC Press: New York, 2003.
24. Prpich, A. M.; Biswas, M. E.; Chen, P., Adsorption kinetics of aqueous n-alcohols: a new kinetic equation for surfactant transfer. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (7), 2522-2528.
25. Levine, I. N., *Physical Chemistry*. Higher Education: New York, 2009.
26. Newcombe, G.; Drikas, M., Adsorption of NOM onto activated carbon: electrostatic and non-electrostatic effects. *Carbon* **1997**, *35* (9), 1239-1250.
27. Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W., 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9* (1-2), 19-37.
28. Kunz, W., Specific ion effects in colloidal and biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15* (1-2), 34-39.
29. De Wit, J. C. M.; Van Riemsdijk, W. H.; Nederlof, M. M.; Kinniburgh, D. G.; Koopal, L. K., Analysis of ion binding on humic substances and the determination of intrinsic affinity distributions. *Analytica Chimica Acta* **1990**, *232* (0), 189-207.
30. Coelho, A. C. V.; Santos, P. d. S.; Santos, H. d. S., Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. *Química Nova* **2007**, *30*, 146-152.
31. Grim, R. E., *Clay Mineralogy*. McGraw-Hill: New York, 1968.
32. Moore, D. M. R. C.; Reynolds, J. R., *X Ray diffraction and the identification and analysis of clay minerals*. Oxford University Press: Oxford, 1997; p 396.

33. Guerra, D. L.; Airoidi, C.; Lemos, V. P.; Angélica, R. S.; Viana, R. R., Aplicação de Zr/Ti-PILC no processo de adsorção de Cu(II), Co(II) e Ni(II) utilizando modelos físico-químicos de adsorção e termodinâmica do processo. *Química Nova* **2008**, *31*, 353-359.
34. Strawn, D. G.; Sparks, D. L., The Use of XAFS to Distinguish between Inner- and Outer-Sphere Lead Adsorption Complexes on Montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *216* (2), 257-269.
35. Sposito, G.; Skipper, N. T.; Sutton, R.; Park, S.-h.; Soper, A. K.; Greathouse, J. A., Surface geochemistry of the clay minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96* (7), 3358-3364.
36. Arnarson, T. S.; Keil, R. G., Mechanisms of pore water organic matter adsorption to montmorillonite. *Marine Chemistry* **2000**, *71* (3-4), 309-320.
37. Gu, B.; Schmitt, J.; Chen, Z.; Liang, L.; McCarthy, J. F., Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environmental Science & Technology* **1994**, *28* (1), 38-46.
38. Specht, C. H.; Kumke, M. U.; Frimmel, F. H., Characterization of NOM adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography. *Water Research* **2000**, *34* (16), 4063-4069.
39. Stevenson, F. J., *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons: New York, 1994.
40. Zech, W.; Senesi, N.; Guggenberger, G.; Kaiser, K.; Lehmann, J.; Miano, T. M.; Miltner, A.; Schroth, G., Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma* **1997**, *79* (1-4), 117-161.
41. Kang, S.; Xing, B., Humic acid fractionation upon sequential adsorption onto goethite. *Langmuir* **2008**, *24* (6), 2525-2531.
42. McBride, M. B., *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press: New York, 1994.
43. Fontes, M. P. F.; de Camargo, O. A.; Sposito, G., Eletroquímica das partículas coloidais e sua relação com a mineralogia de solos altamente intemperizados. *Scientia Agrícola* **2001**, *58* (3), 627-646.
44. Navrotsky, A.; Mazeina, L.; Majzlan, J., Size-Driven Structural and Thermodynamic Complexity in Iron Oxides. *Science* **2008**, *319* (5870), 1635-1638.
45. Torrent, J.; Schwertmann, U.; Fechter, H.; Alferez, F., Quantitative relationships between soil color and hematite content. *Soil science* **1983**, *136* (6).
46. May, H. M.; Helmke, P. A.; Jackson, M. L., Gibbsite solubility and thermodynamic properties of hydroxy-aluminum ions in aqueous solution at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1979**, *43* (6), 861-868.
47. Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A., *Introdução à química de alimentos*. Varela: São Paulo, 1989; p 225.

48. Gelamo, E. L.; Silva, C. H.; Imasato, H.; Tabak, M., Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *Biochimica et biophysica acta* **2002**, 1594 (1), 84-99.
49. Yada, R. Y., *Proteins in food processing*. Woodhead Publishing: 2004; p 686.
50. Carter, D. C.; Ho, J. X., Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry* **1994**, 45, 153-203.
51. Santos, S. F.; Zanette, D.; Fischer, H.; Itri, R., A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, 262 (2), 400-408.
52. Schweitzer, B.; Felipe, A. C.; Dal Bó, A.; Minatti, E.; Zanette, D., Competitive Process of Binding Between the Anionic Surfactants Sodium Dodecyl Sulfate and Sodium Cholate in Bovine Serum Albumin. *Macromolecular Symposia* **2005**, 229 (1), 208-216.
53. Jones, M. N., A theoretical approach to the binding of amphipathic molecules to globular proteins. *The Biochemical Journal* **1975**, 151 (1), 109-114.
54. Hirayama, K.; Akashi, S.; Furuya, M.; Fukuhara, K.-i., Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1990**, 173 (2), 639-646.
55. Emerson, T. E. J., Unique features of albumin: a brief review. *Critical care medicine* **1989**, 17 (7), 690-694.
56. Howard, G. J.; Midgley, C. A., The formation and structure of suspension-polymerized styrene-divinylbenzene copolymers. *Journal of Applied Polymer Science* **1981**, 26 (11), 3845-3870.
57. Jacobelli, H.; Bartholin, M.; Guyot, A., Styrene divinyl benzene copolymers. I. Texture of macroporous copolymers with ethyl-2-hexanoic acid in diluent. *Journal of Applied Polymer Science* **1979**, 23 (3), 927-939.
58. Allen, T., *Particle size measurement*. 4 ed.; London, 1990.
59. Gregg, S. J.; Sing, K. S. W., *Adsorption, surface area and porosity*. Academic Press: London, 1982.
60. Yunes, S., *Explanation and application of the physisorption and the chemisorption techniques in the characterization of solids in general and catalysts in particular*. Micromeritics Instruments Corp.: Norcross, 1998.
61. Webb, P. A.; Orr, C., *Analytical methods in fine particle technology*. Micromeritics Instruments Corp.: Norcross, 1997.
62. Turro, N. J., *Modern molecular photochemistry*. University Science Books: California, 1991.
63. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Stanley, R. C., *Fundamentos da Química Analítica*. Ed. Thomson: São Paulo, 2007.

64. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press: New York, 1998.
65. Mobed, J. J.; Hemmingsen, S. L.; Autry, J. L.; McGown, L. B., Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances: Total Luminescence Spectra with Absorbance Correction. *Environmental Science & Technology* **1996**, *30* (10), 3061-3065.
66. Arancibia, J. A.; Escandar, G. M., Two different strategies for the fluorimetric determination of piroxicam in serum. *Talanta* **2003**, *60* (6), 1113-1121.
67. Soper, S. A.; McGown, L. B.; Warner, I. M., Molecular Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectrometry. *Analytical Chemistry* **1994**, *66* (12), 428R-444R.
68. Wang, Z.; Li, Y.; Wang, J.; Zou, M.; Gao, J.; Kong, Y.; Li, K.; Han, G., Spectroscopic analyses on sonocatalytic damage to bovine serum albumin (BSA) induced by ZnO/hydroxylapatite (ZnO/HA) composite under ultrasonic irradiation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *94* (0), 228-234.
69. Zhang, X.; Song, C.; Chen, L.; Zhang, K.; Fu, A.; Jin, B.; Zhang, Z.; Yang, K., A novel immunoassay for residual bovine serum albumin (BSA) in vaccines using laser-induced fluorescence millimeter sensor array detection platform. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26* (9), 3958-3961.
70. (a) Zhang, J.; Li, W.-X.; Ao, B.-Y.; Feng, S.-Y.; Xin, X.-D., Fluorescence enhancement of europium(III) perchlorate by benzoic acid on bis(benzylsulfinyl)methane complex and its binding characteristics with the bovine serum albumin (BSA). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *118* (0), 972-980; (b) Zhang, H.-M.; Zhou, Q.-H.; Xue, M.-G.; Wang, Y.-Q., Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between triphenyltin and humic acids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *78* (3), 1018-1022.
71. Tyrrell, H. J. V.; Harris, K. R., *Diffusion in liquids*. Butterworths: London, 1984.
72. Taylor, G., Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1953**, *219* (1137), 186-203.
73. Taylor, G., The Dispersion of Matter in Turbulent Flow through a Pipe. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1954**, *223* (1155), 446-468.
74. Aris, R., On the Dispersion of a Solute in a Fluid Flowing through a Tube. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1956**, *235* (1200), 67-77.
75. Alizadeh, A.; Nieto de Castro, C. A.; Wakeham, W. A., The theory of the Taylor dispersion technique for liquid diffusivity measurements. *International Journal of Thermophysics* **1980**, *1* (3).
76. Loh, W., A técnica de dispersão de Taylor para estudos de difusão em líquidos e

suas aplicações. *Química Nova* **1997**, 20, 541-545.

OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

1. Objetivos

- Determinar e comparar as isotermas de adsorção dos PPHA e LHA na superfície hidrofóbica dos MWCNTs em diferentes sistemas;
- Estudar o efeito do pH e da força iônica na adsorção dos HA em MWCNTs para identificar a força motriz da adsorção;
- Estudar o efeito dos ânions e cátions da série de Hofmeister na adsorção do LHA em MWCNTs no pH 2,5;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos de adsorção do PPHA em MWCNTs: $\Delta_{\text{ads}}G$, $T\Delta_{\text{ads}}S$ e $\Delta_{\text{ads}}H$, sendo este último parâmetro determinado pela ITC;
- Determinar e comparar as isotermas de adsorção dos PPHA na superfície de argilas (montmorrolita, caulinita, mica e illita) e na superfície de óxidos (hematita, gibbsita e goethita);
- Estudar o efeito do pH e da força iônica na adsorção do PPHA em argilas e óxidos para identificar a força motriz da adsorção;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos de adsorção do PPHA em argilas e óxidos: $\Delta_{\text{ads}}G$, $T\Delta_{\text{ads}}S$ e $\Delta_{\text{ads}}H$, sendo este último parâmetro determinado pela ITC;
- Estudar a interação BSA-PPHA em diferentes tampões de acetato e diferentes forças iônicas pela espectroscopia de fluorescência;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos de interação da BSA-PPHA: $\Delta_{\text{ads}}G$, $T\Delta_{\text{ads}}S$ e $\Delta_{\text{ads}}H$, sendo este último parâmetro determinado pela ITC.

2. Materiais e métodos

2.1. Equipamentos

Um peagâmetro (WTW Wissenschaftlich-TechnischeWerkstätten, pH 330i/SET) foi empregado para o preparo das soluções de HA em diferentes pHs. Os MWCNTs foram pesados em uma balança analítica (Shimadzu, AY 220) com uma incerteza de $\pm 0,0001$ g e a solução foi adicionada com auxílio de uma bureta. Também foram utilizados um microcalorímetro de titulação isotérmica, modelo CSC 4200 e um banho termostatizado (Cientec, CT 281-28) durante os experimentos. As concentrações de HA das soluções sobrenadantes foram determinadas espectrometricamente a 203 ou 400 nm utilizando um espectromêtro de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV/vis) (Shimadzu UV-2550). Além disso, foram utilizados o espectrômetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies) e o equipamento de difusão de Taylor fabricado pela Unicamp.

2.2. Materiais e Reagentes

Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados como recebidos, sem purificação adicional. Para a construção das isothermas foram utilizados os ácidos húmicos Pahokee Peat e Leonardite adquiridos da *International Humic Substances Society* (IHSS) que fornece a composição elementar destes ácidos húmicos (Tabela 1).

Tabela 1. Composição elementar e razões isotópicas estáveis de amostras IHSS.

Padrão HA	Cat. No.	H ₂ O	Cinza	C	H	O	N	S	P	$\delta_{13}C$	$\delta_{15}N$
Pahokee Peat	1S103H	11,1	1,12	56,37	3,82	37,34	3,69	0,71	0,03	-26,0	1,29
Leonardite	1S104H	7,2	2,58	63,81	3,70	31,27	1,23	0,76	<0,01	-23,8	2,13

*O teor de água é em % (m/m) na amostra em equilíbrio com ar (uma função de humidade relativa).

*A cinza é em % (m/m) do resíduo inorgânico em uma amostra seca.

*C, H, O, N, S e P são a composição elementar em % (m/m) de uma amostra seca sem cinzas.

* $\delta_{13}C$ e $\delta_{15}N$ são as abundâncias dos isótopos estáveis em unidade de mil por, ou 0/00.

O MWCNT foi obtido da CNTs CO., LTD., Korea. A partir da análise termogravimétrica (TG) e imagens de SEM e TEM, observou-se que a amostra de MWCNTs tem uma pureza superior a 90 %, com tubos de comprimentos que variam entre

1-25 μm e diâmetros em torno de aproximadamente 10-40 nm (com predominância de tubos com diâmetro médio em torno de aproximadamente 13 nm). Sua área superficial foi determinada através de isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77 K usando a equação BET, e é da ordem de $188 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (resultados em anexo). Estes dados estão de acordo com as informações fornecidas pelo fornecedor do material ¹.

A caulinita, a montmorilonita e a illita foram compradas da Ward's Science (Nova Iorque, EUA). A hematita e a goethita foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Já a mica foi extraída do solo e moída. Os difratogramas de raios X encontram-se no anexo e correspondem às fases esperadas.

Os reagentes sulfato de lítio, Li_2SO_4 (99 %), hidrogenofosfato de sódio, Na_2HPO_4 (98,5 %), tiocianato de sódio, NaSCN (98 %) e o sulfato de sódio, Na_2SO_4 (99 %) foram obtidos pela VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). O tiocianato de potássio, KSCN (98 %), e cloreto de sódio, NaCl (99 %), foram obtidos pela Isofar (Rio de Janeiro, Brasil). O cloreto de bário, BaCl_2 (99 %), foi obtido pela Synth (São Paulo, Brasil). O cloreto de tetrametil amônio, $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{NCl}$ (98 %) e a proteína albumina do soro bovino (98 %), foram comprados da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Água deionizada (Milli-Q, Millipore) foi utilizada no preparo de todas as soluções empregadas nestes experimentos.

2.3. Solução de ácido húmico

Soluções estoque de HA a 30 mg mL^{-1} foram preparadas solubilizando o ácido húmico em uma solução de NaOH 0,1 M. O ajuste do pH desta solução em torno de 6,00 foi realizado com adição de volumes conhecidos de uma solução de HCl 0,1 M, se necessário. Após a adição do HCl , a concentração do HA foi corrigida. Esta solução estoque foi utilizada para a diluição das soluções no pH e na concentração de eletrólito desejada para os experimentos.

2.4. Isotermas de adsorção de ácido húmico em diversas superfícies

Dispersões com MWCNTs, argilas e óxidos em diferentes concentrações de HA, em diferentes pHs, sais e força iônica, foram preparadas. O ajuste de pH das soluções estoques na ausência e presença de sais foram realizadas adicionando-se NaOH ou H₂SO₄. As concentrações iniciais das soluções de adsorbato variaram de 0,1000 a 1,000 mg mL⁻¹ para o MWCNTs e para as argilas e óxidos variaram de 0,0100 à 0,500 mg mL⁻¹. É importante ressaltar que a referência do pH durante o corpo do texto refere-se tão somente a solução inicial de preparo dos sais e do HA diluído, sendo que o pH final da solução de ácido húmico é próximo ao medido inicialmente.

A dispersão foi preparada em um tubo com tampa. Neste tubo também foi adicionado a solução estoque de HA e a solução eletrolítica na concentração de eletrólito e no pH desejado, de tal forma a obter um volume final de 10,00 mL na concentração inicial de HA desejada. Depois de adicionar a quantidade apropriada de cada componente, a mistura foi agitada por 3 minutos e deixada em repouso por aproximadamente 24h à temperatura de 298,15 K em um banho termostático para as dispersões de MWCNTs. Para as argilas e óxidos, depois de adicionar a quantidade apropriada de cada componente, a mistura foi agitada por 24h em um shake agitador à temperatura de 298,15 K. Todas as medidas foram feitas em duplicata e o valor médio da quantidade adsorvida foi utilizado e com isso calculado o desvio padrão. Quando o equilíbrio foi alcançado, alíquotas do sobrenadante foram coletadas, diluídas e a concentração de HA no sobrenadante foi determinada. A diferença entre a concentração inicial do HA (C_{HA}^o) e a concentração de HA na fase líquida após o equilíbrio (C_{HA}^{equil}) foi determinada de acordo com a equação 18.

$$\Delta C_{HA} = C_{HA}^o - C_{HA}^{equil} \quad (18)$$

Onde ΔC_{HA} é a variação na concentração de HA na fase líquida.

As quantidades de HA adsorvidas (Γ) na fase sólida podem ser calculadas pela

equação 19.

$$\Gamma = \frac{(\Delta C_{HA})V}{m} \quad (19)$$

Onde Γ (mg g^{-1}) é a quantidade em mg de HA adsorvida por mg de MWCNTs, V (mL) é o volume da fase líquida, m (g) é a massa de fase sólida.

2.5. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os experimentos de titulação calorimétrica para determinação da variação de entalpia de adsorção de HA nas superfícies e de interação BSA-PPHA foram realizados em um microcalorímetro de titulação isotérmica.

Para cada sistema estudado por esta técnica, adicionaram-se em ambas as celas calorimétricas quantidades determinadas do adsorvente, no caso dos experimentos de adsorção, e 1,8 mL de solução de eletrólito na concentração e pH de interesse, de modo que na cela de amostra foram feitas adições consecutivas de solução concentrada de HA. Todo o experimento de titulação foi programado, sendo automatizado em todas as etapas. As adições das soluções de ácido húmico realizaram-se por meio de seringas gastight Hamilton (250 μL), utilizando-se cânulas capilares feitas de teflon que conduziram a solução até a cela calorimétrica da amostra. As injeções, de 10 μL de solução titulante, foram controladas por um motor de passo comandado por um microprocessador. O intervalo de tempo entre cada injeção foi de aproximadamente 38 minutos e a homogeneidade da amostra foi garantida por um agitador (350 rpm).

Os valores da energia liberada ou absorvida na forma de calor foram obtidos por integrações das deflexões ocorridas a partir da linha base, na curva de potência versus tempo. Em condições de temperatura e pressão constantes tem-se que a variação de entalpia é numericamente igual à energia na forma de calor envolvido no processo. Assim, pode-se obter a variação de entalpia ($\Delta_{\text{obs}}H$) associada ao processo, para cada injeção de HA. $\Delta_{\text{obs}}H$ foi corrigida pela variação de entalpia de diluição dos ácidos húmicos ($\Delta_{\text{dil}}H$)

para obter variação de entalpia líquida de interação entre os HA e MWCNTs, argilas, óxidos e BSA ($\Delta_{\text{int}}H$). No caso dos experimentos de adsorção, a divisão de $\Delta_{\text{int}}H$ pela quantidade de gramas HA adicionado por grama de adsorvente tem como resultado a variação de entalpia de adsorção do HA ($\Delta_{\text{ads}}H$, J g^{-1}). A variação de entalpia padrão de adsorção $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ foi determinado considerando a diluição infinita. Todas as medidas foram feitas a uma temperatura constante de 298,15 K.

2.6. Espectroscopia de fluorescência

Foram preparadas soluções de PPHA na faixa de concentração de 0 a $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ na presença de BSA, na concentração fixa de 1 mg mL^{-1} , em 4 diferentes tampões de acetato de sódio (3,6; 4,8; 5,4 e 5,8) e em 4 diferentes concentrações de KCl (0, 0,5, 5 e 50 mM). As soluções foram analisadas no espectrômetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, EUA) com o slit de emissão e excitação de 5 nm. Para a identificação da BSA o comprimento de onda de excitação e a potência da fotomultiplicadora foram de 282,03 nm e 540 V, respectivamente. Todas as análises foram realizadas à 298,15 K.

2.7. Difusão de Taylor

Foram preparadas soluções de PPHA e LHA em pH 2,5 em diferentes concentrações (0,3, 0,6 e $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$). A concentração de $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada na ausência e presença dos sais cloreto de tetrametilamônio (1, 10 e 100 mM), sulfato de lítio (1, 10 e 100 mM) e tiocianato de potássio (1 e 10 mM). Os HA foram analisados pelo espectrofotômetro CECIL 1020s Scanning no comprimento de onda de 250 nm. O coeficiente de difusão de Taylor foi obtido pela equação 18.

3. Referências bibliográficas

1. Mageste, A. B. Adsorção de proteínas do soro do leite e do glicomacropéptídeo (GMP) na interface hidrofóbica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, Tese

(Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012.

OBSERVAÇÃO

Os capítulos apresentados em seguida encontram-se escritos no formato de um artigo científico, apesar dos mesmos ainda não terem sido submetidos.

CAPÍTULO 1: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes. Part I

Igor José Boggione Santos¹, Leonardus Vergutz^{1,2}, Luis Henrique Mendes da Silva^{1*}

and Maria do Carmo Hespanhol da Silva¹

¹ Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

² Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

* *Corresponding author.* Fax: +55 31 3899 3065. E-mail address: luhen@ufv.br (L. H. M. da Silva)

Abstract

In this work we studied the adsorption behavior of Pahokee Peat (PPHA) and Leonardite humic acids (LHA) onto multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). In order to understand the mechanism of the adsorption and to gather more information regarding HA's structure we conducted the adsorptions at various pH and increasing ionic strength. Our results show a great amount of HA adsorbing (Γ) on the MWCNT when HA's net negative charge is negligible. The high values of Γ demonstrate a great potential of MWCNT in adsorbing HA. It is also shown that the adsorption mechanism depends on the nature of the polyelectrolyte, the nature of the HA, and on pH. Thermodynamic parameters were determined using three models: Langmuir, Freundlich, and the thermodynamic model of infinite dilution. Taking into account the goodness of fit, the Langmuir model fittest the best to the experimental data. The thermodynamic analysis, based on calorimetric titrations, showed that HA adsorption onto MWCNT is favorable ($\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$). The process is enthalpically favorable for all systems studied of LHA. The process is entropically favorable for adsorption of PPHA in presence of 100 mM Li_2SO_4 and in the presence 10 mM KSCN is enthalpically driven. The other systems PPHA are driven by both enthalpy and by entropy.

Keywords: adsorption, humic acid, isothermal titration calorimetry, multi-walled carbon nanotubes, thermodynamics.

1. Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) are a relatively new class of compounds with outstanding characteristics and promising applications in a variety of fields. They consist of graphitic sheets (hexagonal carbon network arrangement) which have been rolled up into a cylindrical shape. They can be formed by just one single sheet of graphite, thus called single-walled carbon nanotubes (SWCNTs). Or by two or more sheets forming a concentric structure, looking like rings on a tree trunk, called multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). One of the most striking characteristics of CNTs is that their electrical properties depend very sensitively on structure. Depending on the arrangement of the hexagon rings along the tubular surface, CNTs can be either metallic or semiconducting ¹. The unique structural, mechanical, and electrical properties of CNTs makes them suitable for a variety of nanotechnological applications such as biosensors ², capacitors ³, atomic force microscopy ⁴, fuel storage ⁵, biomedical devices ⁶, drug delivery systems ⁷, plant nutrition ⁸, and many more ⁹.

However, besides its astonishing properties and wide range of promising applications CNTs usage needs to overcome a major issue. During its production CNTs form bundles, which are entangled together in the solid state giving rise to a highly complex network. The fact that CNTs are insoluble in all organic solvents and aqueous solutions poses a hurdle to their use and manipulation. Thus, in order to take advantage of all these great characteristics CNTs can imprint in the materials we need to be able to improve their suspend and to individualize the tubes. One way to increase CNTs suspended is by modifying its structure, adding functional groups to it through chemical reactions or wrapping/coating it with polymers ¹⁰. There are three main approaches for the modification of CNTs' structure, namely: (i) covalent attachment of chemical groups through reactions onto the π -conjugated skeleton of CNTs; (ii) noncovalent adsorption of various functional molecules; and (iii) the endohedral filling of their inner empty cavity.

Such modifications clearly improve CNTs suspended, but they affect differently its characteristics ¹⁰. The covalent functionalization of CNTs may alter the electronic structure of the nanotubes by disrupting the network of sp²-hybridized carbons and/or change the potential energy surface. On the other hand, noncovalent wrapping of the tubular surface offers the possibility of attaching chemical handles without affecting the electronic network of the nanotubes. The noncovalent interaction is based on van der Waals forces or π - π stacking, and it is controlled by thermodynamics. Several polymers have been used for coating CNTs including surfactants ¹¹, proteins ¹², DNA ¹³, and polypeptides ¹⁴.

Through such modifications, the suspended of CNTs is clearly improved and their biocompatibility profile completely transformed. But, in order to improve the biotechnological applications of CNTs it is extremely necessary to improve its water solubility, once water is the medium required for any eventual interface to biochemistry. Not just that but the polymer used for coating the CNTs must also be biologically safe, not causing any damage to biological molecules such as denaturation for example, a problem that may occur with surfactants ¹⁵.

Humic substances (HS) are one of the most abundant organic compounds in the Earth, found in nearly all soils, sediments, and natural waters. They are formed by chemical, physical, and biological transformation of plant, animal, and microorganisms matter into relatively stable and polydisperse particles. HS are amphiphile molecules that behave like weak-acid polyelectrolytes and display the ability to associate with different molecules by electrostatic and/or hydrophobic interactions ^{16,17}, with a capacity of changing the character of its interactions (from electrostatic to hydrophobic) depending on the characteristics of the solution¹⁷. Therefore, they play a key role in many, if not most, chemical and physical properties in their environment.

Due to the high hydrophobicity of the side-walls of CNTs it is probable that HS can attach onto CNTs by a hydrophobic (noncovalent) interaction, as it happens for proteins¹². By being a very stable biological molecule HS represent an ideal biopolymer for wrapping/coating CNTs. The binding of HS onto CNTs would open the door to new ways of manipulating and dispersing the nanotubes and also would be of great importance for the understanding of CNTs fate in the environment. As nanomaterials applications have grown exponentially, it is important to assess their impact in the environment, but we are far from having a good understanding about realistic exposures to nanomaterials¹⁸. In order to get real-life exposure information we must understand how nanoparticles would interact in the environment and what changes they will pose to the molecules/particles they are interacting with. It makes the understanding of HS-CNTs interaction even more important once HS are widespread in all kinds of environments, which means that when discharged in the environment nanotubes will certainly interact with HS.

HS can be divided in three types with humic acids (HA) being a major component of HS and considered to be one of the most recalcitrant fractions of it¹⁹. In order to evaluate and comprehend the interactions between CNTs and HS we performed the thermodynamic study of the interaction between HA and MWCNTs in aqueous solution. We believe that understanding the thermodynamic pattern of the HA-MWCNTs interaction is of great importance to improve the applications of MWCNTs and to investigate the fate and consequences that MWCNTs will have when discharged in the environment. We evaluated the HA-MWCNTs interaction through adsorption isotherm experiments as well as direct measurement of enthalpy changes in the adsorption process by isothermal titration calorimetry. We also assessed the influence of pH and increasing concentrations of three salts in the binding process of HA to MWCNTs. The specific objectives of this study were: (i) evaluate the nature of HA-MWCNTs interaction, (ii)

evaluate the influence of ionic strength on this interaction, and (iii) determine the thermodynamic pattern of this interaction. This study aims to better understand HA-MWCNT interaction and further improve the dispersion of MWCNT with the addition of HA and apply it to various pharmacological and environmental sectors.

2. Experimental

2.1. Materials

MWCNTs (C_{Tube} 100) were purchased from CNT Co., Ltd., Korea, and used in the experiments without further purification. According to the manufacturer this product purity is >95% (wt), with an average diameter of 20 nm, length ranging from 1-25 μm , bulk density varying from 0.03-0.05 g cm^{-3} , and specific surface area from 150-250 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. The salts in the experiments were tetramethylammonium chloride (Sigma-Aldrich, 98% purity), lithium sulfate (Vetec, 99% purity) and potassium thiocyanate (Isosfar, 98% purity) were used as received. Standard Pahokee Peat and Leonardite humic acids (PPHA and LHA, respectively) were purchased from the International Humic Substances Society (IHSS) and used as received.

2.2 Adsorption experiments

Adsorption isotherm experiments of HA binding onto MWCNTs were performed at 25 °C. In these experiments 10 mL of solutions containing HA (HA's concentration ranging from 0.1 to 1.0 mg mL^{-1} , with intervals of 0.1 mg mL^{-1}) were left to react with 10 mg of MWCNTs for 24 h in capped glass tubes thus ensuring thermodynamic equilibrium. After this time the equilibrium solution (supernatant) was sampled for the determination of HA's concentration by light absorbance at a UV/Vis spectrometer. These experiments were carried out in pure ionized water at different pH levels (2.5, 5, 6, 9, and 12), adjusted with H_2SO_4 or NaOH. After the best pH for the adsorption was

found (maximum HA adsorption into MWCNTs), we evaluated the effects of increasing ionic strength (1, 10, 100 and 500 mmol L⁻¹).

For each point of these isotherms the adsorbed amount of HA into MWCNTs was directly calculated from differences between the initial HA concentration and the concentration of HA at the equilibrium after the 24 h reaction, as follow:

$$\Gamma = \left(\frac{C_i - C_e}{m} \right) V \quad (1)$$

where Γ is the adsorbed amount of HA onto MWCNTs (mg g⁻¹) at the equilibrium (24 h); C_i is the initial HA concentration (mg mL⁻¹); C_e is the HA concentration at the equilibrium (mg mL⁻¹); V is the total solution volume (mL); and m is the mass of MWCNTs (g).

2.3 Isothermal titration calorimetry (microcalorimetry)

The measurement of enthalpy changes due to the adsorption of HA into MWCNT was performed in triplicate using a CSC-4200 microcalorimeter (Calorimeter Science Corp.) controlled by ITCRun software with a 1.8 mL reaction cell (sample and reference). The whole calorimetric procedure was chemically and electrically calibrated to the heat of protonation of (tris(hydroxymethyl)aminomethane) and the Joule effect, as recommended by Christensen et al.²⁰. The titrations were carried out through step-by-step injections (10 μ L) of a concentrated HA solution (25 mg mL⁻¹) with a gastight Hamilton syringe (250 μ L), controlled by the calorimeter, with intervals of 38 min between each injection. These aliquots of concentrated HA solution were injected to the sample cell containing MWCNTs (5.000 mg), stirring at 350 rpm, and measurements were carried out at a constant temperature of 298,15 K. A good review about this technique and its fundamentals can be found in Tam & Wyn-Jones (2006)²¹ and Velázquez-Campoy et al. (2004)²².

3. Results and Discussion

3.1 Adsorption isotherms

3.1.1. Effects of pH

Adsorption of organic molecules on carbon materials is a complex relationship between electrostatic and non-electrostatic interactions²³. Most of the compounds present in natural organic material (NOM) carry a negative charge in neutral pH, generally attributed to carboxylic acid and phenolic groups, and this causes the larger compounds to behave as polyelectrolytes in solution²⁴. Thus, pH determines the dissociation or protonation of the HA. Therefore, pH is a key factor that influences the adsorption process of organic weak polyelectrolytes on carbon materials because it controls the electrostatic interactions between the adsorbent and the adsorbate²⁵. Figure 1 shows the adsorption of PPHA and LHA on MWCNT at different pH.

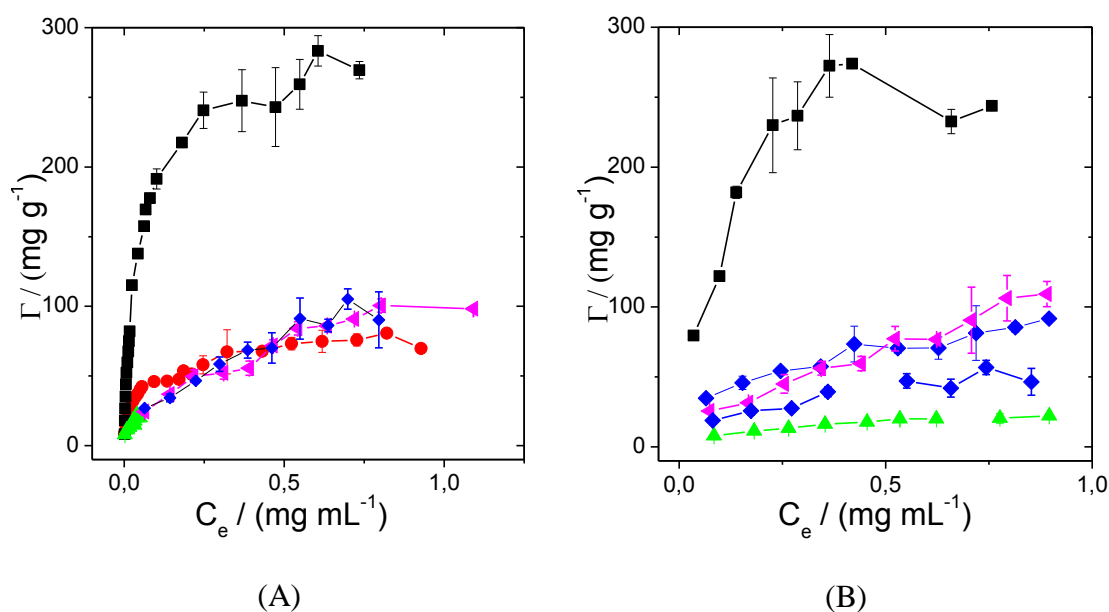


Figure 1. Adsorption isotherms of PPHA (A) and LHA (B) HA on MWCNT at different pH: (■) 2,5; (◀) 5,0; (▲) 6,0; (◆) 9,0; (●) 12,0.

As mentioned earlier, HA adsorption on MWCNT is affected by pH. At low PPHA equilibrium concentration (C_e) there is an increase in Γ with the increase on PPHA concentration. The affinity between adsorbate-adsorbent is analyzed by initial slope of

the isotherms. Therefore, HA-MWCNT interaction is more intense at pH 2.5 than at the other pH.

HA-MWCNTs interaction can be influenced by electrostatic interactions and/or specific. The electrical contribution to the adsorption may comprise both coulombic and dipole interactions and specific interactions represents all other interactions, such as hydrophobic interactions, van der Waals forces, etc. Depending on the nature of the interaction in HA-MWCNTs, the electrostatic interactions can favor or not adsorption. This is also true for specific interactions ²³.

Electrostatic interactions can be minimized by reducing the pH to a value where the negative charge on polyelectrolyte is negligible ($\text{pH} < 3,0$) ²⁵. At acidic pH, the adsorption was maximal because carboxylic acid and phenolic groups were undissociated and the dispersion interactions predominated and this implies a greater adsorption. This fact is evident in the isotherms (Figure 1).

However, at pH greater than 2.5, the adsorption decreased due to the predominance of electrostatic interactions. It reduces HA-MWCNT interaction because electrostatic repulsions occur between the deprotonated humic acid molecules and nonbonding electrons from the surface of the carbon nanotube ²⁵.

Furthermore, the isotherms are non-linear and of the same type. They are characterized by an increase in the amount of adsorbed HA with the increase on the equilibrium concentrations, reaching a plateau at higher concentrations, which represents the maximum adsorption capacity.

3.1.2. Effect of ionic strength

Effect of ionic strength on the adsorption of HA on MWCNT was evaluated in the presence of salts: KSCN, Li_2SO_4 and $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ (TMA) in the pH that showed the greatest adsorption ($\text{pH}=2.5$, Fig.1).

The adsorption isotherms of the PPHA and LHA on MWCNT are shown in Figure 2 and 3, respectively, where the amount of adsorbed HA (mg) per g of MWCNT is plotted against the equilibrium concentration of the respective HA (mg mL^{-1}).

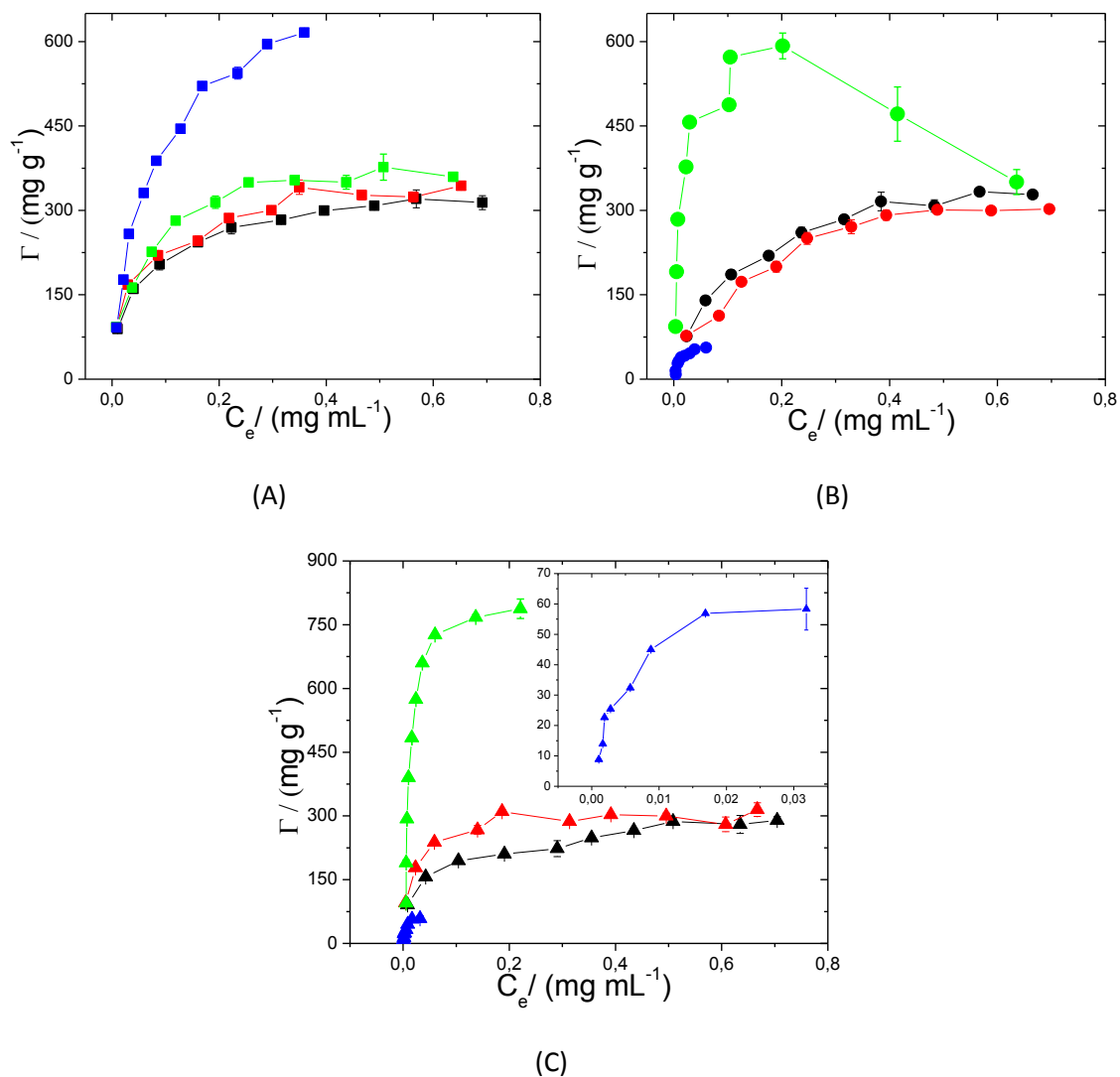


Figure 2. Adsorption isotherms of PPHA on MWCNT at pH 2.5 in presence of (A) Li₂SO₄; (B) KSCN; (C) TMA at different concentrations: (■) 1 mM; (■) 10 mM; (■) 100 mM; (■) 500 mM.

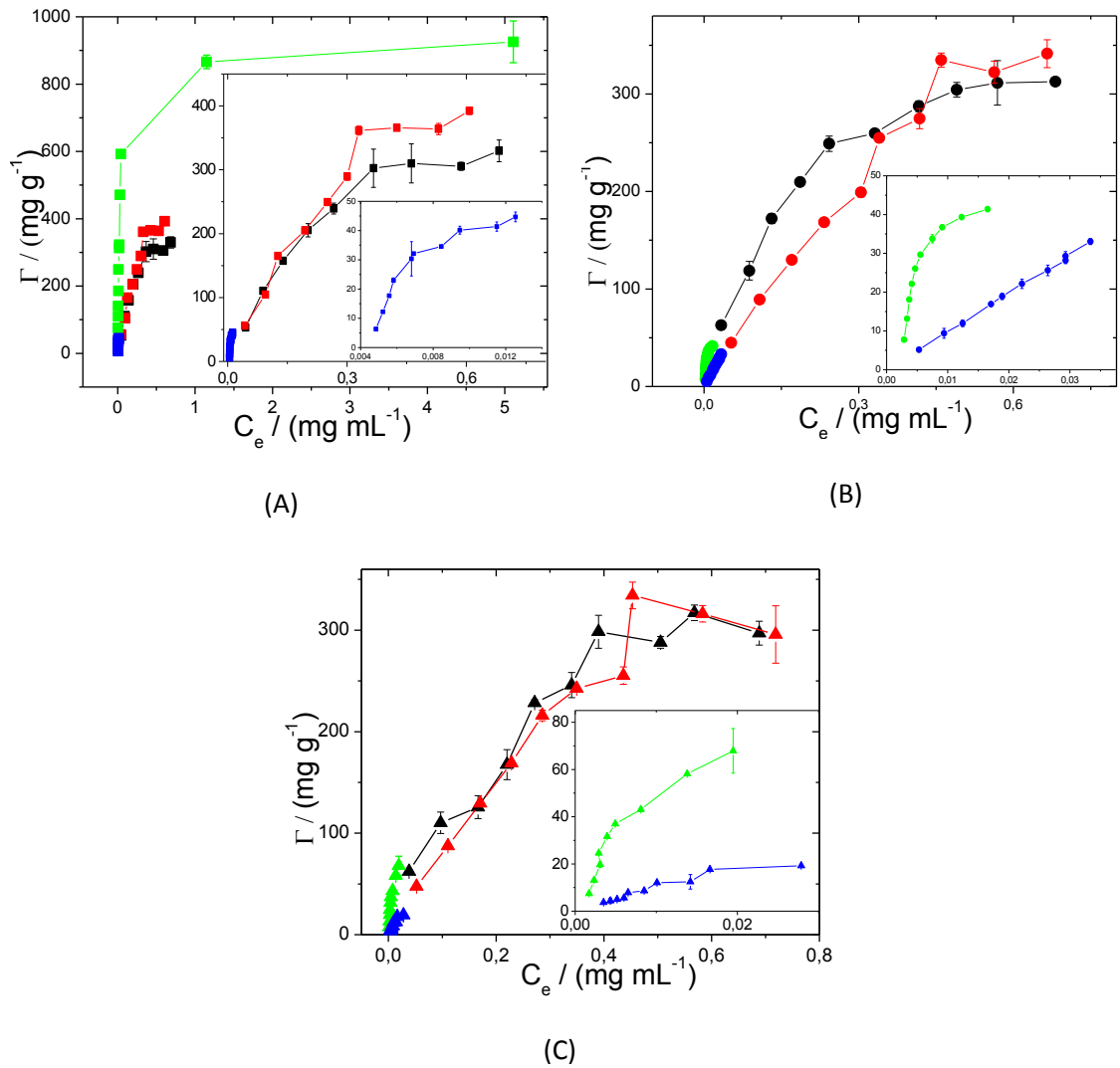


Figure 3. Adsorption isotherms of LHA on MWCNT at pH 2.5 in presence of (A) Li₂SO₄; (B) KSCN; (C) TMA at different concentrations: (■) 1 mM; (■) 10 mM; (■) 100 mM; (■) 500 mM.

The results show that the presence of electrolytes affects the adsorption behavior of HA on MWCNTs. The isotherms are non-linear and of the same type. They are characterized by an increase in the amount of adsorbed HA with increasing equilibrium concentrations, followed by a tendency for the formation of a plateau at higher concentrations, which represents the maximum adsorption capacity (Table 1).

Table 1. Maximum adsorption capacity of PPHA and LHA on MWCNTs at pH 2.5.

HA	LHA $\Gamma_{\max} / (\text{mg g}^{-1})$	PPHA
0 mM	273.9	269.4
1 mM Li_2SO_4	329.7	320.4
10 mM Li_2SO_4	392.5	343.7
100 mM Li_2SO_4	925.7	376.8
500 mM Li_2SO_4	44.70	616.1
1 mM KSCN	313.4	328.1
10 mM KSCN	341.3	302.2
100 mM KSCN	41.40	592.3
500 mM KSCN	33.00	56.00
1 mM TMA	317.1	289.7
10 mM TMA	316.1	315.0
100 mM TMA	67.90	787.6
500 mM TMA	19.20	58.30

The adsorption isotherms show that the increasing salt concentration causes an increase on the adsorption of LHA onto MWCNTs up to a certain concentration. Above it, the presence of salt causes a decrease in adsorption, except to PPHA in presence of the Li_2SO_4 at pH 2.5. The salt that influences the most the adsorption of LHA is Li_2SO_4 . For PPHA, TMA is the salt that showed the greatest influence in the adsorption process. Therefore, there is a difference in the adsorption isotherms of PPHA and LHA when comparing the same systems. This difference suggests that the HA, LHA and PPHA, have different structures that allow different interactions with salts and MWCNT, giving different adsorption isotherms. If the structures were the same, the isotherms were similar under the same experimental conditions. These results, therefore, show that the LHA and PPHA has different structure.

Drikas and Newcombe²³ found that, if there are opposite charges on the surface and adsorbate, and the surface concentration is sufficiently low, an increase in ionic strength will decrease adsorption. Or, if the driving force is non-electrostatic and the electrostatic interaction between the side chains is repulsive, adsorption will increase with increasing ionic strength. Therefore, the increase on the HA adsorption with increasing salt concentration can be explained by a decrease on side electrostatic repulsion between

adsorbed HA molecules and between adsorbed HA and HA in solution ²³. However, Summers and Roberts ²⁶ expected to find a decrease in adsorption with an increase in the ionic strength when adsorbing HA onto a positively charged activated carbon; still their results also showed an increase in adsorption. They measured the diffusion coefficients of the molecules in various ionic strength conditions and found that the HA decreased in size with increasing ionic strength. The decrease in size allowed the molecule to enter smaller pores and reach adsorption sites that were not available before.

However, measurements of the diffusion coefficient by Taylor's method for the systems studied had some different results in some systems (Figure 4).

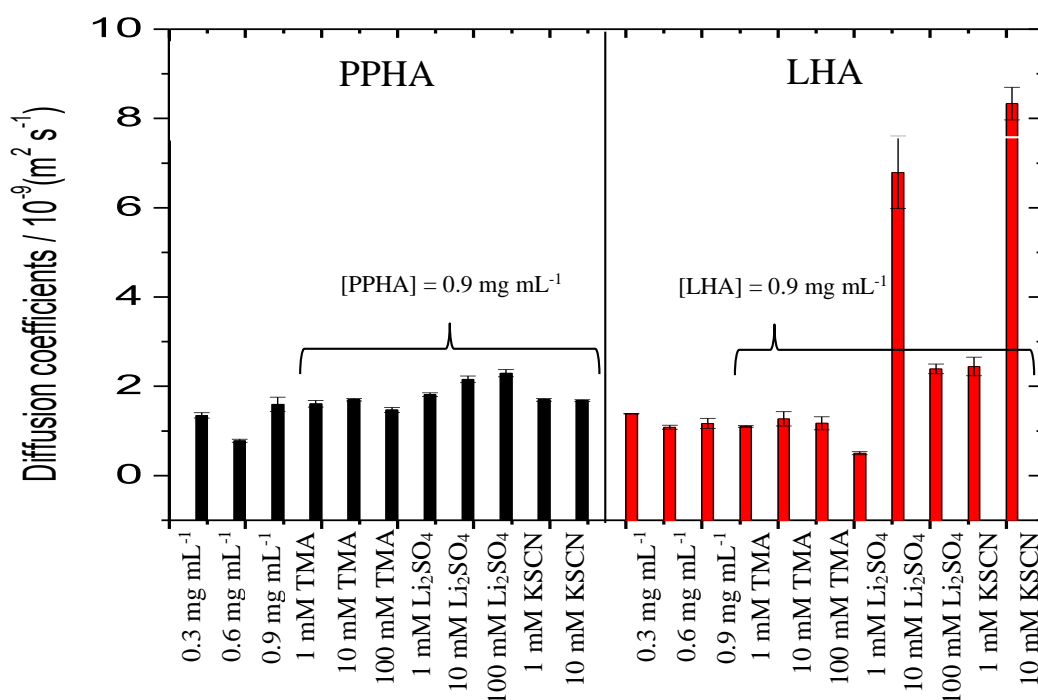


Figure 4. Diffusion coefficient by Taylor's method at different systems.

The results of the diffusion coefficient show a variation of the diffusion of HA depending on its concentration, type of HA, ionic strength and type of salt in the system. For example, increasing the concentration of PPHA and the increasing the concentration of Li₂SO₄ increases the diffusion coefficient. However, increasing the concentration of LHA and increasing the concentration of Li₂SO₄ decrease the diffusion coefficient.

A model of the macromolecular configuration of HA was proposed by Ghosh and Schnitzer²⁷, in which humic substances behave like linear macromolecules or like rigid spherocolloid depending on the environmental conditions. Chan and Chan presented a series of studies aimed to verify the effect of the form of solutes and solvents on its interaction with its diffusion. Two of their studies²⁸ found that spherical molecules diffused faster than molecules of the same size, called "pseudo-planar". In others study²⁹, the authors demonstrate that the formation of hydrogen bonding solute-solvent leads to a decrease in the diffusion coefficients of solutes. Therefore, we cannot infer on size structure through H_A diffusion coefficient. There must be another techniques to determine size structure of these systems, for example, the X-ray scattering.

Therefore, ionic strength influences Γ in three different ways. The first is associated with the adsorption of ions in the interface HA adsorbed/solution. In this process, adsorption increased with increasing salt concentration due to interaction via electrostatic force between the ions and ionized HA groups present at the HA adsorbed/solution interface. This allows the reduction of electrostatic repulsion between the segments of adsorbed HA, so as to allow a greater number of HA molecules to adsorb. The second contribution is associated with the shielding effect of the electrolytes on the electrical double layer. This shielding effect reduces the contribution of the electrochemical potential of the adsorbing molecules/ions, thus reducing the adsorptive process and the amount of HA adsorbed. From the results, we can assume that the first process prevails over the second. The third contribution is associated with humic substances are capable of spontaneously arrange themselves into micellar structures in suitable aqueous environments³⁰. This Humic Critical Micellar Concentration (HCMC) is dependent on parameters such as pH, temperature, and nature and concentration of cationic species and humic acid itself^{31,32}. Therefore, the increased ionic strength can decrease HCMC³¹ and, with this, the self-arrangement into micellar structures can be

more favorable than HA-MWCNT interaction, thereby reducing Γ . Therefore, increase or decrease of Γ be the balance of these three processes.

3.2. Thermodynamic properties

Thermodynamic parameters of adsorption were determined for a better understanding of the adsorption mechanisms of HA onto MWCNTs. Langmuir and Freundlich equations are the most commonly applied models for representing the nonlinear adsorption of organic chemicals, such as phenolic compounds, to activated carbon, charcoal, and carbon nanotubes^{33,34}. Furthermore, were used to adjust the thermodynamic model of treatment for dilute solutions.

The Langmuir isotherm can be derived by assuming an ideal system, where the adsorbent molecules adsorb at the adsorbate surface at well-defined sites forming a homogeneous monolayer, each site adsorb only one molecule, and the energy involved in the adsorption of one adsorbent molecule is the same for all sites in the adsorbate surface and it is independent of the presence or not of others molecules in the adjacent sites, that is, there is no interaction between adjacent adsorbent molecules. Equation 1 represents the mathematical expression for the Langmuir model:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (1)$$

where C_e is the equilibrium HA concentration (mg mL^{-1}), Γ is the amount of HA adsorbed (mg/g), K_L is a Langmuir constant that relates to the affinity of binding sites, and Γ_{\max} (mg/g) is a Langmuir constant related to the maximum monolayer adsorption capacity, which describes a saturated monolayer of solute molecules on the adsorbent surface³⁵.

The Freundlich model is an empirical equation that assumes heterogeneous adsorption due to the diversity of adsorption sites. The Freundlich equation is:

$$\Gamma = K_F C_e^{1/n} \quad (2)$$

where C_e and Γ were described previously, K_F ($\text{mg}^{(1-1/n)}\text{mL}^{(1/n)}\text{g}^{-1}$) and n are the Freundlich constants, which represent the adsorption capacity and the adsorption strength, respectively ³⁵.

The Langmuir and Freundlich equations can be fitted to data by linear regressions using their linearized forms as follows:

$$\frac{C_e}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{\max}} C_e + \frac{1}{K_L \Gamma_{\max}} \quad (3)$$

$$\ln \Gamma = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (4)$$

where plots of $\frac{C_e}{\Gamma}$ versus C_e and $\ln \Gamma$ versus $\ln C_e$ allow to calculate the Langmuir and Freundlich constants, respectively.

Apart from these two models, a thermodynamic treatment also allows the determination of the $\Delta_{ads}G^o$. As it is well established, in the equilibrium chemical potential of HA in bulk solution μ_P^S is equal to the chemical potential of HA in the solution/MWCNT interface μ_P^I .

$$\mu_P^I = \mu_P^S \quad (5)$$

Replacing μ_{HA} by $\mu_{HA}^o + RT \ln a$:

$$\mu_{HA}^{oS} + RT \ln a_{HA}^S = \mu_{HA}^{oI} + RT \ln a_{HA}^I \quad (6)$$

Rearranging:

$$\ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} = \frac{-\mu_{HA}^{oI} - \mu_{HA}^{oS}}{RT} \quad (7)$$

And $-\mu_{HA}^{oI} - \mu_{HA}^{oS} = -\Delta_{ads}G^o$, then:

$$\ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} = \frac{-\Delta_{ads}G^o}{RT} \quad (8)$$

$$-\Delta_{ads}G^o = RT \ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} \quad (9)$$

Considering $a_{HA}^I \cong C_{HA}$ the thermodynamic state of infinite dilution, the expression for the calculation of $\Delta_{ads}G^o$ is:

$$\Delta_{ads}G^o = -RT \ln \frac{\Gamma_{ads}}{C_e} \quad (10)$$

The thermodynamic parameter $\Delta_{ads}G^o$ is the Gibbs free energy change of the system when one mole of molecules in the infinite dilution scheme is adsorbed on the surface of the nanotube, assuming that the amount of HA already adsorbed is almost zero. The value of $\Delta_{ads}G^o$ is the result of four contributions: (i) change in desolvation energy associated with the surface of the nanotube and HA ($\Delta_{des}G_{MWCNT}^o + \Delta_{des}G_{HA}^o$), (ii) Gibbs free energy change of HA-MWCNT interaction ($\Delta_{int}G_{p+MWCNT}^o$), (iii) Gibbs free energy change due to the HA conformational change ($\Delta_{conf}.G_{HA}^o$), and (iv) Gibbs free energy change associated with ion (i) exchange the interface (S) between HA adsorbed/solution ($\Delta_{ads}G_{S-i}^o$). $\Delta_{ads}G^o$ can be calculated as the sum of all these contributions according to equation 11.

$$\Delta_{ads}G^o = \Delta_{des}G_{MWCNT}^o + \Delta_{des}G_{HA}^o + \Delta_{int}G_{HA+MWCNT}^o + \Delta_{conf}.G_{HA}^o + \Delta_{ads}G_{S-i}^o \quad (11)$$

The values of $\Delta_{ads}G^o$ were determined by these three models from the data obtained experimentally by adsorption isotherms of HA on MWCNTs and are listed in Table 2.

Table 2. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA and PPHA onto MWCNTs on different systems with different models calculated.

System	Model	LHA		PPHA	
		ΔG° (kJ mol ⁻¹)	R ²	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	R ²
pH 2.5	Langmuir	-21.06	0.9941	-23.23	0.9915
	Thermodynamic	-19.22	0.9641	-23.28	0.9585
	Freundlich	-12.32	0.8783	-7.651	0.9752
pH 6.0	Langmuir	-11.44	0.9900	-18.89	0.9930
	Thermodynamic	-10.60	0.9828	-17.87	0.9900
	Freundlich	-5.974	0.8334	-5.365	0.9784
pH 12	Langmuir	-15.69	0.9873	-19.47	0.9955
	Thermodynamic	-14.31	0.9006	-19.38	0.9830
	Freundlich	-8.947	0.9426	-7.161	0.9672
pH 9	Langmuir	-14.40	0.9807	-13.86	0.9908
	Thermodynamic	-13.53	0.9549	-13.95	0.9845
	Freundlich	-7.530	0.8692	-8.401	0.9323
pH 5	Langmuir	-13.28	0.9980	-19.47	0.9955
	Thermodynamic	-13.21	0.9805	-19.17	0.9882
	Freundlich	-8.640	0.9680	-7.161	0.9672
pH 2.5 1 mM Li ₂ SO ₄	Langmuir	-18.62	0.9763	-21.87	0.9974
	Thermodynamic	-18.10	0.9567	-21.87	0.9164
	Freundlich	-11.70	0.8329	-11.96	0.7356
pH 2.5 10 mM Li ₂ SO ₄	Langmuir	-18.23	0.9634	-22.23	0.9934
	Thermodynamic	-18.02	0.9041	-22.41	0.8945
	Freundlich	-10.72	0.8452	-12.06	0.7363
pH 2.5 100 mM Li ₂ SO ₄	Langmuir	-25.65	0.9997	-22.66	0.9962
	Thermodynamic	-25.39	0.9809	-22.61	0.9284
	Freundlich	-9.730	0.9734	-12.10	0.7233
pH 2.5 500 mM Li ₂ SO ₄	Langmuir	-21.92	0.9166	-23.06	0.9959
	Thermodynamic	-21.59	0.8144	-23.58	0.9895
	Freundlich	-6.590	0.9125	-11.94	0.8549
pH 2.5 1 mM TMA	Langmuir	-18.48	0.9882	-22.20	0.9971
	Thermodynamic	-18.09	0.9422	-18.60	0.9569
	Freundlich	-11.55	0.8184	-12.46	0.9960
pH 2.5 10 mM TMA	Langmuir	-16.95	0.9823	-24.13	0.9980
	Thermodynamic	-17.09	0.9285	-21.67	0.9682
	Freundlich	-11.04	0.8515	-12.49	0.7910
pH 2.5 100 mM TMA	Langmuir	-23.29	0.9939	-27.53	0.9983
	Thermodynamic	-20.88	0.9734	-30.64	0.9530
	Freundlich	-5.292	0.9323	-13.43	0.9177
pH 2.5 500 mM TMA	Langmuir	-17.74	0.9945	-23.89	0.9919
	Thermodynamic	-17.36	0.8884	-25.19	0.9632
	Freundlich	-2.672	0.9937	-6.741	0.9520
pH 2.5 1 mM SCN	Langmuir	-19.12	0.9916	-20.24	0.9953
	Thermodynamic	-18.74	0.9853	-20.09	0.9697
	Freundlich	-11.93	0.8321	-11.54	0.7873
pH 2.5 10 mM SCN	Langmuir	-16.88	0.9708	-20.73	0.9980
	Thermodynamic	-16.85	0.9615	-18.82	0.9798
	Freundlich	-10.12	0.8657	-11.33	0.8001
pH 2.5 100 mM SCN	Langmuir	-23.29	0.9971	-26.47	0.9908
	Thermodynamic	-23.64	0.9689	-30.63	0.9629
	Freundlich	-6.533	0.9585	-13.18	0.9297
pH 2.5 500 mM KSCN	Langmuir	-17.17	0.9775	-21.62	0.9946
	Thermodynamic	-16.95	0.7938	-22.25	0.9299
	Freundlich	-5.415	0.9355	-6.459	0.9230

The negative values of $\Delta_{ads}G^o$ calculated by models indicate that adsorption of the HA on the surface of the nanotubes is spontaneous. Taking into account the goodness of the fit given by the correlation coefficient (R^2) in Table 2, the model that best fits the data is the Langmuir model. Therefore, Table 3 show K_L and Γ_{max} for all the systems studied in this work. Thus, we can compare the two HA structures.

Table 3. Langmuir constants of adsorption of LHA and PPHA.

System	PPHA		LHA	
	$K_L / (\text{g mg}^{-1})$	$\Gamma_{max} / (\text{mg g}^{-1})$	$K_L / (\text{g mg}^{-1})$	$\Gamma_{max} / (\text{mg g}^{-1})$
pH 2.5	11765	135.9	4902.0	259.3
pH 6.0	2040.8	24.59	101.30	29.06
pH 12	2584.0	58.22	560.85	106.5
pH 9.0	268.82	239.1	334.34	55.82
pH 5.0	2584.0	58.22	212.68	256.3
pH 2.5, 1 mM Li_2SO_4	6802.7	338.3	1834.9	456.6
pH 2.5, 10 mM Li_2SO_4	7874.0	359.3	1564.9	692.5
pH 2.5, 100 mM Li_2SO_4	9345.8	391.2	31250	642.3
pH 2.5, 500 mM Li_2SO_4	10989	716.8	6944.4	90.28
pH 2.5, 1 mM TMA	7751.9	300.9	1730.1	410.5
pH 2.5, 10 mM TMA	16949	317.6	935.45	726.7
pH 2.5, 100 mM TMA	66667	837.5	12048	8.734
pH 2.5, 500 mM TMA	15385	67.20	1283.7	20.73
pH 2.5, 1 mM KSCN	3521.1	386.8	2242.1	407.5
pH 2.5, 10 mM KSCN	4291.8	340.9	908.27	832.6
pH 2.5, 100 mM KSCN	43478	622.7	12048	53.11
pH 2.5, 500 mM KSCN	6135.0	65.96	1021.5	503.5

Differences in $\Delta_{ads}G^o$ for PPHA and LHA adsorptions show that the process depends on the nature of the HA, the first of which presents values of variation of Gibbs free energy of adsorption lower than the second, with the exception of systems in the presence 100mM Li_2SO_4 at pH 2.5 and 0 mM salt at pH 9.0. Γ_{max} observed in the isotherm, by Langmuir model, to HA Pahokee is 837.5 mg.g^{-1} in the 100 mM TMA at pH 2.5 system; to HA Leonardite is $\Gamma_{max} 832.6 \text{ mg.g}^{-1}$ in the 10 mM KSCN at pH 2.5 system. The K_L values show the high affinity of binding sites.

Free energy Gibbs is resulted of the enthalpy and entropic contribution. Therefore, to better understanding of the adsorption process is necessary to measure or calculates this energy.

3.3. Microcalorimetric experiments

In order to better understand the effect of these electrolytes on the adsorption of HA on the surface of MWCNTs, the effects of TMA, KSCN and Li₂SO₄ salts at pH 2.5 were assessed by isothermal titration calorimetry.

The adsorption of HA in MWCNTs is a spontaneous process, so $\Delta_{ads}G$ is negative. The change free energy Gibbs has two contributions:

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S \quad (17)$$

The values of $\Delta_{ads}H$ represent the total enthalpy energy absorbed or released when HA is adsorbed on the surface of MWCNTs. The magnitude of $\Delta_{ads}H$ reflects the contributions of four other processes ³⁶:

- (i) association / dissociation of ions with charged groups on the surface of HA ($\Delta_{ads}H_i$);
- (ii) HA-MWCNTs interaction ($\Delta_{int}H_{HA+MWCNT}^o$);
- (iii) changes in the solvation of the adsorbent surface and HA molecules ($\Delta_{ads}H_{sol}$);
- (iv) rearrangement of the molecular structure of HA ($\Delta_{ads}H_{conf.rear.}$)

Thus:

$$\Delta_{ads}H = \Delta_{ads}H_i + \Delta_{int}H_{HA+MWCNT}^o + \Delta_{ads}H_{sol} + \Delta_{ads}H_{conf.rear.} \quad (18)$$

The first contribution, $\Delta_{ads}H_i$ is associated with interaction of ions in solution with charged groups in the molecules of HA and MWCNTs during the adsorption process, this being an exothermic process. The second contribution, $\Delta_{int}H_{HA+MWCNT}^o$, refers to the interaction between HA-MWCNTs. These interactions occur via hydrophobic

contributions, dispersion interactions occurring with release of energy, contributing to a $\Delta_{ads}H$ exothermic. The third contribution, $\Delta_{ads}H_{sol}$, refers to the desolvation of the HA and the nanotube surface, this process is endothermic, because for it to occur is necessary to break the interactions water-MWCNTs, MWCNTs-ion, ion-HA and water-HA. The fourth contribution, $\Delta_{ads}H_{conf.rear.}$, is associated with conformational change of HA adsorption onto surfaces. The conformational change is endothermic, as occurs with the breaking of intramolecular interactions.

The energy released or absorbed as heat in a thermodynamic process can be measured by calorimetric techniques. Among those, isothermal titration microcalorimetric (ITC) has been widely used in determination of many molecular processes due its high sensitivity, with the possibility of detection of energy flows in the order of 10^{-9} J occurring in a given process.

The enthalpy change of adsorption ($\Delta_{ads}H$) versus Γ for the adsorption of PPHA and of LHA on MWCNT at pH 2.5 in different systems obtained from ITC measurements at 298K are shown in Figure 5.

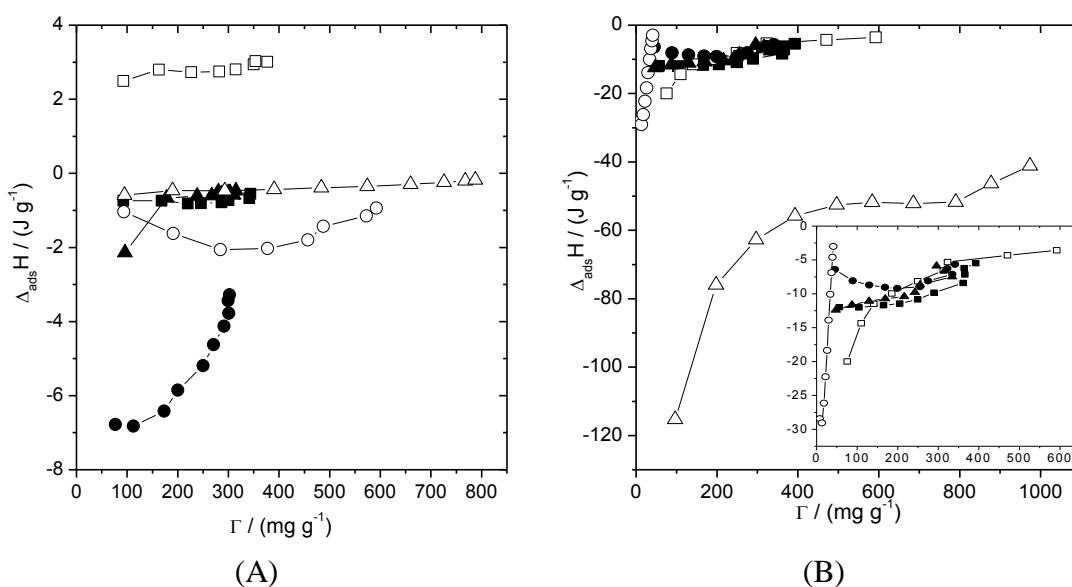


Figure 5. $\Delta_{ads}H$ of adsorption ($J g^{-1}$) versus Γ ($mg g^{-1}$) for the adsorption process of PPHA (A) and LHA (B) onto MWCNT at pH 2.5 at different systems (\blacksquare) 10 mM of Li_2SO_4 ; (\square) 100 mM Li_2SO_4 ; (\bullet) 10 mM KSCN; (\circ) 100 mM KSCN; (\blacktriangle) 10 mM TMA; (\triangle) 100 mM TMA .

The curves as a function of Γ have the same profile in the presence and absence of TMA and Li_2SO_4 to LHA and PPHA, but with different slopes. $\Delta_{\text{ads}}H$ values are initially exothermic and becomes increasingly more negative, except in the presence of the 100 mM Li_2SO_4 ($\Delta_{\text{ads}}H$ endothermic). These results analyzed together with adsorption isotherms, allow inferring the values of variation in enthalpy of adsorption, in the presence of the electrolyte, is less negative than the value in the absence of electrolyte (data not shown), due to the contributions of endothermic processes in accordance to equation 18: $\Delta_{\text{ads}}H_{\text{sol}}$ and $\Delta_{\text{ads}}H_{\text{conf.rear}}$. Besides the disruption of the interactions in the process $\Delta_{\text{ads}}H_{\text{sol}}$ above, there is also the break interactions TMA-water and TMA-HA in the presence of TMA electrolyte, adsorption to occur. These interactions are quite intense, as they are characterized by hydrogen bonds and electrostatic attractions, respectively. Furthermore, by interacting with the hydrophobic surface of MWCNTs, the HA changes its conformation in such a way that the hydrophilic groups are exposed and free to interact with the electrolyte solution ³⁷. The process described above also occurs in the presence of the others salts, with except of the 100 mM Li_2SO_4 . In the presence of 100 mM Li_2SO_4 , the endothermic processes absorb energy greater than that released by the exothermic processes. Thus, the change in enthalpy becomes positive.

From the calorimetric data and models of isotherms is possible to calculate the entropic contribution to the change in Gibbs free energy. However, it is necessary to calculate the $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ obtained by the approximation of infinite dilution scheme in the extrapolation of a curve $\Delta_{\text{ads}}H$ (kJ mol^{-1}) as a function of the equilibrium concentration (C_e). For this, one must know HA molar mass. Despite not having a consensus in the scientific community about the value of HA molar mass, we use the average chemical formula suggested by researchers Schnitzer and Kunal ³⁸, $\text{C}_{187}\text{H}_{186}\text{O}_{89}\text{N}_9\text{S}_2$, so that we can analyze the entropic contribution. We know the limitations of the proposed formula of HA, however, we will not compare the different HA among themselves. Our goal is to

find an approximate value and / or hypothetical of the $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$, so to allow us to analyze the entropic contribution to the adsorption of LHA on MWCNT in systems studied.

The values of $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ and $T\Delta_{\text{ads}}S$ were determined for PPHA and for LHA at pH 2.5 in the presence of 10 and 100 mM TMA; 10 and 100 mM Li_2SO_4 ; 10 and 100 mM KSCN are listed in Table 4. We used the Langmuir model because it was the best fit.

Table 4. Thermodynamic parameters of adsorption of PPHA and LHA onto MWCNTs at pH 2.5 in the presence of 10 and 100 mM of salts (TMA, Li_2SO_4 and KSCN) calculated with Langmuir model.

PPHA at pH 2.5	$\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹) Lang.	$\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	R²
10 mM TMA	-24.13	-2.731	21.40	0.9715
100 mM TMA	-28.00	-2.022	25.51	0.9946
10 mM Li_2SO_4	-22.23	-3.530	18.70	0.9421
100 mM Li_2SO_4	-22.66	11.05	33.71	0.9545
10 mM KSCN	-20.73	-28.24	-7.509	0.9832
100 mM KSCN	-26.47	-0.5805	25.89	0.9415
LHA at pH 2.5	$\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹) Lang.	$\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	R²
10 mM TMA	-16.95	-61.44	-44.49	0.9474
100 mM TMA	-23.29	-628.4	-605.1	0.9782
10 mM Li_2SO_4	-18.23	-49.16	-30.92	0.9769
100 mM Li_2SO_4	-25.65	-138.3	-112.7	0.9750
10 mM KSCN	-16.88	-17.76	-0.8752	0.9914
100 mM KSCN	-23.29	-174.0	-150.7	0.9947

The correlation coefficient was greater than 0.9 for all systems studied, which shows a good fit of the models studied. $T\Delta_{\text{ads}}S$ is positive for the adsorption of PPHA on MWCNTs at pH 2.5 in the studied systems, except in the presence of 10 mM KSCN. $T\Delta_{\text{ads}}S$ is negative for the adsorption of LHA on MWCNTs at pH 2.5 in the studied systems.

The entropic contribution balancing occurs by two processes. The first is the conformational change of the HA to a more linear conformation the surface of the MWCNT and subsequent electrostatic interaction among ions in solution and the

ionizable groups of the HA ³¹. This interaction would reduce the degree of translational freedom of the species charged and therefore decrease the entropy of the system.

The second process is related to the interaction HA-MWCNT. For the HA interacts with the surface of MWCNT, both the HA and the MWCNT need to release the molecules of solvation (H₂O and ions). This process releases the molecules into solution and this causes the increase of the configurational entropy of the system.

Thus, the balance of these two processes mentioned above is that because the $\Delta_{\text{ads}}S$. Thus, for cases with entropy greater than zero, this second factor prevails over so first. Therefore, adsorption processes of PPHA at pH 2.5 onto MWCNTs at systems 10 and 100 mM TMA, 10 mM Li₂SO₄ and 100 mM KSCN, are promoted by entropy increase and enthalpy decrease; the driving force of the adsorption of PPHA in presence of 100 mM Li₂SO₄ is entropy; and in the presence 10 mM KSCN is enthalpy. Adsorption processes of LHA at pH 2.5 onto MWCNTs at systems studied are enthalpy driven. These results, therefore, show that the LHA and PPHA has different structure.

4. Conclusion

The effect of ionic strength and pH on the adsorption of PPHA and LHA onto MWCNT was studied. The PPHA and LHA had different surface properties. The system that adsorbed PPHA and LHA the most were, respectively, pH 2.5: 100 mM TMA and 100 mM Li₂SO₄. These results, therefore, show that the LHA and PPHA has different structure.

The isotherms obtained at 298K where fitted by the Langmuir, Thermodynamic and Freudlinch models. Taking into account the quality of the fit gave by the correlation coefficient (R^2), the Langmuir model was the best fit the experimental data.

It was described for the first time the use of microcalorimetric technique to evaluate the adsorption of HA onto MWCNTs. Adsorption thermodynamic of LHA and

PPHA onto MWCNT was evaluated using isothermal titration calorimetry (ITC) as the main technique. The adsorption of HA on MWCNT is a spontaneous process ($\Delta_{\text{ads}}G^{\circ} < 0$). $T\Delta_{\text{ads}}S$ is positive to adsorption of PPHA on MWCNTs at pH 2.5 in the studied systems, except in presence of 10 mM KSCN. $T\Delta_{\text{ads}}S$ is negative to adsorption of LHA on MWCNTs at pH 2.5 in all the studied systems.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian agencies CNPq, FAPEMIG, CAPES (PNPD), and to Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) for financial support.

6. References

1. Odom, T. W.; Huang, J.-L.; Kim, P.; Lieber, C. M., Structure and electronic properties of carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (13), 2794-2809.
2. Balavoine, F.; Schultz, P.; Richard, C.; Mallouh, V.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C., Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: a first step towards the development of new biosensors. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (13-14), 1912-1915.
3. Frackowiak, E.; Metenier, K.; Bertagna, V.; Beguin, F., Supercapacitor electrodes from multiwalled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2000**, *77* (15), 2421-2423.
4. Jarvis, S. P.; Uchihashi, T.; Ishida, T.; Tokumoto, H.; Nakayama, Y., Local solvation shell measurement in water using a carbon nanotube probe. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (26), 6091-6094.
5. Lee, S. M.; Lee, Y. H., Hydrogen storage in single-walled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2000**, *76* (20), 2877-2879.
6. Baughman, R. H.; Cui, C.; Zakhidov, A. A.; Iqbal, Z.; Barisci, J. N.; Spinks, G. M.; Wallace, G. G.; Mazzoldi, A.; De Rossi, D.; Rinzler, A. G.; Jaschinski, O.; Roth, S.; Kertesz, M., Carbon nanotube actuators. *Science* **1999**, *284* (5418), 1340-1344.
7. Shi Kam, N. W.; Jessop, T. C.; Wender, P. A.; Dai, H., Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (22), 6850-6851.
8. Khodakovskaya, M.; Dervishi, E.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Li, Z.; Watanabe, F.; Biris, A. S., Carbon Nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano* **2009**, *3* (10), 3221-3227.
9. Ajayan, P.; Zhou, O., Applications of Carbon Nanotubes. Dresselhaus, M.; Dresselhaus, G.; Avouris, P., Eds. Springer Berlin / Heidelberg: 2001; Vol. 80, pp 391-425.
10. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M., Chemistry of carbon nanotubes.

Chemical Reviews **2006**, *106* (3), 1105-1136.

11. Moore, V. C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Hauge, R. H.; Smalley, R. E.; Schmidt, J.; Talmon, Y., Individually suspended Single-Walled Carbon Nanotubes in various surfactants. *Nano Letters* **2003**, *3* (10), 1379-1382.
12. Matsuura, K.; Saito, T.; Okazaki, T.; Ohshima, S.; Yumura, M.; Iijima, S., Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions. *Chemical Physics Letters* **2006**, *429* (4-6), 497-502.
13. Zheng, M.; Jagota, A.; Semke, E. D.; Diner, B. A.; McLean, R. S.; Lustig, S. R.; Richardson, R. E.; Tassi, N. G., DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nature Materials* **2003**, *2* (5), 338-342.
14. Wang, S.; Humphreys, E. S.; Chung, S.-Y.; Delduco, D. F.; Lustig, S. R.; Wang, H.; Parker, K. N.; Rizzo, N. W.; Subramoney, S.; Chiang, Y.-M.; Jagota, A., Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nature Materials* **2003**, *2* (3), 196-200.
15. O'Connell, M. J.; Boul, P.; Ericson, L. M.; Huffman, C.; Wang, Y.; Haroz, E.; Kuper, C.; Tour, J.; Ausman, K. D.; Smalley, R. E., Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chemical Physics Letters* **2001**, *342* (3-4), 265-271.
16. (a) Gamboa, C.; Olea, A. F., Association of cationic surfactants to humic acid: Effect on the surface activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *278* (1-3), 241-245; (b) Koopal, L. K.; Goloub, T. P.; Davis, T. A., Binding of ionic surfactants to purified humic acid. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *275* (2), 360-367.
17. Vergütz, L., Studying the soil compartment of the global carbon cycle [tese de doutorado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2011.
18. McCall, M. J., Environmental, health and safety issues: nanoparticles in the real world. *Nature Nanotechnology* **2011**, *6* (10), 613-614.
19. Kelleher, B. P.; Simpson, A. J., Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (15), 4605-4611.
20. Christensen, J. J.; Hansen, L. D.; Izatt, R. M., *Handbook of proton ionization heats and related thermodynamic quantities*. John Wiley & Sons: New York, 1976.
21. Tam, K. C.; Wyn-Jones, E., Insights on polymer surfactant complex structures during the binding of surfactants to polymers as measured by equilibrium and structural techniques. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35* (8), 693-709.
22. Velázquez-Campoy, A.; Ohtaka, H.; Nezami, A.; Muzammil, S.; Freire, E., Isothermal titration calorimetry. In *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc.: 2004.
23. Newcombe, G.; Drikas, M., Adsorption of NOM onto activated carbon: electrostatic and non-electrostatic effects. *Carbon* **1997**, *35* (9), 1239-1250.
24. De Wit, J. C. M.; Van Riemsdijk, W. H.; Nederlof, M. M.; Kinniburgh, D. G.; Koopal, L. K., Analysis of ion binding on humic substances and the determination of intrinsic affinity distributions. *Analytica Chimica Acta* **1990**, *232* (0), 189-207.
25. Moreno-Castilla, C., Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon* **2004**, *42* (1), 83-94.
26. Summers, R. S.; Roberts, P. V., Activated carbon adsorption of humic substances: I.

Heterodisperse mixtures and desorption. *Journal of Colloid and Interface Science* **1988**, *122* (2), 367-381.

27. Ghosh, K.; Schnitzer, M., Macromolecular Structures of Humic Substances. *Soil Science* **1980**, *129* (5), 266-276.

28. Chan, T. C.; Chan, M. L., Diffusion of pseudo-planar molecules: an experimental evaluation of the molecular effects on diffusion. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1992**, *88* (16), 2371-2374.

29. Chan, M. L.; Chan, T. C., Diffusion of Pseudoplanar Solutes: An Investigation on the Effects of Hydrogen Bonding. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99* (16), 5765-5768.

30. Sutton, R.; Sposito, G., Molecular structure in soil Humic Substances: the new view. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (23), 9009-9015.

31. Schmitt, P.; Freitag, D.; Trapp, I.; Garrison, A. W.; Schiavon, M.; Kettrup, A., Binding of s-triazines to dissolved humic substances: Electrophoretic approaches using Affinity Capillary Electrophoresis (ACE) and Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC). *Chemosphere* **1997**, *35* (1-2), 55-75.

32. Chilom, G.; Bruns, A. S.; Rice, J. A., Aggregation of humic acid in solution: contributions of different fractions. *Organic Geochemistry* **2009**, *40* (4), 455-460.

33. Giles, C. H.; Smith, D.; Huitson, A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *47* (3), 755-765.

34. Giles, C. H.; D'Silva, A. P.; Easton, I. A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm part. II. Experimental interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *47* (3), 766-778.

35. Wu, C.-H., Adsorption of reactive dye onto carbon nanotubes: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, *144* (1-2), 93-100.

36. Norde, W.; Lyklema, J., Thermodynamics of protein adsorption. Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1979**, *71* (2), 350-366.

37. Lin, D.; Tian, X.; Li, T.; Zhang, Z.; He, X.; Xing, B., Surface-bound humic acid increased Pb²⁺ sorption on carbon nanotubes. *Environmental Pollution* **2012**, *167* (0), 138-147.

38. Khan, S. U., *Soil Organic Matter*. Elsevier Science: 1975.

CAPÍTULO 2: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acids into multiwalled carbon nanotubes in presence of Hofmeister series salts. Part II

Igor José Boggione Santos¹, Leonardus Vergutz^{1,2}, Luis Henrique Mendes da Silva^{1*}
and Maria do Carmo Hespanhol da Silva¹

¹ Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

² Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

* *Corresponding author.* Fax: +55 31 3899 3065. E-mail address: luhen@ufv.br (L. H. M. da Silva)

Abstract

In this work we studied the adsorption behavior of Leonardite humic acids (LHA) onto multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in the presence of six salts from the Hofmeister series (HSe) to determine the effect of the HSe on interaction LHA-MWCNT. The high values of Γ demonstrate a great potential of MWCNT in adsorbing HA. It is also shown that the adsorption mechanism depends on the nature of the HSe salts. SCN^- and Ba^{2+} are chaotropic electrolytes and should disfavor LHA adsorption on MWCNT. Our results collaborate with this hypothesis. However, HPO_4^{2-} , NH_4^+ and $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ are kosmotropic electrolytes and decrease LHA adsorption on MWCNT. Therefore, these results elucidate that the adsorption of LHA at pH 2.5 not necessarily follow the HSe. Thermodynamic parameters were determined using three models: Langmuir, Freundlich, and the thermodynamic model of infinite dilution. Taking into account the goodness of fit, the Langmuir model fitted the best to the experimental data. The thermodynamic analysis, based on calorimetric titrations, showed that LHA adsorption onto MWCNT occurs spontaneously ($\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$). The process is enthalpically favorable for all systems studied of anionic HSe. $T\Delta_{\text{ads}}S$ is positive only for the adsorption of LHA on MWCNTs at pH 2.5 in the presence TMA and BaCl_2 . In the case of BaCl_2 , hydrophobic interactions, which is promoted by entropy increase, is expected to be the driving force of the adsorption process.

Keywords: adsorption, humic acid, isothermal titration calorimetry, multi-walled carbon nanotubes, Hofmeister series, thermodynamics.

1. Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) are a relatively new class of compounds with outstanding characteristics and promising applications in a variety of fields. The unique structural, mechanical, and electrical properties of CNTs makes them suitable for a variety of nanotechnological applications such as biosensors ¹, capacitors ², atomic force microscopy ³, fuel storage ⁴, biomedical devices ⁵, drug delivery systems ⁶, plant nutrition ⁷, and many more ⁸.

However, besides its astonishing properties and wide range of promising applications CNTs usage needs to overcome a major issue. It is necessary increase CNTs suspend and individualize the tubes, in order to take advantage of all these great characteristics CNTs. One way to increase CNTs suspended is by modifying its structure, adding functional groups to it through chemical reactions or wrapping/coating it with polymers ¹⁰. There are three main approaches for the modification of CNTs' structure, namely: (i) covalent attachment of chemical groups through reactions onto the π -conjugated skeleton of CNTs; (ii) noncovalent adsorption of various functional molecules; and (iii) the endohedral filling of their inner empty cavity.

Through such modifications, the suspended of CNTs is clearly improved and their biocompatibility profile completely transformed. However, in order to improve the biotechnological applications of CNTs it is extremely necessary to improve its water solubility, once water is the medium required for any eventual interface to biochemistry. Not just that but the polymer used for coating the CNTs must also be biologically safe, not causing any damage to biological molecules such as denaturation for example, a problem that may occur with surfactants ⁹.

Humic substances (HS) are one of the most abundant organic compounds in the Earth, found in nearly all soils, sediments, and natural waters. They are formed by chemical, physical, and biological transformation of plant, animal, and microorganisms

matter into relatively stable and polydisperse structures. HS are amphiphile molecules that behave like weak-acid polyelectrolytes and display the ability to associate with different molecules by electrostatic and/or hydrophobic interactions ^{10,11}, with a capacity of changing the character of its interactions (from electrostatic to hydrophobic) depending on the characteristics of the solution ¹¹. Therefore, they play a key role in many, if not most, chemical and physical properties in their environment.

Due to the high hydrophobicity of the side-walls of CNTs it is probable that HS can attach onto CNTs by a hydrophobic (noncovalent) interaction, as it happens for proteins ¹². By being a very stable biological molecule HS represent an ideal biopolymer for wrapping/coating CNTs. The binding of HS onto CNTs would open the door to new ways of manipulating and dispersing the nanotubes and would be of great importance for the understanding of CNTs fate in the environment. As nanomaterials applications have grown exponentially, it is important to assess their impact in the environment, but we are far from having a good understanding about realistic exposures to nanomaterials ¹³. In order to get real-life exposure information we must understand how nanoparticles would interact in the environment and what changes they will pose to the molecules/particles they are interacting with them. It makes the understanding of HS-CNTs interaction even more important once HS are widespread in all kinds of environments, which means that when discharged in the environment nanotubes will certainly interact with HS. HS can be divided in three types with humic acids (HA) being a major component of HS and considered to be one of the most recalcitrant fractions of it ¹⁴.

One way of handling this interaction and modulation HS-CNTs is the addition of electrolytes to the solution. Ions play an important role in many natural processes, biological and technological and therefore the study and description of the properties of electrolyte solutions have aroused greater interest of the scientific community in the last 100 years ¹⁵. During the 1880s and 1890s Franz Hofmeister, Prof. of Pharmacology at the

University of Prague, and some of his co-workers published a series of papers with the title, in English: ‘About the science of the effect of salts’. However, the relevant observations are usually not unambiguous. They are often inconsistent and there are even some remarkable contradictions ¹⁶.

It follows from this report that alkali salts can be arranged in an order based on their capability to precipitate globulin. However, the strength of this water absorbing effect varies for each salt. Hofmeister believes that the results should be valid not just for protein substances. It should hold also for any other colloidal substance ¹⁶.

Advances in experimental and computational methods have led to a recent interest in the Hofmeister series (HSe) and its molecular origin ¹⁷. The conclusions reached by Hofmeister are far from trivial, and are not explained by theories of solution or colloidal chemistry ¹⁸. The primary reason for this lack is that the HSe emerges from a combination of effects co-solutes general structure of the solvent, and specific interactions between the solute and co-solute (protein or other biopolymers) ¹⁹.

Therefore, in order to evaluate and comprehend the effect on the HSe in the interactions between CNTs and HS we performed the thermodynamic study of the interaction between LHA and MWCNTs in electrolyte solution. We believe that understanding the thermodynamic pattern of the LHA-MWCNTs interaction is of great importance to improve the applications of MWCNTs and to investigate the fate and consequences that MWCNTs will have when discharged in the environment. We evaluated the increasing concentrations of six salts from the HSe in the binding process of LHA to MWCNTs through adsorption isotherm experiments. The specific objectives of this study were: (i) evaluate the nature of LHA-MWCNTs interaction, (ii) evaluate the influence of six salts from the HSe on this interaction, and (iii) determine the effect of the HSe on adsorption of LHA onto MWCNT. This study aims to better understand LHA-

MWCNT interaction and, hereafter, further improve the dispersion of MWCNT with the addition of LHA and apply it to various pharmacological and environmental sectors.

2. Experimental

2.1. Materials

MWCNTs (C_{Tube} 100) were purchased from CNT Co., Ltd., Korea, and used in the experiments without further purification. According to the manufacturer this product purity is > 95% (wt), with an average diameter of 20 nm, length ranging from 1-25 μm , bulk density varying from 0.03-0.05 g cm^{-3} , and specific surface area from 150-250 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. The salts from the HSe barium chloride, ammonium chloride, tetramethylammonium chloride (Sigma-Aldrich, 98% purity), sodium sulfate (Vetec, 98 % purity), sodium thiocyanate (Dinâmica, 98 % purity), sodium hydrogenphosphate (Vetec, 99 % purity) were used as received. Standard Leonardite humic acids (LHA) was purchased from the International Humic Substances Society (IHSS) and used as received.

2.2. Adsorption experiments

Adsorption isotherm experiments of LHA binding onto MWCNTs were performed at 25 °C. In these experiments 10 mL of solutions containing LHA (LHA's concentration ranging from 0.1 to 1.0 mg mL^{-1} , with intervals of 0.1 mg mL^{-1}) were left to react with 10 mg of MWCNTs for 24 h in capped glass tubes. After this time, the tubes were centrifuged and the equilibrium solution (supernatant) was sampled for the determination of LHA's concentration by light absorbance at a UV/Vis spectrometer. These experiments were carried out in pure ionized water at pH 2.5, adjusted with H_2SO_4 , because this pH were the best pH for the adsorption was found (maximum LHA adsorption into MWCNTs). We chose six salts from the HSe due to their known effects on the solubility of molecules. HSe salts, depending on their position in the series, have the ability to either strengthen or weaken the hydrophobic interactions, decreasing (salting

out effect) or increasing (salting in effect) the solubility of nonpolar molecules, respectively.

For each point of these isotherms, the adsorbed amount of LHA into MWCNTs was directly calculated from differences between the initial LHA concentration and the concentration of HA at the equilibrium after the 24 h reaction, as follow:

$$\Gamma = \left(\frac{C_i - C_e}{m} \right) V \quad (1)$$

where Γ is the adsorbed amount of LHA onto MWCNTs (mg g^{-1}) at the equilibrium (24 h); C_i is the initial LHA concentration (mg mL^{-1}); C_e is the LHA concentration at the equilibrium (mg mL^{-1}); V is the total solution volume (mL); and m is the mass of MWCNTs (g).

3. Results and Discussion

3.2 Adsorption isotherms

3.2.1. Effects of Hofmeister series

We studied LHA adsorption onto MWCNT in the presence of chaotropics and kosmotropic salts to evaluate the role of water tertiary structure and ion-LHA interaction in this adsorption process. The experimental conditions were pH 2.5 and 100 mM salt concentration.

The adsorption isotherms of LHA onto MWCNT in the presence of different salts are shown in Figure 1, where the amount of adsorbed LHA (mg) per g of MWCNT is plotted against the equilibrium concentration of the respective LHA (mg mL^{-1}).

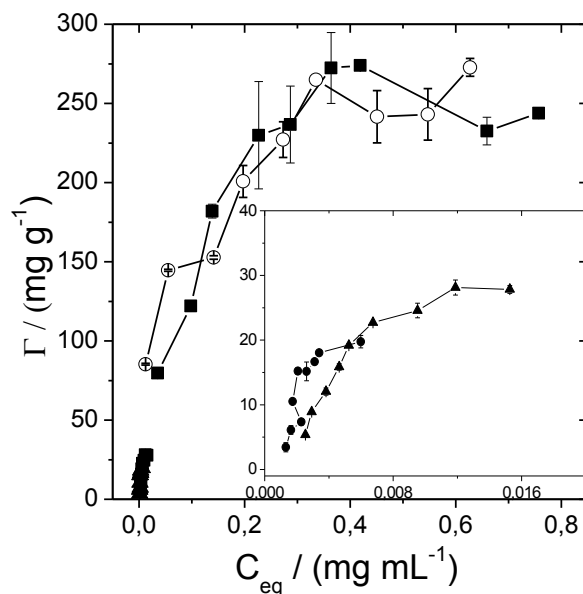


Figure 1. Adsorption isotherms of LHA on MWCNT at different systems (■) pH 2,5, 0 mM of salt; (○) pH 2,5, 100 mM Na₂HPO₄; (▲) pH 2,5, 100 mM Na₂SO₄; (●) pH 2,5, 100 mM NaSCN.

The influence of 100 mM of HPO₄²⁻, SO₄²⁻ and SCN⁻ anions from the HSe on the adsorption process is shown in Figure 1. The maximum adsorption capacity in the presence of each one of these anions are: $\Gamma_{HA}^{pH\ 2.5} = 273.9\ \text{mg g}^{-1}$, $\Gamma_{HA}^{NaSCN} = 19.76\ \text{mg g}^{-1}$, $\Gamma_{HA}^{Na_2SO_4} = 28.12\ \text{mg g}^{-1}$, $\Gamma_{HA}^{Na_2HPO_4} = 295.7\ \text{mg g}^{-1}$.

NaSCN is a chatropic electrolyte, thus decreases the interactions among water molecules increasing the solubility of LHA, which should disfavors LHA adsorption on MWCNT. Our results collaborate with this hypothesis. Na₂HPO₄ and Na₂SO₄ are kosmotropic electrolytes that display the ability to strengthen the tertiary structure of water, which should decrease LHA solubility and increase LHA adsorption on MWCNT. However, in our work it held just for Na₂HPO₄. Therefore, these results elucidate that the adsorption of LHA at pH 2.5 not necessarily follow the HSe.

The adsorption isotherms of the LHA on MWCNT in the presence of different salts are shown in Figure 2, where the amount of adsorbed LHA (mg) per g of MWCNT is plotted against the equilibrium concentration of the respective LHA (mg mL⁻¹).

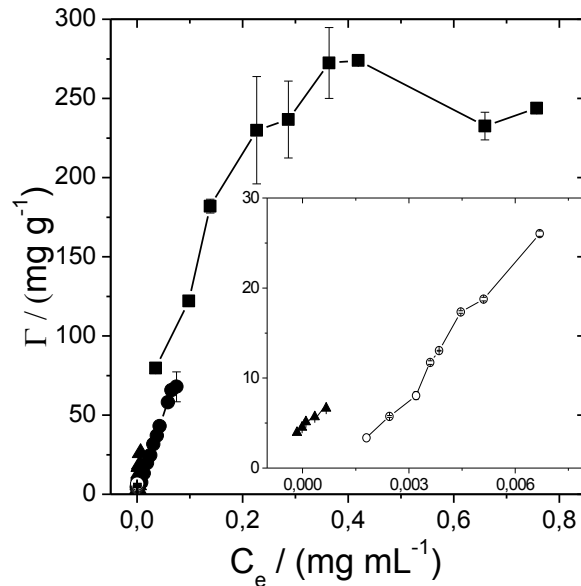


Figure 2. Adsorption isotherms of LHA on MWCNT at different systems (■) pH 2,5, 0 mM of salt; (○) pH 2,5, 100 mM NH_4Cl ; (▲) pH 2,5, 100 mM BaCl_2 ; (●) pH 2,5, 100 mM TMA.

Figure 2 evaluates the influence of the NH_4^+ , Ba^{2+} and TMA cations from the HSe on the adsorption process. The maximum adsorption capacity for each cation were:

$$\Gamma_{\text{HA}}^{\text{pH } 2.5} = 273.9 \text{ mg g}^{-1}, \quad \Gamma_{\text{HA}}^{(\text{CH}_3)_4\text{NCl}} = 67.92 \text{ mg g}^{-1}, \quad \Gamma_{\text{HA}}^{\text{NH}_4\text{Cl}} = 26.04 \text{ mg g}^{-1},$$

$$\Gamma_{\text{HA}}^{\text{BaCl}_2} = 6.640 \text{ mg g}^{-1}.$$

BaCl_2 is a chatropic electrolyte that causes the interactions between the water molecules to decrease. This should increase the solubility of LHA, disfavoring the adsorption process, which is confirmed by our results. On the other hand, NH_4Cl and TMA are kosmotropic electrolytes that strengthen the tertiary structure of water, which should lead to a decrease in HA's solubility, favoring the adsorption process. However, as it happened with the kosmotropic anions, it did not occur. Therefore, these results elucidate that the adsorption of LHA at pH 2.5 not necessarily follow the HSe. These results show that the presence of cations from the HSe reduce the adsorptive capacity of MWCNTs probably by a competitive mechanism among the anions present in the system, sulphate and chloride. According to this hypothesis, the chloride anions adsorb at the

interface better adsorbed LHA/solution resulting in a less efficient electrostatic shield, which would cause a lower coverage of the surface of MWCNTs.

From the results obtained for the HSe, we find that the Hofmeister effect can not be used to explain the influence on the adsorption of LHA in MWCNT. Shipovskov and co-workers also reported the incompatibility of the results obtained with the classification of ions according to the HSe. They studied catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids and they demonstrate that there must be enzyme-specific interactions between the laccases and the ions, and these seem to overwhelm the underlying Hofmeister effects²⁰. Therefore, to better understand the interaction MWCNT-LHA in the presence of salts, was analyzed the thermodynamic properties of systems.

3.3. Thermodynamic properties

Thermodynamic parameters of adsorption were determined for a better understanding of the adsorption mechanisms of LHA onto MWCNTs. Langmuir and Freundlich equations are the most commonly applied models for representing the nonlinear adsorption of organic chemicals, such as phenolic compounds, to activated carbon, charcoal, and carbon nanotubes^{21,22}. Furthermore, were used to adjust the thermodynamic model of treatment for dilute solutions.

Apart from these models, a thermodynamic treatment also allows the determination of the $\Delta_{ads}G^o$. As it is well established, in the equilibrium chemical potential of LHA in bulk solution μ_p^S is equal to the chemical potential of LHA in the solution/MWCNT interface μ_p^I .

$$\mu_p^I = \mu_p^S \quad (2)$$

Replacing μ_{HA} by $\mu_{HA}^o + RT \ln a$:

$$\mu_{HA}^{oS} + RT \ln a_{HA}^S = \mu_{HA}^{oI} + RT \ln a_{HA}^I \quad (3)$$

Rearranging:

$$\ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} = \frac{-\mu_{HA}^{oI} - \mu_{HA}^{oS}}{RT} \quad (4)$$

And $-\mu_{HA}^{oI} - \mu_{HA}^{oS} = -\Delta_{ads}G^o$, then:

$$\ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} = \frac{-\Delta_{ads}G^o}{RT} \quad (5)$$

$$-\Delta_{ads}G^o = RT \ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} \quad (6)$$

Considering $a_{HA}^I \cong C_{HA}$ the thermodynamic state of infinite dilution, the expression for the calculation of $\Delta_{ads}G^o$ is:

$$\Delta_{ads}G^o = -RT \ln \frac{\Gamma_{ads}}{C_e} \quad (7)$$

The thermodynamic parameter $\Delta_{ads}G^o$ is the Gibbs free energy change of the system when one mole of molecules in the infinite dilution scheme is adsorbed on the surface of the nanotube, assuming that the amount of LHA already adsorbed is almost zero. The value of $\Delta_{ads}G^o$ is the result of four contributions: (i) change in desolvation energy associated with the surface of the nanotube and LHA ($\Delta_{des}G_{MWCNT}^o + \Delta_{des}G_{HA}^o$), (ii) Gibbs free energy change of LHA-MWCNT interaction ($\Delta_{int}G_{p+MWCNT}^o$), (iii) Gibbs free energy change due to the LHA conformational change ($\Delta_{conf.}G_{HA}^o$), and (iv) Gibbs free energy change associated with ion exchange (i) the interface between (S) LHA adsorbed/solution ($\Delta_{ads}G_{S-i}^o$). $\Delta_{ads}G^o$ can be calculated as the sum of all these contributions according to equation 8.

$$\Delta_{ads}G^o = \Delta_{des}G_{MWCNT}^o + \Delta_{des}G_{HA}^o + \Delta_{int}G_{HA+MWCNT}^o + \Delta_{conf.}G_{HA}^o + \Delta_{ads}G_{S-i}^o \quad (8)$$

The values of $\Delta_{ads}G^o$ were determined by these three models from the data obtained experimentally by adsorption isotherms of LHA on MWCNTs and are listed in Tables 1 and 2.

Table 1. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA onto MWCNTs, evaluating HSe cations.

LHA_HSe Cationic	Model	ΔG^o (kJ mol ⁻¹)	R ²
pH 2,5 100 mM BaCl ₂	Langmuir	-32,52	0,9545
	Thermodynamic	-25,56	0,9140
	Freundlich	-3,072	0,9489
pH 2,5 100 mM TMA	Langmuir	-23,29	0,9938
	Thermodynamic	-20,88	0,9734
	Freundlich	-5,292	0,9322
pH 2,5 100 mM NH ₄ Cl	Langmuir	-19,29	0,4135
	Thermodynamic	-18,74	0,9144
	Freundlich	-3,036	0,9576

Table 2. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA onto MWCNTs, evaluating the HSe anions.

LHA_HSe anionic	Model	ΔG^o (kJ mol ⁻¹)	R ²
pH 2,5 100 mM Na ₂ HPO ₄	Langmuir	-20,32	0,9966
	Thermodynamic	-18,56	0,9388
	Freundlich	-11,98	0,9526
pH 2,5 100 mM Na ₂ SO ₄	Langmuir	-22,35	0,9828
	Thermodynamic	-20,19	0,9563
	Freundlich	-4,287	0,9572
pH 2,5 100 mM NaSCN	Langmuir	-23,51	0,9610
	Thermodynamic	-21,95	0,9083
	Freundlich	-2,765	0,9386

The negative values of $\Delta_{ads}G^o$ calculated by models indicate that adsorption of the LHA on the surface of the nanotubes is spontaneous. Taking into account the goodness of the fit given by the correlation coefficient (R²) in Table 2, the model that best fits the data is the Langmuir model, except to pH 2.5 100 mM NH₄Cl. Therefore, Table 3 shows the constants of the models better fitting for all the systems studied in this work.

Table 3. Langmuir constants and Freundlich constants of adsorption of LHA.

System at pH 2.5 Langmuir	K_L ($g\ mg^{-1}$)	Γ_{max} ($mg\ g^{-1}$)
pH 2.5	4902	259.3
100 mM Na_2HPO_4	3636	305.4
100 mM Na_2SO_4	8264	36.82
100 mM NaSCN	1,315 10	29.83
100 mM $BaCl_2$	$5,000 \times 10^2$	5.777
100 mM TMA	$1,204 \times 10$	8.734
System at pH 2.5 Freundlich	K_f	n
100 NH_4Cl	3.405	5.009

The largest Γ_{max} observed in the isotherm, by Langmuir model, were $305.4\ mg \cdot g^{-1}$ at pH 2.5 in the 100 mM Na_2HPO_4 . The K_L values show the high affinity of binding sites. Therefore, the system with higher affinity binding sites is LHA at pH 2.5 in the presence 100 mM $BaCl_2$.

The coefficients K_f and n represent the capacity and the intensity of adsorption, therefore to 100 mM NH_4Cl system K_f is 3.405 and n is 5.009. It is generally stated that values of n in the range 2–10 represent good, 1–2 moderately difficult, and less than 1 poor adsorption characteristics. MWCNTs is good adsorbents for LHA at pH 2.5 in the presence 100 mM NH_4Cl ($n > 2$)²³. The slope $1/n$ ranging between 0 and 1 is a measure of adsorption intensity or surface heterogeneity, becoming more heterogeneous as its value gets closer to 0²⁴. Thus, the n value (0.1996) shows a heterogeneous surface.

3.4. Microcalorimetric experiments

Free energy Gibbs is resulted of the enthalpy and entropic contribution. Therefore, to better understanding of the adsorption process is necessary to measure or calculates this energy. In order to better understand the effect of HSe on the adsorption of LHA on the surface of MWCNTs were assessed by isothermal titration calorimetry.

The adsorption of LHA onto MWCNTs is a spontaneous process, so $\Delta_{ads}G$ is negative. The change free energy Gibbs has two contributions:

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S \quad (9)$$

The values of $\Delta_{ads}H$ represent the total enthalpy energy absorbed or released when LHA is adsorbed on the surface of MWCNTs. The magnitude of $\Delta_{ads}H$ reflects the contributions of four other processes ²⁵:

- (i) association / dissociation of ions with charged groups on the surface of HA ($\Delta_{ads}H_i$);
- (ii) HA-MWCNTs interaction ($\Delta_{int}H_{HA+MWCNT}^o$);
- (iii) changes in the solvation of the adsorbent surface and HA molecules ($\Delta_{ads}H_{sol}$);
- (iv) rearrangement of the molecular structure of LHA ($\Delta_{ads}H_{conf.rear.}$)

Thus:

$$\Delta_{ads}H = \Delta_{ads}H_i + \Delta_{int}H_{HA+MWCNT}^o + \Delta_{ads}H_{sol} + \Delta_{ads}H_{conf.rear.} \quad (10)$$

The first contribution $\Delta_{ads}H_i$ is associated with interaction of ions in solution with charged groups in the molecules of LHA and MWCNTs during the adsorption process, this being an exothermic process. The second contribution, $\Delta_{int}H_{HA+MWCNT}^o$, refers to the interaction between LHA-MWCNTs. These interactions occur via hydrophobic contributions, dispersion interactions occurring with release of energy, contributing to a $\Delta_{ads}H$ exothermic. The third contribution, $\Delta_{ads}H_{sol}$, refers to the desolvation of the LHA and the nanotube surface, this process is endothermic, because for it to occur is necessary to break the interactions water-MWCNTs, MWCNTs-ion, ion-LHA and water-LHA. The fourth contribution, $\Delta_{ads}H_{conf.rear.}$, is associated with conformational change of LHA adsorption onto surfaces. The conformational change is endothermic, as occurs with the breaking of intramolecular interactions.

The energy released or absorbed as heat in a thermodynamic process can be measured by calorimetric techniques. Among those, isothermal titration microcalorimetric (ITC) has been widely used in determination of many molecular processes due its high sensitivity, with the possibility of detection of energy flows in the order of 10^{-9} J occurring in a given process.

The enthalpy change of adsorption ($\Delta_{ads}H$) versus Γ for the adsorption of LHA and of LHA on MWCNT at pH 2.5 in different systems obtained from ITC measurements at 298K are shown in Figure 3.

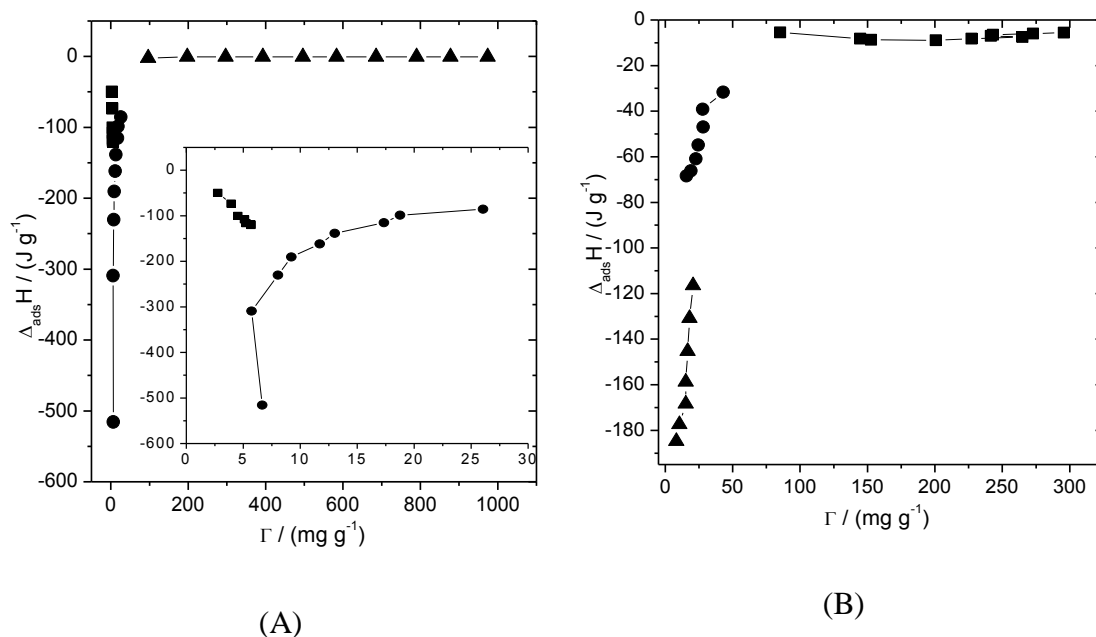


Figure 3. $\Delta_{ads}H$ of adsorption (J g^{-1}) versus Γ (mg g^{-1}) for the adsorption process of LHA onto MWCNT at pH 2.5 in presence of (A) cationic HSe: (■) 100 mM of BaCl_2 ; (●) 100 mM NH_4Cl ; (▲) 100 mM TMA; and (B) anionic HSe: (■) 100 mM of Na_2HPO_4 ; (●) 100 mM Na_2SO_4 ; (▲) 100 mM NaSCN.

The curves as a function of Γ have the same profile in the presence of NH_4Cl , Na_2SO_4 and NaSCN, but with different slopes. For these systems, $\Delta_{ads}H$ values are initially exothermic and becomes increasingly less negative. The decrease in the negative value of the enthalpy is due to the contributions of endothermic processes in accordance to equation 10: $\Delta_{ads}H_{sol}$ and $\Delta_{ads}H_{conf.rear.}$. Besides the disruption of the interactions in the process $\Delta_{ads}H_{sol}$ above, there is also the break-water interactions ion and ion-LHA

in the presence of electrolyte, adsorption to occur. These interactions are quite intense, as they are characterized by hydrogen bonds and electrostatic attractions, respectively. Furthermore, by interacting with the hydrophobic surface of MWCNTs, the LHA changes its conformation in such a way that the hydrophilic groups are exposed and free to interact with the electrolyte solution ²⁶.

To TMA and Na₂HPO₄, $\Delta_{\text{ads}}H$ values are close to zero throughout the titration, therefore the energy released is close to the energy absorbed in the adsorption of LHA onto MWCNT in the presence of this salt.

To BaCl₂, $\Delta_{\text{ads}}H$ values are initially exothermic and becomes increasingly more negative. In this case, the exothermic processes release energy greater than that absorb by the endothermic processes. Thus, the change in enthalpy becomes increasingly negative.

From the calorimetric data and models of isotherms is possible to calculate the entropic contribution to the change in Gibbs free energy. However, it is necessary to calculate the $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ obtained by the approximation of infinite dilution scheme in the extrapolation of a curve $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ (kJ mol⁻¹) as a function of the equilibrium concentration (C_e). For this, one must know LHA molar mass. Despite not having a consensus in the scientific community about the value of LHA molar mass, we use the average chemical formula suggested by researchers Schnitzer and Kunal ²⁷, C₁₈₇H₁₈₆O₈₉N₉S₂, so that we can analyze the entropic contribution. We know the limitations of the proposed formula of LHA, however, our goal is to find an approximate value and / or hypothetical of the $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$, so to allow us to analyze the entropic contribution to the adsorption of LHA on MWCNT in systems studied.

The values of $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ and $T\Delta_{\text{ads}}S$ were determined for LHA at pH 2.5 in the presence of HS salts are listed in Table 4. We used the Langmuir model because it was the best fit.

Table 4. Thermodynamic parameters of adsorption of LHA onto MWCNTs at pH 2.5 in the presence of HS salts calculated with Langmuir model.

Cationic HSe	$\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹) Lang.	$\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	R²
100 mM TMA	-28.00	-2.022	25.51	0.9946
100 mM BaCl ₂	-36.00	150.1	185.7	0.9639
100 mM NH ₄ Cl	-19.63	-2708.8	-2689.1	0.98359
Anionic HSe	$\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹) Lang.	$\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$ (kJ mol ⁻¹)	R²
100 mM Na ₂ SO ₄	-22.35	-286.9	-264.5	0.9603
100 mM NaSCN	-23.51	-758.4	-734.9	0.9230
100 mM Na ₂ HPO ₄	-20.32	-35.84	-15.52	0.9650

The correlation coefficient was greater than 0.9 for all systems studied, which shows a good fit of the models studied. $T\Delta_{\text{ads}}S$ is positive only for the adsorption of LHA on MWCNTs at pH 2.5 in the presence TMA and BaCl₂.

The entropic contribution balancing occurs by two processes. The first is the conformational change of the LHA to a more linear conformation the surface of the MWCNT and subsequent electrostatic interaction among ions in solution and the ionizable groups of the LHA²⁸. This interaction would reduce the degree of translational freedom of the species charged and therefore decrease the entropy of the system.

The second process is related to the interaction LHA-MWCNT. For the LHA interacts with the surface of MWCNT, both the LHA and the MWCNT need to release the molecules of solvation (H₂O and ions). This process releases the molecules into solution and this causes the increase of the configurational entropy of the system.

Thus, the balance of these two processes mentioned above is that because the $\Delta_{\text{ads}}S$. Thus, for cases with entropy greater than zero, this second factor prevails over so first.

Adsorption processes of LHA at pH 2.5 onto MWCNTs at system 100 mM TMA is promoted by entropy increase and enthalpy decrease; the driving force of the adsorption of LHA in presence of 100 mM BaCl₂ is entropy; and in the presence 100 mM NH₄Cl,

100 mM Na₂SO₄, 100 mM NaSCN and 100 mM Na₂HPO₄ is enthalpy. It is important to emphasize the magnitude of the value of the enthalpy of NH₄Cl, which shows high $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ release in the form of heat in the adsorption process when compared to other systems.

4. Conclusion

The effect of the influence of the HSe in the adsorption of LHA onto MWCNTs was studied. These results elucidate that the adsorption of LHA at pH 2.5 not necessarily follow the HSe.

The isotherms obtained at 298K were fitted by the Langmuir, Thermodynamic and Freudlinch models. Taking into account the quality of the fit given by the correlation coefficient (R^2), the Langmuir model was the best fit to the experimental data.

It was described for the first time the use of microcalorimetric technique to evaluate the adsorption of LHA onto MWCNTs in the presence of SH salts. Adsorption thermodynamic of LHA onto MWCNT was evaluated using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) as the main technique. The adsorption of HA on MWCNT is a spontaneous process ($\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$). $T\Delta_{\text{ads}}S$ is positive only for the adsorption of LHA on MWCNTs at pH 2.5 in the presence of TMA and BaCl₂. In the case of BaCl₂, hydrophobic interactions, which is promoted by entropy increase, is expected to be the driving force of the adsorption process. The driving force of the adsorption of LHA in the presence of anionic HSe studied is enthalpy.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian agencies CNPq, FAPEMIG, CAPES (PNPD), and to Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) for financial support.

6. References

1. Balavoine, F.; Schultz, P.; Richard, C.; Mallouh, V.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C., Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: a first step towards the development of new biosensors. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (13-14), 1912-1915.
2. Frackowiak, E.; Metenier, K.; Bertagna, V.; Beguin, F., Supercapacitor electrodes from multiwalled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2000**, *77* (15), 2421-2423.
3. Jarvis, S. P.; Uchihashi, T.; Ishida, T.; Tokumoto, H.; Nakayama, Y., Local solvation shell measurement in water using a carbon nanotube probe. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (26), 6091-6094.
4. Lee, S. M.; Lee, Y. H., Hydrogen storage in single-walled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2000**, *76* (20), 2877-2879.
5. Baughman, R. H.; Cui, C.; Zakhidov, A. A.; Iqbal, Z.; Barisci, J. N.; Spinks, G. M.; Wallace, G. G.; Mazzoldi, A.; De Rossi, D.; Rinzler, A. G.; Jaschinski, O.; Roth, S.; Kertesz, M., Carbon nanotube actuators. *Science* **1999**, *284* (5418), 1340-1344.
6. Shi Kam, N. W.; Jessop, T. C.; Wender, P. A.; Dai, H., Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (22), 6850-6851.
7. Khodakovskaya, M.; Dervishi, E.; Mahmood, M.; Xu, Y.; Li, Z.; Watanabe, F.; Biris, A. S., Carbon Nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano* **2009**, *3* (10), 3221-3227.
8. Ajayan, P.; Zhou, O., Applications of Carbon Nanotubes. Dresselhaus, M.; Dresselhaus, G.; Avouris, P., Eds. Springer Berlin / Heidelberg: 2001; Vol. 80, pp 391-425.
9. O'Connell, M. J.; Boul, P.; Ericson, L. M.; Huffman, C.; Wang, Y.; Haroz, E.; Kuper, C.; Tour, J.; Ausman, K. D.; Smalley, R. E., Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chemical Physics Letters* **2001**, *342* (3-4), 265-271.
10. (a) Gamboa, C.; Olea, A. F., Association of cationic surfactants to humic acid: Effect on the surface activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *278* (1-3), 241-245; (b) Koopal, L. K.; Goloub, T. P.; Davis, T. A., Binding of ionic surfactants to purified humic acid. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *275* (2), 360-367.
11. Vergütz, L., Studying the soil compartment of the global carbon cycle [tese de doutorado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2011.
12. Matsuura, K.; Saito, T.; Okazaki, T.; Ohshima, S.; Yumura, M.; Iijima, S., Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions. *Chemical Physics Letters* **2006**, *429* (4-6), 497-502.
13. McCall, M. J., Environmental, health and safety issues: nanoparticles in the real world. *Nature Nanotechnology* **2011**, *6* (10), 613-614.
14. Kelleher, B. P.; Simpson, A. J., Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (15), 4605-4611.
15. Vrbka, L.; Lund, M.; Kalcher, I.; Dzubiella, J.; Netz, R. R.; Kunz, W., Ion-specific thermodynamics of multicomponent electrolytes: a hybrid HNC/MD approach. *Journal of Chemical Physics* **2009**, *131* (15).

16. Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W., 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9* (1–2), 19-37.
17. Dill, K. A.; Truskett, T. M.; Vlachy, V.; Hribar-Lee, B., Modeling water, the hydrophobic effect, and ion solvation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2005**, *34*, 173-199.
18. Kunz, W., Specific ion effects in colloidal and biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15* (1–2), 34-39.
19. Vlachy, V.; Hribar-Lee, B.; Kalyuzhnyi, Y. V.; Dill, K. A., Short-range interactions: from simple ions to polyelectrolyte solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, *9* (1–2), 128-132.
20. Shipovskov, S.; Gunaratne, H. Q. N.; Seddon, K. R.; Stephens, G., Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chemistry* **2008**, *10* (7), 806-810.
21. Giles, C. H.; Smith, D.; Huitson, A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *47* (3), 755-765.
22. Giles, C. H.; D'Silva, A. P.; Easton, I. A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm part. II. Experimental interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *47* (3), 766-778.
23. Yao, Y.; Xu, F.; Chen, M.; Xu, Z.; Zhu, Z., Adsorption behavior of methylene blue on carbon nanotubes. *Bioresource Technology* **2010**, *101* (9), 3040-3046.
24. Haghseresht, F.; Lu, G. Q., Adsorption Characteristics of Phenolic Compounds onto Coal-Reject-Derived Adsorbents. *Energy & Fuels* **1998**, *12* (6), 1100-1107.
25. Norde, W.; Lyklema, J., Thermodynamics of protein adsorption. Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1979**, *71* (2), 350-366.
26. Lin, D.; Tian, X.; Li, T.; Zhang, Z.; He, X.; Xing, B., Surface-bound humic acid increased Pb²⁺ sorption on carbon nanotubes. *Environmental Pollution* **2012**, *167* (0), 138-147.
27. Ghosh, K.; Schnitzer, M., Macromolecular Structures of Humic Substances. *Soil Science* **1980**, *129* (5), 266-276.
28. Schmitt, P.; Freitag, D.; Trapp, I.; Garrison, A. W.; Schiavon, M.; Kettrup, A., Binding of s-triazines to dissolved humic substances: Electrophoretic approaches using Affinity Capillary Electrophoresis (ACE) and Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC). *Chemosphere* **1997**, *35* (1–2), 55-75.

CAPÍTULO 3: Thermodynamic assessment of the adsorption of humic acid on clay minerals

Igor José Boggione Santos¹, Leonardus Vergutz^{1,2}, Luis Henrique Mendes da Silva^{1*}
and Maria do Carmo Hespanhol da Silva¹

¹ Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

² Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

* *Corresponding author.* Fax: +55 31 3899 3065. E-mail address: luhen@ufv.br (L. H. M. da Silva)

Abstract

In this work we studied the adsorption behavior of Pahokee Peat humic acid (PPHA) on kaolinite, illite, mica, montmorillonite, hematite, goethite and gibbsite. In order to understand the mechanism of the adsorption and to gather more information regarding HA's structure we conducted the adsorptions at various pH and increasing ionic strength. The adsorption mechanism depends on the nature of surface, the concentration of the polyelectrolyte and on pH. Thermodynamic parameters were determined using three models: Langmuir, Freundlich, and the thermodynamic model of infinite dilution. Taking into account the goodness of fit, the Langmuir model fitted the best to the experimental data, except for montmorillonite at pH 4.0 and 6.0. The thermodynamic analysis, based on calorimetric titrations, showed that HA adsorption onto clay minerals occurs spontaneously ($\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$). Adsorption process of PPHA at pH 4.0 on gibbsite in presence 100 mM NaCl and hematite in presence of 1 mM NaCl, are both entropically and enthalpically favored. On the other hand, the adsorption of PPHA on kaolinite at pH 4.0 at any ionic strength and in all concentration salt, gibbsite at pH 4.0 and in presence of 1 and 10 mM NaCl, mica and goethite in presence of 10 mM and hematite in presence of 10 and 100 mM NaCl is just entropically driven.

Keywords: adsorption, humic acid, isothermal titration calorimetry, clays minerals, thermodynamics.

1. Introduction

Natural organic matter (NOM) is present throughout the ecosystem^{1,2}, and Humic substances (HS) and clay minerals are the important components of soils and sediments. Clay minerals are commonly coated with NOM as organic–clay complexes in the soil and sedimentary environments^{3,4} and HS are one of the most abundant organic compounds in the Earth, found in nearly all soils, sediments, and natural waters. HS can be divided in three types with humic acids (HA) being a major component of HS and considered to be one of the most recalcitrant fractions of it.

Interactions between HS and clay minerals are expected to modify surface properties and reactivity of clay minerals^{5,6}, changing the mobility of pollutants bound to them^{7,8}. Furthermore, HS are amphiphile molecules that behave like weak-acid polyelectrolytes and display the ability to associate with different molecules by electrostatic and/or hydrophobic interactions^{9,10}, with a capacity of changing the character of its interactions (from electrostatic to hydrophobic) depending on the characteristics of the solution¹⁰. Therefore, they play a key role in many, if not most, chemical and physical properties in their environment.

Therefore, understanding the interactions between HS and clay minerals is the basis not only for understanding the interfacial properties of soils and sediments, but also for elucidating behaviors of contaminants in the natural environments^{11,12}. Although there have been many studies to characterize the interactions between NOM and clay minerals, it is still difficult to reach a consensus on the adsorption behaviors and mechanisms of NOM on minerals.

The favorable sorption mechanism of HA to mineral surface is determined by the mineral surface properties as well as the nature of the HA molecules. Minerals with differences in surface properties, e.g., aluminosilicates and oxides, sorb different functional moieties of source humic acid, leading to fractionation of the HA¹³.

Spechtet *et al.* observed preferential sorption of high molecular weight hydrophobic fraction on kaolinite and montmorillonite surfaces ¹³. Sorption of hydrophobic fraction of NOM on kaolinite might be an entropically driven process because hydrophobic fractions gain favorable entropy while sorbed on the mineral phase instead of remaining in solution ¹⁴. Similar conclusion was drawn by Baham and Sposito, while studying the adsorption of NOM on kaolinite and montmorillonite surfaces ¹⁵. On the other hand, sorption of NOM on iron and aluminum oxide minerals mostly occurs by surface complexation and ligand exchange reaction between carboxylic groups of NOM and the oxide minerals ¹⁶. The chemical and mineralogical control over HA sorption to clay mineral surfaces have been studied recently ¹⁷ using kaolinite and montmorillonite as common clay particles in soil under different conditions of pH, ionic strength and solution cations (Na^+ and Ca^{2+}). Clay mineral-HA composites, building up mainly through Ca^{2+} bonding to the $-\text{COOH}$ groups of HA, can bind and release metals selectively in the aqueous soil environment ¹⁸.

The sorption of soil organic matter (SOM) can alter many physicochemical properties of minerals ^{19,8}, including the rate and extent of dissolution ^{20,21} and the physical stability of colloidal-sized particles ^{22,23}. Therefore, the sorption mechanisms of SOM by minerals are very diverse, including electrostatic interaction, ligand exchange-surface complexation, and entropy-driven hydrophobic interaction ²⁴.

SOM sorption on minerals plays important roles in the detoxification of hazardous compounds and in the transport and binding of organic and inorganic contaminants ⁸. Moreover, sorption by clay minerals can protect SOM against biodegradation, hence affecting biogeochemical carbon cycling and carbon sequestration processes ^{25,26}. In order to evaluate and comprehend the interactions between clay minerals and HS we performed the thermodynamic study of the interaction between HA and clay minerals in aqueous solution. We believe that understanding the thermodynamic pattern of the HA-clay

minerals interaction is of great importance to improve the applications of composites with technological purposes and to investigate the physical stability of colloidal-sized particles and, therefore, improve our understanding on biogeochemical carbon cycling and carbon sequestration processes. We evaluated the HA-clay minerals interaction through adsorption isotherm experiments as well as direct measurement of enthalpy changes in the adsorption process by isothermal titration calorimetry. We also assessed the influence of pH and increasing concentrations of NaCl in the binding process of HA to clay minerals. The specific objectives of this study were: (i) evaluate the thermodynamic nature of HA-clay minerals interaction, (ii) evaluate the influence of ionic strength on this interaction, and (iii) determine the thermodynamic pattern of this interaction.

2. Experimental

2.1. Materials

The aluminosilicates kaolinite, montmorillonite and illite were purchased from Ward's Science, USA, while muscovite mica was actually mined and grinded from nearby place of occurrence. The oxides hematite and goethite were purchased from Sigma-Aldrich, USA, while gibbsite was produced following the protocol by Borggaard *et al.*²⁷. All reagents were used in the experiments without further purification. NaCl was purchased from Isifar, Brazil, (99 % purity) and used as received. Standard Pahokee Peat humic acids (PPHA) was purchased from the International Humic Substances Society (IHSS) and used as received.

2.2 Specific surface area (S_{BET}) determinations

The surface area of the areas was calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) using the ASAP 2020V device (Accelerated Surface Area and Porosimetry) Micromeritics Instrument Corporation manufacturer and the software for data acquisition and processing was used ASAP 2020 V. 3:03. The surface areas were determined using

the standard single-point method. Samples were analysed in triplicate. Table 1 shows the results.

Table 1. Properties of clay minerals and oxides.

	N ₂ -BET total pore volume (cm ³ /g)	N ₂ -BET surface area (m ² /g)
Gibbsite	0.290	104
Illite	0.105	30
Hematite	0.021	7
Kaolinite	0.161	33
Montmorillonite	0.098	15
Mica	0.028	7
Goethite	0.155	65

2.3. Adsorption experiments

Adsorption isotherm experiments of PPHA binding onto clay minerals were performed at 25 °C. In these experiments 10 mL of solutions containing PPHA (PPHA's concentration ranging from 0.0025 to 0.05 mg mL⁻¹) were left to react with 20 mg of oxides and 200 mg caly for 24 h in capped tubes under stirring at 120 rpm. After this time, the tubes were centrifuged and the equilibrium solution (supernatant) was sampled for the determination of PPHA's concentration by light absorbance at a UV/Vis spectrometer at wavelength 204 nm. These experiments were carried out in pure ionized water at pH 4.0 and 6.0, adjusted with H₂SO₄, because this pH were the best pH for the adsorption was found (maximum PPHA adsorption into clay minerals). We evaluated the effect of increasing ionic strength (1, 10 and 100 mmol L⁻¹).

For each point of these isotherms, the adsorbed amount of PPHA into clay minerals was directly calculated from differences between the initial PPHA concentration and the concentration of HA at the equilibrium after the 24 h reaction, as follow:

$$\Gamma = \left(\frac{C_i - C_e}{m A} \right) V \quad (1)$$

where Γ is the adsorbed amount of PPHA onto clay minerals (mg m⁻²) at the equilibrium (24 h); C_i is the initial PPHA concentration (mg mL⁻¹); C_e is the PPHA concentration at

the equilibrium (mg mL^{-1}); V is the total solution volume (mL); m is the mass of clay mineral (g) and A is the area of clay mineral (m^2).

3. Results and Discussion

3.1. Adsorption isotherms

3.1.1. Effects of pH

The sorption isotherm of PPHA by clays minerals was strongly pH-dependent.

Figure 1 shows the adsorption of PPHA on clay minerals at different pH.

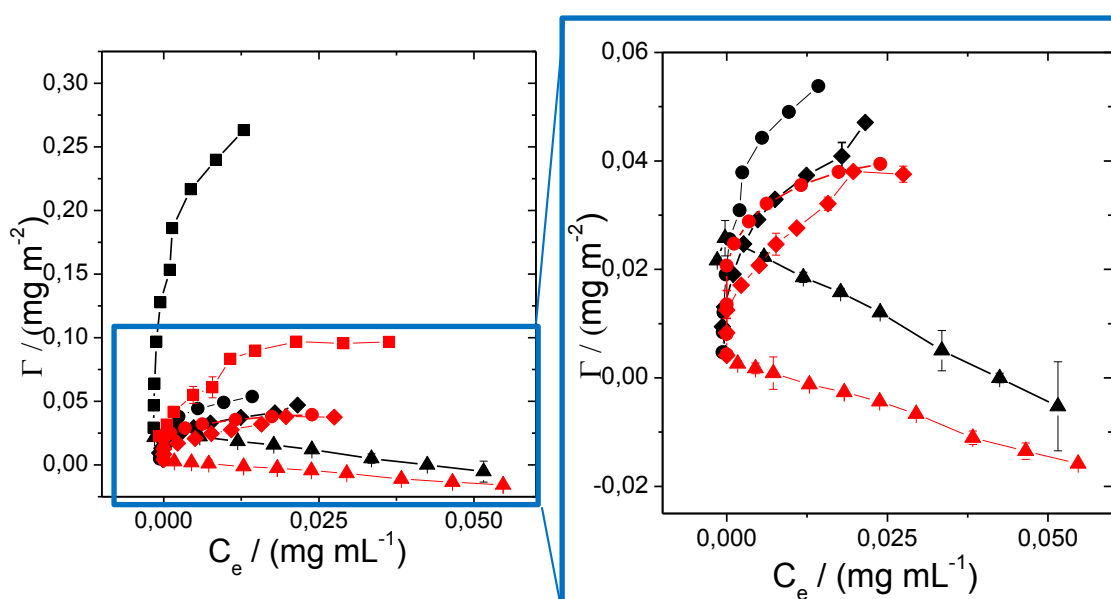


Figure 1. Adsorption isotherms of PPHA at pH 4.0 (black symbol) and pH 6.0 (red symbol) at different clay minerals: (■) Mica; (◆) Illite; (▲) Montmorillonite; (●) Kaolinite.

Figure 2 shows the adsorption of PPHA on oxides at different pH.

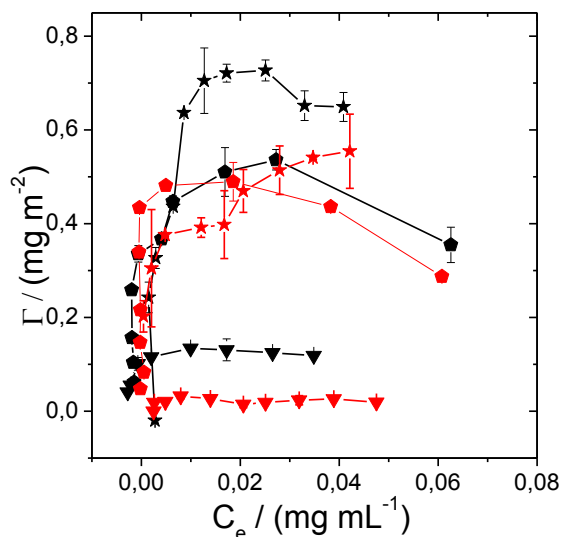


Figure 2. Adsorption isotherms of PPHA at pH 4.0 (black symbol) and pH 6.0 (red symbol) at different oxides: (★) Hematite; (●) Gibbsite; (▼) Goethite.

At low PPHA equilibrium concentration (C_e) there is an increase in Γ with the increase on PPHA concentration. The affinity between adsorbate-adsorbent is analyzed by initial slope of the isotherms. Therefore, the HA-surface interaction more intense, by analyzing the slope of the curve, in order of increasing affinity was montmorinollite, goethite, illite, kaolinite, mica, hematite and gibbsite. Moreover, for all clay minerals, pH 4.0 showed a greater affinity between the HA-surface. The sorption isotherm of PPHA by oxides and clays showed a steep initial slope at low concentrations and then reached a plateau as equilibrium PPHA concentration increased, with implies a affinity of binding sites for PPHA, except for montmorinollite that hardly adsorbed the PPHA the conditions studied.

The sorption increased with decreasing pH, which has been commonly observed for SOM on clays minerals^{19,28,24}. The dependence of adsorption on pH values can be explained by two mechanisms: pH of the solution affects the surface charge of clays minerals and the ionization of HA²⁹. The higher the pH, the greater will be the dissociation of the functional groups. The net effect will result in an increase in negative charges on HA³⁰. Therefore, the electrostatic repulsion between the negative charges on

surfaces and HA repels the HA from the surface and the increase of negative charge densities on both the adsorbent and adsorbate with increasing pH results in the decrease in adsorption. However, at lower pH values, carboxylic groups on the HA are protonated, minimizing the intramolecular electrostatic repulsion and contracting the HA molecules. HA may exist in a spherical structure at lower pH but exist in a rather linear or stretched structure at higher pH³¹. Decrease of the molecular volume can facilitate the adsorption process due to greater availability of pores where humic acid molecules can penetrate³².

The sorption mechanisms between HA and clay surfaces can involve different forces depending on the nature of the surface, of the exchangeable cation and pH values³³. Murphy et al, state that ligand exchange reactions is a key mechanism in PPHA sorption to clays surfaces^{34,17}. Hydrophobic interactions between mineral surfaces and the protonated hydrophilic groups of PPHA is another possible sorption mechanism. However, Arnarson and Keil state that this entropy-driven process might not be of major importance in exothermic adsorption processes. Consequently, pH dependence could be attributed to ligand exchange alone with little or no contribution from hydrophobic interactions³⁵.

Moreover, the distinct differences in structures of the clays minerals resulted in the different adsorption capacities of PPHA on them. The results show that most adsorption occurs on oxides. Oxide surfaces are amphoteric and for both Fe and Al oxides the point of zero charge (PZC) - the pH at which the surface has a net charge of zero - is between about pH 7 and pH 9^{36,33,31}. Thus, at pH studied (4.0 and 6.0) of net surface charge is positive. The same occurs with the clays. However, also in clays have isomorphic charge (charge structural) that are negative independently on the pH^{37,17,38,39}. Thus, the larger PPHA adsorption oxides is due to the greater amount of positive charge present in its structure than in clays. As the PPHA present, in this pH studied, net negative charge, the interaction occurs mainly via electrostatic interaction.

However, it was expected that the range of pH 4.0 to pH 6.0 greatest variation occurred in the adsorption isotherm of oxides, since all of its surface charge are pH dependent. However, there is a greater variation in the isotherms of the clays. This fact can be explained that the range of pH 4.0 to pH 6.0 greatly decreases the PPHA adsorption by the aluminosilicates there is a larger variation in the surface charge pH dependent, *i.e.*, many ionizable groups are deprotonated, thus reducing the contribution of interactions for electrostatic adsorption of PPHA. To prove this hypothesis it was necessary measures zeta potential, which was not done.

3.1.2. Effects of ionic strength

Effect of ionic strength on the adsorption of HA on clays minerals was evaluated in the presence of salt NaCl (1, 10 and 100 mM). The adsorption isotherms of the PPHA on clays are shown in Figure 3, where the amount of adsorbed PPHA (mg) per m² of surface area is plotted against the equilibrium concentration of the respective PPHA (mg mL⁻¹).

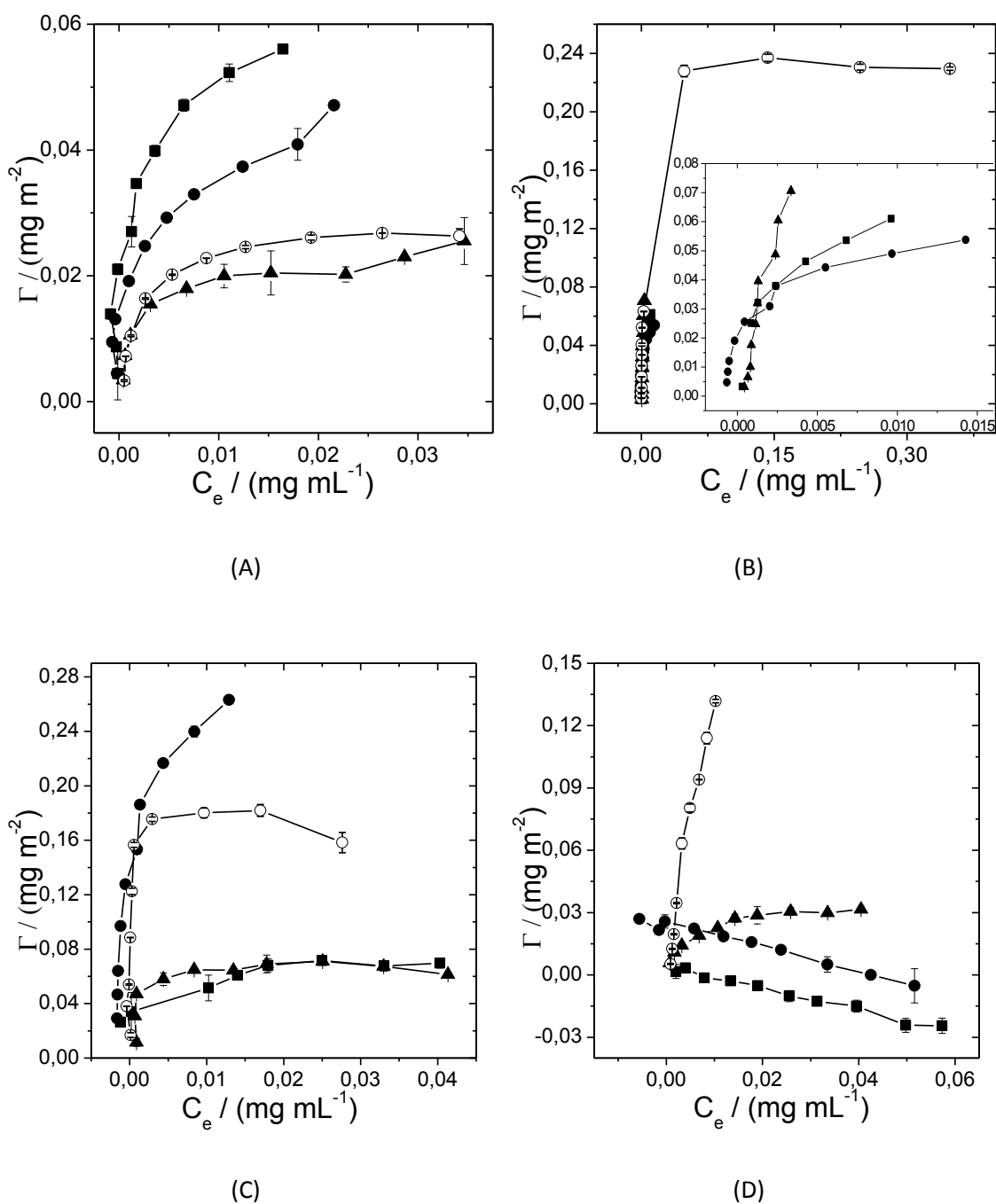


Figure 3. Adsorption isotherms of PPHA on clay at pH 4.0 at different systems – (A) Illite, (B) Kaolinite, (C) Mica and (D) Montmorillonite – (●) 0 mM NaCl; (■) 1 mM NaCl; (▲) 10 mM NaCl; (○) 100 mM NaCl.

The adsorption isotherms of the PPHA on oxides are shown in Figure 4, where the amount of adsorbed PPHA (mg) per m² of surface area is plotted against the equilibrium concentration of the respective PPHA (mg mL⁻¹).

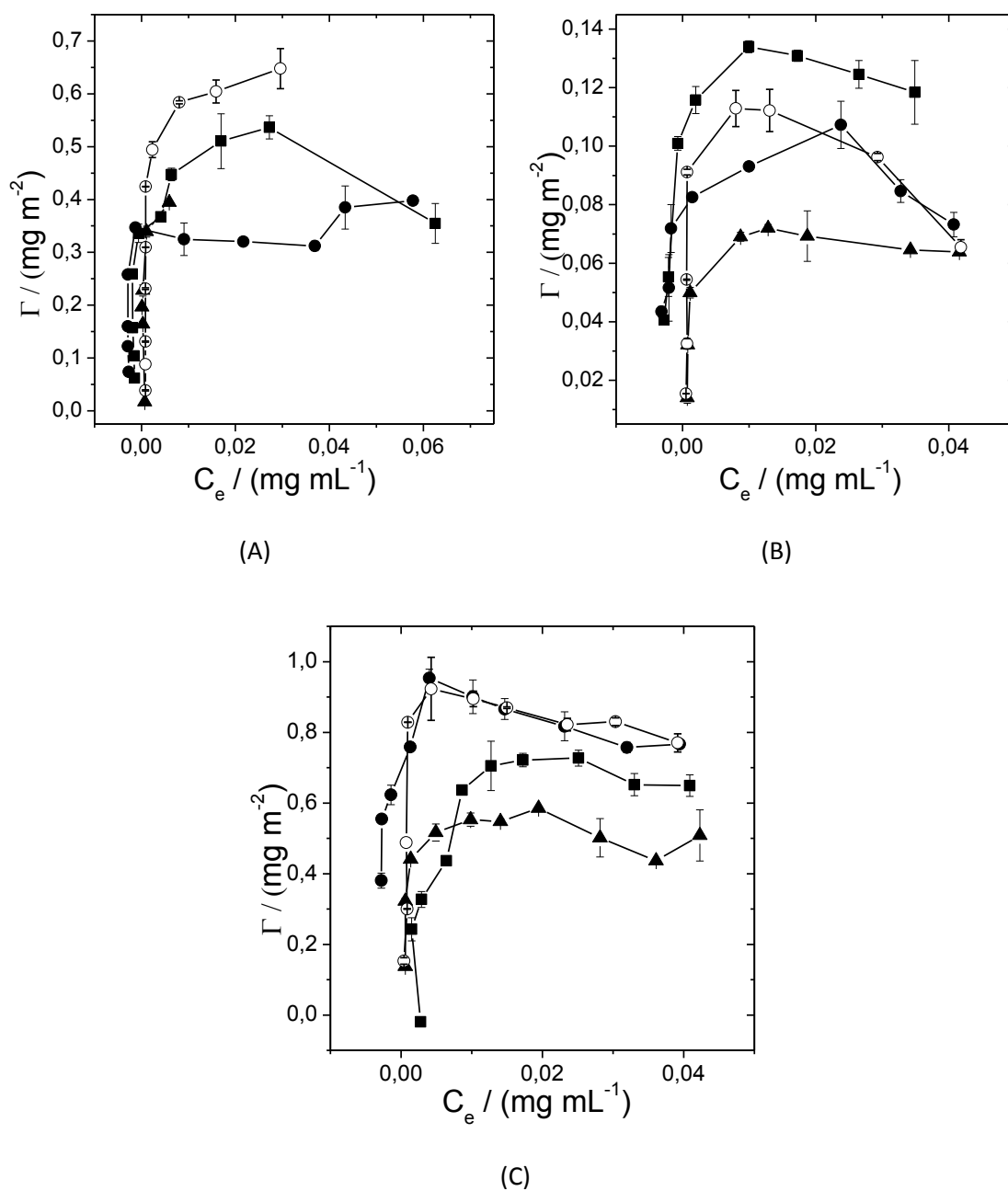


Figure 4. Adsorption isotherms of PPHA on clay at pH 4.0 at different systems – (A) Gibbsite, (B) Goethite and (C) Hematite – (●) 0 mM NaCl; (■) 1 mM NaCl; (▲) 10 mM NaCl; (○) 100 mM NaCl.

The results show that the presence of electrolytes affects the adsorption behavior of PPHA on clays minerals and presented coefficient of variation less than 10%. The isotherms are non-linear and of the same type, except for montmorinollite. They are characterized by an increase in the amount of adsorbed PPHA with increasing equilibrium concentrations, followed by a tendency for the formation of a plateau at higher

concentrations, which represents the maximum adsorption capacity (Table 2), except for montmorinollite.

Table 2. Maximum adsorption capacity of PPHA on clays minerals at different pH.

System	Γ_{\max} of PPHA/ (mg m ⁻²)				
	pH 4.0	pH 6.0	pH 4.0 1 mM NaCl	pH 4.0 10 mM NaCl	pH 4.0 100 mM NaCl
Kaolinite	0.05377	0.03944	0.06104	0.07060	0.2370
Mica	0.2632	0.09683	0.07156	0.07107	0.1819
Montmorinollite	0.02692	0.002630	0.003380	0.03155	0.1318
Illite	0.04710	0.03805	0.05604	0.02552	0.02678
Goethite	0.1340	0.03212	0.09305	0.07197	0.1129
Hematite	0.7271	0.5547	0.9532	0.5851	0.9231
Gibbsite	0.5366	0.4896	0.3978	0.3945	0.6477

Antelo *et al.* and others researchers observed that an increase in adsorption is produced by the ionic strength increase, when the driving force of adsorption is the electrostatic interaction ^{40,41}. However, the only system that followed this order was kaolinite. Other systems sometimes decreased or increased adsorption, depending on the concentration of the salt.

The ionic strength influences Γ can be explained by several mechanisms ²⁹. The first is associated with the adsorption of ions in the interface HA adsorbed/solution. In this process, adsorption increased with increasing salt concentration due to interaction via electrostatic force between the ions and ionized HA groups present at the HA adsorbed/solution interface. This allows the reduction of electrostatic repulsion between the segments of adsorbed HA, so to allow a greater number of HA molecules to adsorb. According to Jones and O'Melia ⁴² this effect of the ionic strength is mainly given by changes in lateral electrostatic repulsion among adsorbed humic acid molecules.

However, according to results of Weng *et al.* ⁷, the effect of changing the ionic strength is more complicated and involves not only electrostatics but also changes in the degree of protonation of the humic acid upon adsorption, mainly due to changes in the decay of the electric potential across the interface. Thus, the second contribution is

associated with the variation in the ionic strength could induce conformational changes in humic acid molecules that may affect the adsorption process⁴⁰. Ions of the electrolyte exert an effect on the repulsion between the negative charges of the ionized groups of PPHA, which at high ionic strength facilitates coiling or shrinking of the molecules, whereas at low ionic strength produces a more expanded structure⁴³. In the latter conformation the molecules of PPHA may occupy a larger area of the clay minerals surface, so that there will be a decrease in the adsorption.

The third contribution is associated with the shielding effect of the electrolytes on the electrical double layer. This shielding effect reduces the contribution of the electrochemical potential of the adsorbing molecules/ions, thus reducing the adsorptive process and the amount of PPHA adsorbed, mainly if driving force of adsorption is electrostatic interaction.

Therefore, the influence of ionic strength on adsorption of PPHA on clay minerals will be the final balance of these three processes. Analyzing the behavior of PPHA adsorption on clay minerals at different ionic strengths and knowing these adsorption mechanisms can infer which process prevails as the driving force if the adsorption increase or decrease with ionic strengths. In the case of kaolinite and montmorillonite (except in the presence of 1 mM NaCl), the first and second processes are that predominate. In other adsorbents, the salt concentration will favor one of the processes and this will cause each system behaves differently. For example, the adsorption of PPHA on hematite at pH 4 0 mM of NaCl is less than in presence of the 1 and 100 mM NaCl, but higher than in the presence of 10 mM NaCl. That is, in the presence of 1 and 100 mM NaCl, the first and second processes prevail as driving force for adsorption. In the presence of 10 mM NaCl shield is more favored than the first two cases cited above.

No controversy seems to exist regarding the relationship between the formation of soil aggregates and the nature of their organo-mineral complexes. The major colloids

present in soils are the aluminosilicate clay minerals. Oxides and organic matter are also considered as stabilizing materials in aggregates. Besides, it is known that modern intensive agriculture leads to the degradation of soil structure⁴⁴. Nevertheless, so far no existing model takes into account the differences between the clay minerals soil for carbon sequestration in soils.

The results show the difference in adsorption of PPHA between the clay minerals. Hematite presented the highest adsorption between all surfaces studied and the aluminosilicate with the highest adsorption was the kaolinite.

It is known that in warmer climates there is a predominance of aluminosilicates, which gives a high pH soil. Already soils of tropical climate are mostly weathered and consist mainly of kaolinite and oxides of Fe and Al, with acidic pH around 4 - 4.5. However, for tropical soils are productive, the pH of these soils must be raised by the practice of liming. The pH of agricultural soils, therefore, must be between 5.5 and 7.0^{45,46}. Therefore, the present results may help elucidate a better method for handling the soil in such a way to stabilize the SOM, and thus contribute to the global carbon cycle. In addition, this investigation opens the door for further studies that extend the analysis to a more complex system, such as the soil.

3.2. Thermodynamic properties

Thermodynamic parameters of adsorption were determined for a better understanding of the adsorption mechanisms of HA onto clay minerals. Langmuir and Freundlich equations are the most commonly applied models for representing the nonlinear adsorption of organic chemicals, such as phenolic compounds, to activated carbon, charcoal, and carbon nanotubes^{47,48}. Furthermore, were used to adjust the thermodynamic model of treatment for dilute solutions.

The Langmuir isotherm can be derived by assuming an ideal system, where the adsorbent molecules adsorb at the adsorbate surface at well-defined sites forming a

homogeneous monolayer, each site adsorb only one molecule, and the energy involved in the adsorption of one adsorbent molecule is the same for all sites in the adsorbate surface and it is independent of the presence or not of others molecules in the adjacent sites, that is, there is no interaction between adjacent adsorbent molecules. Equation 1 represents the mathematical expression for the Langmuir model:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (1)$$

where C_e is the equilibrium HA concentration (mg mL^{-1}), Γ is the amount of HA adsorbed (mg m^{-2}), K_L is a Langmuir constant that relates to the affinity of binding sites, and Γ_{\max} (mg m^{-2}) is a Langmuir constant related to the maximum monolayer adsorption capacity, which describes a saturated monolayer of solute molecules on the adsorbent surface ⁴⁹.

The Freundlich model is an empirical equation that assumes heterogeneous adsorption due to the diversity of adsorption sites. The Freundlich equation is:

$$\Gamma = K_F C_e^{1/n} \quad (2)$$

where C_e and Γ were described previously, K_F ($\text{mg}^{(1-1/n)}\text{mL}^{(1/n)}\text{m}^{-2}$) and n are the Freundlich constants, which represent the adsorption capacity and the adsorption strength, respectively ⁴⁹.

The Langmuir and Freundlich equations can be fitted to data by linear regressions using their linearized forms as follows:

$$\frac{C_e}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_{\max}} C_e + \frac{1}{K_L \Gamma_{\max}} \quad (3)$$

$$\ln \Gamma = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (4)$$

where plots of $\frac{C_e}{\Gamma}$ versus C_e and $\ln\Gamma$ versus $\ln C_e$ allow to calculate the Langmuir and Freundlich constants, respectively.

Apart from these two models, a thermodynamic treatment also allows the determination of the $\Delta_{ads}G^0$. As it is well established, in the equilibrium chemical potential of HA in bulk solution μ_P^S is equal to the chemical potential of HA in the solution/clay mineral interface μ_P^I .

$$\mu_P^I = \mu_P^S \quad (5)$$

Replacing μ_{HA} by $\mu_{HA}^0 + RT\ln a$:

$$\mu_{HA}^{oS} + RT\ln a_{HA}^S = \mu_{HA}^{oI} + RT\ln a_{HA}^I \quad (6)$$

Rearranging:

$$\ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} = \frac{-\mu_{HA}^{oI} - \mu_{HA}^{oS}}{RT} \quad (7)$$

And $-\mu_{HA}^{oI} - \mu_{HA}^{oS} = -\Delta_{ads}G^0$, then:

$$\ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} = \frac{-\Delta_{ads}G^0}{RT} \quad (8)$$

$$-\Delta_{ads}G^0 = RT\ln \frac{a_{HA}^I}{a_{HA}^S} \quad (9)$$

Considering $a_{HA}^I \cong C_{HA}$ the thermodynamic state of infinite dilution, the expression for the calculation of $\Delta_{ads}G^0$ is:

$$\Delta_{ads}G^0 = -RT\ln \frac{\Gamma_{ads}}{C_e} \quad (10)$$

The thermodynamic parameter $\Delta_{ads}G^0$ is the Gibbs free energy change of the system when one mole of molecules in the infinite dilution scheme is adsorbed on the

surface of the nanotube, assuming that the amount of HA already adsorbed is almost zero. The value of $\Delta_{ads}G^o$ is the result of four contributions: (i) change in desolvation energy associated with the surface of the nanotube and HA ($\Delta_{des}G_{clay}^o + \Delta_{des}G_{HA}^o$), (ii) Gibbs free energy change of HA-clay minerals interaction ($\Delta_{int}G_{p+clay}^o$), (iii) Gibbs free energy change due to the HA conformational change ($\Delta_{conf}G_{HA}^o$), and (iv) Gibbs free energy change associated with ion exchange (i) the interface between (S) HA adsorbed/solution ($\Delta_{ads}G_{S-i}^o$). $\Delta_{ads}G^o$ can be calculated as the sum of all these contributions according to equation 11.

$$\Delta_{ads}G^o = \Delta_{des}G_{clay}^o + \Delta_{des}G_{HA}^o + \Delta_{int}G_{HA+clay}^o + \Delta_{conf}G_{HA}^o + \Delta_{ads}G_{S-i}^o \quad (11)$$

The values of $\Delta_{ads}G^o$ were determined by these three models from the data obtained experimentally by adsorption isotherms of HA on clay minerals (in annex), but are listed in Table 3 only the model that best fit the isotherms.

Table 3. Thermodynamic parameters of adsorption of PPHA onto clay minerals at different systems.

PPHA	Model	$\Delta G/(kJ mol^{-1})$	R^2	$K_L/(m^2 mg^{-1})$
pH 4.0, Illite	Langmuir	-7.586	0.9930	21.33
pH 4.0, Kaolinite	Langmuir	-9.414	0.9925	45.46
pH 4.0, Mica	Langmuir	-14.23	0.9963	311.5
pH 4.0, Montmorillonite	Thermodynamic	-10.87	0.9731	-
pH 4.0, Gibbsite	Langmuir	-13.87	0.9996	269.6
pH 4.0, Hematite	Langmuir	-13.75	0.9962	256.6
pH 4.0, Goethite	Langmuir	-28.30	0.9985	9,090 10
pH 6.0, Illite	Langmuir	-5.263	0.9867	8.357
pH 6.0, Kaolinite	Langmuir	-11.01	0.9951	84.90
pH 6.0, Mica	Langmuir	-9.348	0.9953	43.44
pH 6.0, Montmorillonite	Thermodynamic	-4.138	0.9982	-
pH 6.0, Gibbsite	Langmuir	-24.40	0.9936	139.5
pH 6.0, Hematite	Langmuir	-12.24	0.9947	1,886 10
pH 6.0, Goethite	Langmuir	-22.83	0.9894	15.73
pH 4.0, Illite, 1 mM NaCl	Langmuir	-8.922	0.9981	36.58
pH 4.0, Kaolinite, 1 mM NaCl	Langmuir	-9.096	0.9902	39.24
pH 4.0, Mica, 1 mM NaCl	Langmuir	-7.646	0.9881	21.86
pH 4.0, Mont., 1 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9965	1000
pH 4.0, Illite, 10 mM NaCl	Langmuir	-5.713	0.9845	10.02
pH 4.0, Kao., 10 mM NaCl	Langmuir	-9,279	0.9992	42.25

pH 4.0, Mica, 10 mM NaCl	Langmuir	-10.73	0.9846	76.08
pH 4.0, Mont., 10 mM NaCl	Langmuir	-5.063	0.9961	7.712
pH 4.0, Illite, 100 mM NaCl	Langmuir	-6.200	0.9971	12.20
pH 4.0, Kao., 100 mM NaCl	Langmuir	-10.93	0.9995	82.44
pH 4.0, Mica, 100 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9916	435.9
pH 4.0, Mont., 100 mM NaCl	Langmuir	-7,927	0.9745	24.48
pH 4.0, Gibbsite, 1 mM NaCl	Langmuir	-15.38	0.9914	495.7
pH 4.0, Hematite, 1 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9970	9615
pH 4.0, Goethite, 1 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9779	983.2
pH 4.0, Gibbsite, 10 mM NaCl	Langmuir	-18.36	0.9981	1647
pH 4.0, Hem., 10 mM NaCl	Langmuir	-19.45	0.9998	2557
pH 4.0, Goethite, 10 mM NaCl	Langmuir	-12.30	0.9938	143.0
pH 4.0, Gibb., 100 mM NaCl	Langmuir	-16.02	0.9998	641.0
pH 4.0, Hem., 100 mM NaCl	Langmuir	-20.32	0.9933	3636
pH 4.0, Goe., 100 mM NaCl	Langmuir	-12.27	0.9820	141.6

The negative values of $\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ calculated by models indicate that adsorption of the HA on the surface of the clay minerals is spontaneous. Taking into account the goodness of the fit given by the correlation coefficient ($R^2 > 0.9$) in Tables 2, the model that best fits the data is the Langmuir model, except to montmorillonite at pH 4.0 and pH 6.0. For these two systems, the model that best fits the data is the Thermodynamic model. Differences in $\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ for PPHA adsorption in systems different show that the process depends on the nature of the surface. The system with the lowest Gibbs free energy of adsorption was goethite at pH 4.0 with $-28.30 \text{ kJ mol}^{-1}$ and K_L equal $9,090 \text{ 10 m}^2 \text{ mg}^{-1}$. Moreover, the system showed the highest value of $\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ was montmorillonite at pH 4.0 in the presence of 10 mM NaCl with $-5.063 \text{ kJ mol}^{-1}$ and K_L equal $7.712 \text{ m}^2 \text{ mg}^{-1}$. The K_L values show the high affinity of binding sites.

3.3. Microcalorimetric experiments

Free energy Gibbs is resulted of the enthalpy and entropic contribution. Therefore, to better understanding of the adsorption process is necessary to measure or calculates this energy. We measured the enthalpy by isothermal titration calorimetry (ITC).

The adsorption of HA onto clay minerals is a spontaneous process, so $\Delta_{\text{ads}}G$ is negative. The change free energy Gibbs has two contributions:

$$\Delta_{\text{ads}}G = \Delta_{\text{ads}}H - T\Delta_{\text{ads}}S \quad (9)$$

The values of $\Delta_{\text{ads}}H$ represent the total enthalpy energy absorbed or released when LHA is adsorbed on the surface of clay minerals. The magnitude of $\Delta_{\text{ads}}H$ reflects the contributions of four other processes ⁵⁰:

- (i) association / dissociation of ions with charged groups on the surface of HA ($\Delta_{\text{ads}}H_i$);
- (ii) HA-clay minerals interaction ($\Delta_{\text{int}}H_{\text{HA+clay}}^0$);
- (iii) changes in the solvation of the adsorbent surface and HA molecules ($\Delta_{\text{ads}}H_{\text{sol}}$);
- (iv) rearrangement of the molecular structure of HA ($\Delta_{\text{ads}}H_{\text{conf.rear.}}$)

Thus:

$$\Delta_{\text{ads}}H = \Delta_{\text{ads}}H_i + \Delta_{\text{int}}H_{\text{HA+clay}}^0 + \Delta_{\text{ads}}H_{\text{sol}} + \Delta_{\text{ads}}H_{\text{conf.rear.}} \quad (10)$$

The first contribution, $\Delta_{\text{ads}}H_i$ is associated with interaction of ions in solution with charged groups in the molecules of HA and clay minerals during the adsorption process, this being an exothermic process. The second contribution, $\Delta_{\text{int}}H_{\text{HA+clay}}^0$, refers to the interaction between HA-clay minerals. These interactions occur via hydrophobic contributions, electrostatic interactions, dispersion interactions occurring with release of energy, contributing to a $\Delta_{\text{ads}}H$ exothermic. The third contribution, $\Delta_{\text{ads}}H_{\text{sol}}$, refers to the desolvation of the HA and the surface, this process is endothermic, because for it to occur is necessary to break the interactions water-clay minerals, clay minerals-ion, ion-HA and water-HA. The fourth contribution, $\Delta_{\text{ads}}H_{\text{conf.rear.}}$, is associated with conformational change of HA adsorption onto surfaces. The conformational change is endothermic, as occurs with the breaking of intramolecular interactions.

The energy released or absorbed as heat in a thermodynamic process can be measured by calorimetric techniques. Among those, ITC has been widely used in

determination of many molecular processes due its high sensitivity, with the possibility of detection of energy flows in the order of 10^{-9} J occurring in a given process.

The enthalpy change of adsorption ($\Delta_{\text{ads}}H$) versus Γ for the adsorption of HA on clay minerals at pH 4.0 in different systems obtained from ITC measurements at 298K are shown in Figure 5 and 6.

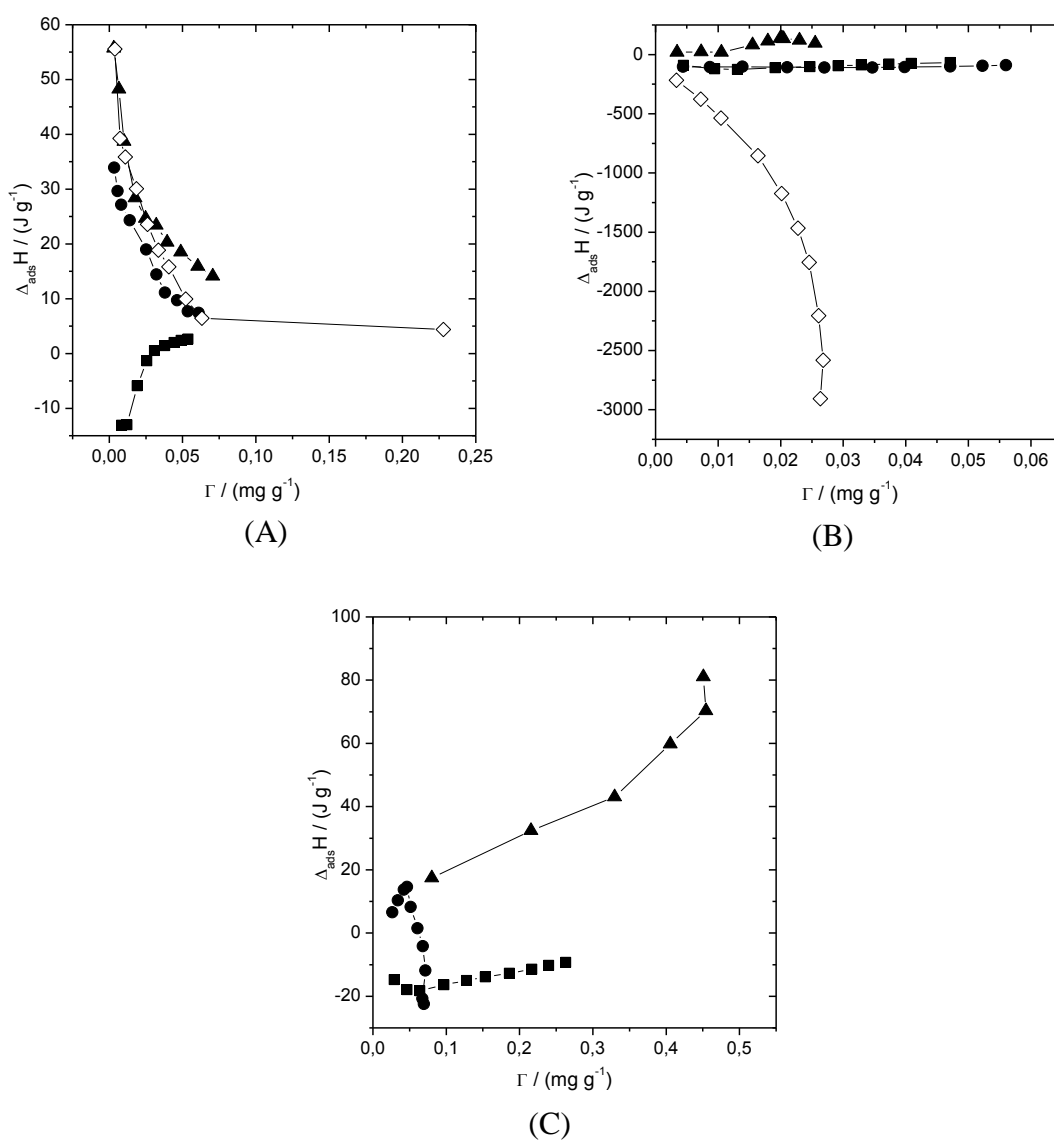


Figure 5. $\Delta_{\text{ads}}H$ of adsorption (J g^{-1}) versus Γ (mg m^{-2}) for the adsorption process of PPHA at pH 4.0 onto (A) Illite, (B) Kaolinite, (C) Mica in ionic strength: (■) 0 mM of NaCl; (●) 1 mM NaCl; (▲) 10 mM NaCl; (◇) 100 mM NaCl.

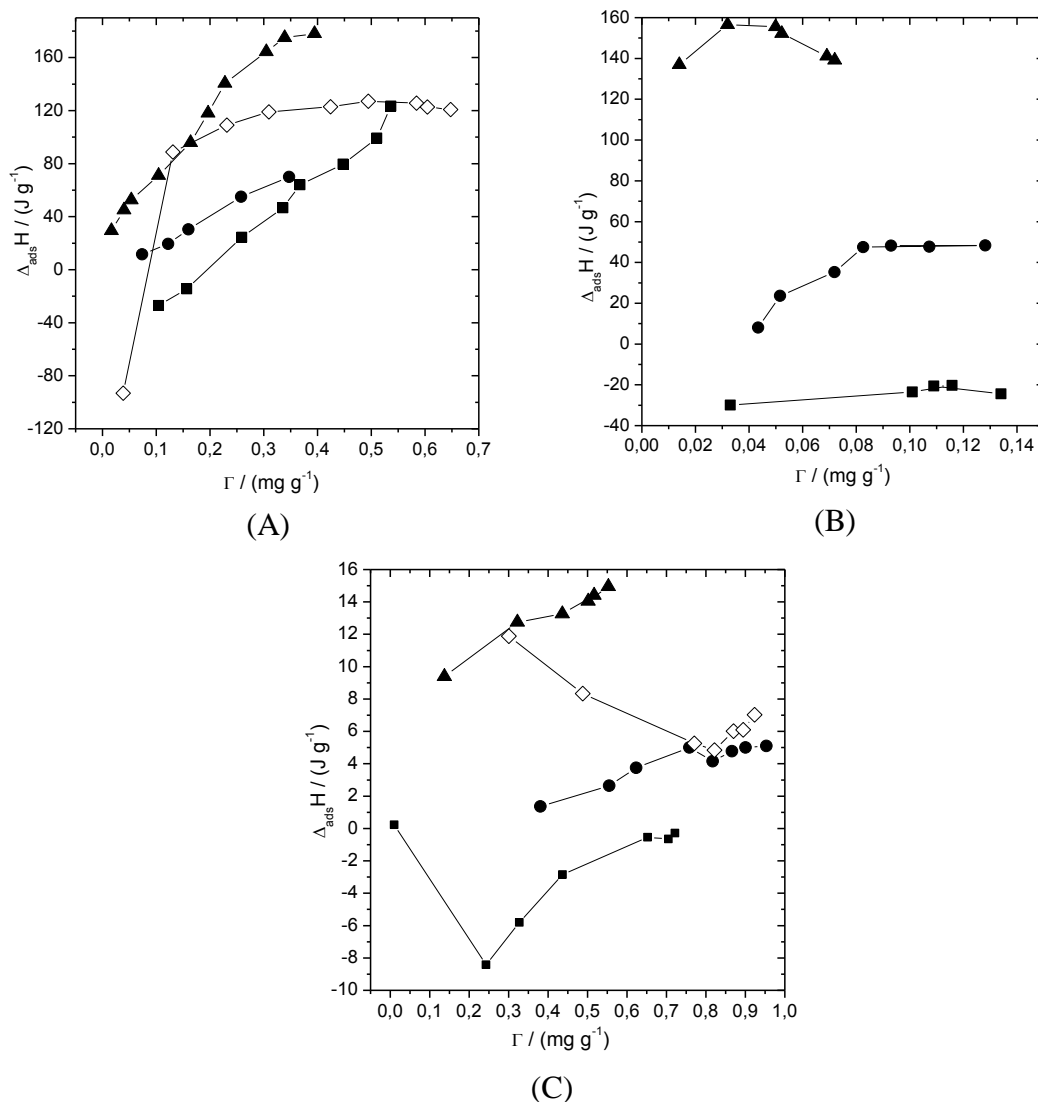


Figure 6. $\Delta_{ads}H$ of adsorption ($J g^{-1}$) versus Γ ($mg m^{-2}$) for the adsorption process of PPHA at pH 4.0 onto (A) Gibbsite, (B) Goethite, (C) Hematite in ionic strength: (■) 0 mM of NaCl; (●) 1 mM NaCl; (▲) 10 mM NaCl; (◇) 100 mM NaCl.

It was not possible to measure the enthalpy of mica and goethite in presence 100 mM NaCl at pH 4.0 systems and no montmorillonite system, because the energy released or absorbed during the titration was too low to be detected by ITC.

The curves as a function of Γ have the different profile. For hematite, goethite, mica and illite all at pH 4.0 system and for mica at pH 4.0 in presence of 100 mM NaCl system, $\Delta_{ads}H$ values are initially exothermic and becomes increasingly less negative. The decrease in the negative value of the enthalpy is due to the contributions of endothermic processes in accordance to equation 10: $\Delta_{ads}H_{sol}$ and $\Delta_{ads}H_{conf.rear}$.

For kaolinite at pH 4.0 in presence of 0 and 1 mM NaCl, $\Delta_{\text{ads}}H$ values are close to zero throughout the titration, therefore the energy released is close to the energy absorbed in the adsorption of PPHA onto kaolinite in the presence of this salt.

For kaolinite at pH 4.0 in presence of 100 mM NaCl system, $\Delta_{\text{ads}}H$ values are initially exothermic and becomes increasingly more negative. In this case, the exothermic processes release energy greater than that absorb by the endothermic processes. Thus, the change in enthalpy becomes increasingly negative.

For gibbsite at pH 4.0 in all systems, for kaolinite and mica at pH 4.0 in presence of 10 mM NaCl system and for hematite at pH 4.0 in presence of 1 and 10 mM NaCl, $\Delta_{\text{ads}}H$ values are positive and becomes increasingly more positive. In this case, the endothermic processes release energy greater than that absorb by the exothermic processes. Thus, the change in enthalpy becomes increasingly positive.

For goethite at pH 4.0 in presence of 1 and 10 mM NaCl, for hematite at pH 4.0 in presence of 100 mM NaCl systems and for illite at pH 4.0 in presence of 1, 10 and 100 mM NaCl systems, $\Delta_{\text{ads}}H$ values are positive and becomes increasingly less positive. In this case, the contribution of endothermic process decreases, while that for exothermic process increases your contribution, despite the first still prevail. Thus, the change in enthalpy becomes decreasingly positive.

From the calorimetric data and models of isotherms is possible to calculate the entropic contribution to the change in Gibbs free energy. However, it is necessary to calculate the $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ obtained by the approximation of infinite dilution scheme in the extrapolation of a curve $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ (kJ mol^{-1}) as a function of the equilibrium concentration (C_e). For this, one must know PPHA molar mass. Despite not having a consensus in the scientific community about the value of PPHA molar mass, we use the average chemical formula suggested by researchers Schnitzer and Kunal ⁴³, $\text{C}_{187}\text{H}_{186}\text{O}_{89}\text{N}_9\text{S}_2$, so that we can analyze the entropic contribution. We know the limitations of the proposed formula

of PPHA, however, our goal is to find an approximate value and / or hypothetical of the $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$, so to allow us to analyze the entropic contribution to the adsorption of PPHA on clay minerals in systems studied.

The values of $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ and $T\Delta_{\text{ads}}S$ were determined for PPHA at pH 4.0 in the presence of salt are listed in Table 4. We used the Langmuir model because it was the best fit.

Table 4. Thermodynamic parameters of adsorption of PPHA onto clay minerals at pH 4.0 in the presence of NaCl calculated with Langmuir model.

System at pH 4.0	$\Delta_{\text{ads}}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹) Lang.	$\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{\text{ads}}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	R²
Illite	-7.586	-617.9	-610.3	0.9962
Illite, 1 mM NaCl	-8.922	-161.9	-153.0	0.9619
Illite, 10 mM NaCl	-5.714	-585.3	-579.6	0.9913
Illite, 100 mM NaCl	-6.200	-283.1	-276.9	0.9930
Kaolinite	-9.414	-188.9	-179.5	0.9969
Kaolinite, 1 mM NaCl	-9.096	142.6	151.7	0.9864
Kaolinite, 10 mM NaCl	-9.279	263.4	272.7	0.9854
Kaolinite, 100 mM NaCl	-10.93	237.5	248.5	0.9631
Mica	-14.23	-84.14	-69.90	0.9966
Mica, 1 mM NaCl	-7.646	-15.60	-7.957	0.9794
Mica, 10 mM NaCl	-10.73	84.60	95.34	0.9610
Mica, 100 mM NaCl	-22,83	ND	ND	ND
Gibbsite	-13.87	9.594	23.46	0.9907
Gibbsite, 1 mM NaCl	-15.38	28.03	43.41	0.9911
Gibbsite, 10 mM NaCl	-18.36	105.5	123.9	0.9846
Gibbsite, 100 mM NaCl	-16.02	-5.281	10.74	0.9573
Hematite	-13.75	-108.6	-94.85	0.9883
Hematite, 1 mM NaCl	-22.83	-4.489	18.34	0.9602
Hematite, 10 mM NaCl	-19.45	49.01	68.46	0.9428
Hematite, 100 mM NaCl	-20.32	10.44	30.76	0.9625
Goethite	-28.30	-120.7	-92.43	0.9338
Goethite, 1 mM NaCl	-22.83	-242.8	-220.0	0.9585
Goethite, 10 mM NaCl	-12.30	400.7	413.0	0.9858
Goethite, 100 mM NaCl	-12,27	ND	ND	ND

ND – not detectable.

The correlation coefficient was greater than 0.9 for all systems studied, which shows a good fit of the models studied. $T\Delta_{\text{ads}}S$ is positive for the adsorption of PPHA on kaolinite and hematite in presence of 1, 10 and 100 mM NaCl, gibbsite in all concentration

salt, mica and goethite in presence of 10 mM NaCl. Other systems presented $T\Delta_{\text{ads}}S$ negative.

The entropic contribution balancing occurs by two processes. The first is the conformational change of the HA to a more linear conformation on the surface of the clay mineral and subsequent electrostatic interaction among ions in solution and the ionizable groups of the HA⁵¹. This interaction would reduce the degree of translational freedom of the species charged and therefore decrease the entropy of the system.

The second process is related to the interaction HA-clay mineral. For the HA interacts with the surface of clay mineral, both the HA and the clay mineral need to release the molecules of solvation (H_2O and ions). This process releases the molecules into solution and this causes the increase of the configurational entropy of the system.

Thus, the balance of these two processes mentioned above is that because the $\Delta_{\text{ads}}S$ is positive. Thus, for cases with entropy greater than zero, this second factor prevails over so first. The adsorption of HA onto clay minerals is a spontaneous process, so $\Delta_{\text{ads}}G$ is negative. The $\Delta_{\text{ads}}G$ has two contributions (equation 9). Therefore, adsorption processes of PPHA at pH 4.0 on gibbsite in presence 100 mM NaCl and hematite in presence of 1 mM NaCl, are promoted by entropy increase and enthalpy decrease. The driving force of the adsorption of PPHA on kaolinite at pH 4.0 and in all concentration salt, gibbsite at pH 4.0 and in presence of 1 and 10 mM NaCl, mica and goethite in presence of 10 mM and hematite in presence of 10 and 100 mM NaCl is entropy. Adsorption processes of PPHA in others systems is enthalpically driven. Therefore, due to the heterogeneities and complexity of PPHA in its composition and conformation, various adsorption behaviors were observed for PPHA in different minerals.

4. Conclusion

The effect of ionic strength and pH on the adsorption of PPHA on clay minerals was studied. The system that adsorbed PPHA the most were hematite at pH 4.0 in presence of 1 mM NaCl.

The differences in type of clay minerals would lead to different reaction mechanisms and therefore to a different adsorption phenomenon. Thus, adsorption of PPHA on clay minerals was dependent on the surface properties of the clay minerals. Consequently, it is necessary to identify the differences in PPHA adsorption on various clays by comprehensively analyzing the physicochemical properties of the clays, adsorption PPHA-clay complexes and suspensions using a combination of multiple analytical techniques including liquid-state ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, high performance size exclusion chromatography (HPSEC), Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

The isotherms obtained at 298K were fitted by the Langmuir, Thermodynamic and Freudlinch models. Taking into account the quality of the fit gave by the correlation coefficient (R^2), the Langmuir model was the best fit the experimental data, except for montmorinollite at pH 4.0 and 6.0.

It was described for the first time the use of microcalorimetric technique to evaluate the adsorption of PPHA on clay minerals. Adsorption thermodynamic of PPHA on clay minerals was evaluated using isothermal titration calorimetry (ITC) as the main technique. The adsorption of PPHA on clay minerals is a spontaneous process ($\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$). Adsorption processes of PPHA at pH 4.0 on gibbsite in presence 100 mM NaCl and hematite in presence of 1 mM NaCl, are promoted by entropy increase and enthalpy decrease. The driving force of the adsorption of PPHA on kaolinite at pH 4.0 and in all concentration salt, gibbsite at pH 4.0 and in presence of 1 and 10 mM NaCl, mica and

goethite in presence of 10 mM and hematite in presence of 10 and 100 mM NaCl is entropy.

The results of the present study will improve our understanding of the roles of mineral interfacial properties, composition and particle size of HA in the adsorption processes, which will benefit elucidating the adsorption mechanisms of PPHA on clay minerals. In addition, this study is also helpful in further understanding behaviors of contaminants in the natural environments since interactions between PPHA and clay minerals will determine bioavailability, toxicity, and transport of the contaminants in the environment.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian agencies CNPq, FAPEMIG, CAPES (PNPD), and to Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) for financial support.

6. References

1. Frimmel, F. H., Characterization of natural organic matter as major constituents in aquatic systems. *Journal of Contaminant Hydrology* **1998**, *35* (1–3), 201-216.
2. Menzel, R.; Stürzenbaum, S.; Bärenwaldt, A.; Kulas, J.; Steinberg, C. E. W., Humic Material Induces Behavioral and Global Transcriptional Responses in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (21), 8324-8332.
3. Ransom, B.; Bennett, R. H.; Baerwald, R.; Shea, K., TEM study of in situ organic matter on continental margins: occurrence and the “monolayer” hypothesis. *Marine Geology* **1997**, *138* (1–2), 1-9.
4. Pan, B.; Tao, S.; Dawson, R. W.; Xing, B. S., Formation of organo-mineral complexes as affected by particle size, pH, and dry–wet cycles. *Soil Research* **2010**, *48* (8), 713-719.
5. Książopolska, A.; Pazur, M., Surface properties of bentonite and illite complexes with humus acids. *Clay Minerals* **2011**, *46* (1), 149-156.
6. Conte, P.; Abbate, C.; Baglieri, A.; Nègre, M.; Pasquale, C. D.; Alonzo, G.; Gennari, M., Adsorption of dissolved organic matter on clay minerals as assessed by infra-red, CPMAS ¹³C NMR spectroscopy and low field T1 NMR relaxometry. *Organic Geochemistry* **2011**, *42* (8), 972-977.

7. Weng; Van Riemsdijk, W. H.; Koopal, L. K.; Hiemstra, T., Adsorption of humic substances on goethite: comparison between humic acids and fulvic acids. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (24), 7494-7500.
8. Wang, K.; Xing, B., Structural and sorption characteristics of adsorbed humic acid on clay minerals. *J. Environ. Qual.* **2005**, *34* (1), 342-349.
9. (a) Gamboa, C.; Olea, A. F., Association of cationic surfactants to humic acid: Effect on the surface activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2006**, *278* (1-3), 241-245; (b) Koopal, L. K.; Goloub, T. P.; Davis, T. A., Binding of ionic surfactants to purified humic acid. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, *275* (2), 360-367.
10. Vergütz, L., Studying the soil compartment of the global carbon cycle [tese de doutorado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2011.
11. Bouras, O.; Bollinger, J.-C.; Baudu, M., Effect of humic acids on pentachlorophenol sorption to cetyltrimethylammonium-modified, Fe- and Al-pillared montmorillonites. *Applied Clay Science* **2010**, *50* (1), 58-63.
12. Zhang, L.; Luo, L.; Zhang, S., Integrated investigations on the adsorption mechanisms of fulvic and humic acids on three clay minerals. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2012**, *406* (0), 84-90.
13. Specht, C. H.; Kumke, M. U.; Frimmel, F. H., Characterization of NOM adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography. *Water Research* **2000**, *34* (16), 4063-4069.
14. Jardine, P. M.; Weber, N. L.; McCarthy, J. F., Mechanisms of dissolved organic carbon adsorption on soil. *Soil Science Society of America Journal* **1989**, *53* (5), 1378-1385.
15. Baham, J.; Sposito, G., Adsorption of natural dissolved organic matter at the oxide/water interface. *Journal Environmental Quality* **1994**, *23*, 147-153.
16. McKnight, D. M.; Bencala, K. E.; Zellweger, G. W.; Aiken, G. R.; Feder, G. L.; Thorn, K. A., Sorption of dissolved organic carbon by hydrous aluminum and iron oxides occurring at the confluence of Deer Creek with the Snake River, Summit County, Colorado. *Environmental Science & Technology* **1992**, *26* (7), 1388-1396.
17. Feng, X.; Simpson, A. J.; Simpson, M. J., Chemical and mineralogical controls on humic acid sorption to clay mineral surfaces. *Organic Geochemistry* **2005**, *36* (11), 1553-1566.
18. Ghosh, S.; Wang, Z.-Y.; Kang, S.; Bhowmik, P. C.; Xing, B. S., Sorption and Fractionation of a Peat Derived Humic Acid by Kaolinite, Montmorillonite, and Goethite. *Pedosphere* **2009**, *19* (1), 21-30.
19. Angove, M. J.; Fernandes, M. B.; Ikhsan, J., The Sorption of Anthracene onto Goethite and Kaolinite in the Presence of Some Benzene Carboxylic Acids. *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, *247* (2), 282-289.
20. Johnson, S. B.; Yoon, T. H.; Kocar, B. D.; Brown, G. E., Adsorption of Organic Matter at Mineral/Water Interfaces. 2. Outer-Sphere Adsorption of Maleate and Implications for Dissolution Processes. *Langmuir* **2004**, *20* (12), 4996-5006.
21. Yoon, T. H.; Johnson, S. B.; Musgrave, C. B.; Brown Jr, G. E., Adsorption of organic matter at mineral/water interfaces: I. ATR-FTIR spectroscopic and quantum chemical study of oxalate adsorbed at boehmite/water and corundum/water interfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2004**, *68* (22), 4505-4518.

22. Huygens, D.; Boeckx, P.; Van Cleemput, O.; Oyarzún, C.; Godoy, R., Aggregate and soil organic carbon dynamics in South Chilean Andisols. *Biogeosciences* **2005**, *2*, 159-174.
23. Jobbágy, E. G.; Jackson, R. B., The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications* **2000**, *10*, 423-436.
24. Kang, S.; Xing, B., Humic acid fractionation upon sequential adsorption onto goethite. *Langmuir* **2008**, *24* (6), 2525-2531.
25. Mikutta, R.; Kleber, M.; Torn, M. S.; Jahn, R., Stabilization of soil organic matter: association with minerals or chemical recalcitrance? *Biogeochemistry* **2006**, *77*, 25-56.
26. Wagai, R.; Mayer, L. M., Sorptive stabilization of organic matter in soils by hydrous iron oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2007**, *71* (1), 25-35.
27. Borggaard, O. K.; Raben-Lange, B.; Gimsing, A. L.; Strobel, B. W., Influence of humic substances on phosphate adsorption by aluminium and iron oxides. *Geoderma* **2005**, *127* (3-4), 270-279.
28. Davis, J. A.; Gloor, R., Adsorption of dissolved organics in lake water by aluminum oxide. Effect of molecular weight. *Environmental Science & Technology* **1981**, *15* (10), 1223-1229.
29. Peng, X.; Luan, Z.; Zhang, H., Montmorillonite-Cu(II)/Fe(III) oxides magnetic material as adsorbent for removal of humic acid and its thermal regeneration. *Chemosphere* **2006**, *63* (2), 300-306.
30. Liu, A.; Gonzalez, R. D., Adsorption/desorption in a system consisting of humic acid, heavy metals, and clay minerals. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *218* (1), 225-232.
31. Vermeer, A. W. P.; van Riemsdijk, W. H.; Koopal, L. K., Adsorption of humic acid to mineral particles. 1. specific and electrostatic interactions. *Langmuir* **1998**, *14* (10), 2810-2819.
32. Bjelopavlic, M.; Newcombe, G.; Hayes, R., Adsorption of NOM onto Activated Carbon: Effect of Surface Charge, Ionic Strength, and Pore Volume Distribution. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *210* (2), 271-280.
33. Gu, B.; Schmitt, J.; Chen, Z.; Liang, L.; McCarthy, J. F., Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environmental Science & Technology* **1994**, *28* (1), 38-46.
34. Murphy, E. M.; Zachara, J. M.; Smith, S. C.; Phillips, J. L.; Wietsma, T. W., Interaction of Hydrophobic Organic Compounds with Mineral-Bound Humic Substances. *Environmental Science & Technology* **1994**, *28* (7), 1291-1299.
35. Arnarson, T. S.; Keil, R. G., Mechanisms of pore water organic matter adsorption to montmorillonite. *Marine Chemistry* **2000**, *71* (3-4), 309-320.
36. Parks, G. A., The Isoelectric Points of Solid Oxides, Solid Hydroxides, and Aqueous Hydroxo Complex Systems. *Chemical Reviews* **1965**, *65* (2), 177-198.
37. Ramos-Tejada, M. M.; Ontiveros, A.; de Vicente, J.; Durán, J. D. G., Effect of humic acid adsorption on the rheological properties of sodium montmorillonite suspensions. *Journal of Rheology* **2001**, *45* (5), 1159.

38. Liu, A.; Wu, R. C.; Eschenazi, E.; Papadopoulos, K., AFM on humic acid adsorption on mica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *174* (1–2), 245-252.
39. Ohtsubo, M.; Yoshimura, A.; Wada, S.-I.; Yong, R. N., Particle interaction and rheology of illite-iron oxide complexes. *Clays and Clay Minerals* **1991**, *39* (4), 347-354.
40. Tombácz, E.; Dobos, Á.; Szekeres, M.; Narres, H. D.; Klumpp, E.; Dékány, I., Effect of pH and ionic strength on the interaction of humic acid with aluminium oxide. *Colloid Polym Sci* **2000**, *278* (4), 337-345.
41. Antelo, J.; Arce, F.; Avena, M.; Fiol, S.; López, R.; Macías, F., Adsorption of a soil humic acid at the surface of goethite and its competitive interaction with phosphate. *Geoderma* **2007**, *138* (1–2), 12-19.
42. Jones, K. L.; O'Melia, C. R., Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. *Journal of Membrane Science* **2000**, *165* (1), 31-46.
43. Ghosh, K.; Schnitzer, M., Macromolecular Structures of Humic Substances. *Soil Science* **1980**, *129* (5), 266-276.
44. Cornejo, J.; Hermosín, M. C., Chapter 15 - Interaction of Humic Substances and Soil Clays. In *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*, Piccolo, A., Ed. Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 1996; pp 595-624.
45. Parikh, S. J.; James, B. R., Soil: the foundation of agriculture. *Nature Education Knowledge* **2012**, *3* (10), 2.
46. Senesi, N.; Xing, B.; Huang, P. M., *Biphysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication: New Jersey, 2009; p 884.
47. Giles, C. H.; Smith, D.; Huitson, A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *47* (3), 755-765.
48. Giles, C. H.; D'Silva, A. P.; Easton, I. A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm part. II. Experimental interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *47* (3), 766-778.
49. Wu, C.-H., Adsorption of reactive dye onto carbon nanotubes: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, *144* (1–2), 93-100.
50. Norde, W.; Lyklema, J., Thermodynamics of protein adsorption. Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1979**, *71* (2), 350-366.
51. Schmitt, P.; Freitag, D.; Trapp, I.; Garrison, A. W.; Schiavon, M.; Kettrup, A., Binding of s-triazines to dissolved humic substances: Electrophoretic approaches using Affinity Capillary Electrophoresis (ACE) and Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC). *Chemosphere* **1997**, *35* (1–2), 55-75.

CAPÍTULO 4: Investigação termodinâmica da interação BSA e ácido húmico via espectroscopia de fluorescência e ITC

Igor José Boggione Santos¹, Leonardus Vergutz^{1,2}, Luis Henrique Mendes da Silva^{1*} e
Maria do Carmo Hespanhol da Silva¹

¹ Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

² Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

* *Corresponding author.* Fax: +55 31 3899 3065. E-mail address: luhen@ufv.br (L. H. M. da Silva)

Resumo

Neste trabalho estudou-se a interação entre a proteína albumina do soro bovino (BSA) e o ácido húmico Pahokee Peat (PPHA) em diferentes tampões de acetato de sódio e na presença de diferentes concentrações de KCl via espectroscopia de fluorescência e calorimetria de titulação isotérmica. A diferença da intensidade de fluorescência da BSA na ausência e presença de PPHA (ΔF) aumentou com o aumento da concentração de PPHA para todos os sistemas estudados. A presença do KCl em solução influenciou a interação, sendo que em tampão 5,4 a força iônica influenciou pouquíssima a interação na faixa de concentração de PPHA estudada. A análise termodinâmica, baseada na equação adaptada de Benesi-Hildebrand e em titulações calorimétricas, mostrou que a interação BSA-PPHA ocorre espontaneamente ($\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$), apresentando um alto valor na constante de ligação (K_b). A $T\Delta_{\text{int}}S$ foi positiva para os sistemas em tampão 3,6 e 4,8 na presença de 50 mM de KCl, sendo que no primeiro a variação entálpica foi desfavorável. Nos demais sistemas estudados, não houve uma contribuição entrópica favorável ao processo de interação BSA-PPHA, sendo, portanto, o processo dirigido pela entalpia.

Palavras chave: ácido húmico, BSA, interação, termodinâmica e titulação calorimétrica isotérmica.

1. Introdução

Como principal componente da matéria orgânica natural, os ácidos húmicos estão envolvidos em diferentes interações nos sistemas aquosos e no solo ¹. Substâncias húmicas (HS) são compostos de moléculas amorfas, quimicamente complexas e internamente estruturadas ou agregadas molecularmente ^{2,3}, com um caráter polieletrólito que pode ser classificada como matéria coloidal mole ⁴.

HS são carregadas negativamente e o pH afeta a densidade de cargas e o raio hidrodinâmico das partículas húmicas ⁵. Vários pesquisadores tem estudado a interação de HS com polieletrólitos ^{6,7,8}. A atenção dada a esta interação tem sido direcionada para a remoção de HS de soluções aquosas pela complexação e agregação.

Uma classe especial de polieletrólitos que também podem interagir com HS são as proteínas. No entanto, apesar de seu potencial de aplicações tecnológicas, há pouca ou nenhuma literatura. A interação HS-proteínas é especialmente relevante na qualidade do solo. Uma pesquisa recente ^{9,10,11} indicou que, por exemplo, a glicoproteína glomalina pode ser importante para a estrutura e extração do solo. Também é relevante o papel das proteínas patogênicas, tais como as toxinas proteicas dos inseticidas, as proteínas farmacêuticas (produzidas em plantas transgênicas) e proteínas infecciosas envolvidas na encefalopatias espongiiformes transmissíveis causadoras de doenças como a BSE e doença de Creutzfeldt-Jakob, que podem estar presentes nas águas subterrâneas e superficiais.

Interação HS-proteína pode provocar a modificação da estrutura da proteína e, por conseguinte, uma alteração na atividade biológica. A extensão em que isto ocorre depende de condições específicas ^{12,13}. Além disso, a ligação a outras substâncias, produz proteínas menos susceptíveis a degradação microbiológica e isto pode ser perigoso para o ambiente.

Neste trabalho a interação HS-proteína é estudada considerando a interação do ácido húmico Pahokee Peat (PPHA) purificada com a proteína albumina do soro bovino

(BSA). PPHA é geralmente usado como modelo de estudo pois é facilmente disponível e os HA são os componentes majoritários das HS, o que tornam aqueles um bom representante destes ¹⁴. E a BSA é empregada como proteína modelo em sistema biomiméticos, sendo sua estrutura e estabilidade bastante conhecidas. Além da BSA ser de fácil aquisição por ser a proteína mais abundante no sangue bovino ¹⁵.

Enzimas e outras proteínas em solução possuem uma forte afinidade para se ligar a fases sólidas dispersas e a polieletrólitos orgânicos com carga oposta. No solo, as fases sólidas são argilas e oxihidróxidos ¹⁶. A ligação entre proteínas e HA tem sido atribuída a copolimerização ¹⁷, adsorção ¹⁸ e encapsulamento de proteína dentro da estrutura interna da matéria húmica ¹⁹.

Recentemente, Tan *et al.* ^{15,20} e Tomaszewski *et al.* ^{16,21} relataram a importância das interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre HA e proteínas e concluíram que parâmetros como razão de mistura HA e proteína, pH e força iônica determinam a extensão da complexação e agregação dos complexos HA-proteínas ²².

Neste trabalho, nós estudamos a interação BSA-HA via espectroscopia de fluorescência e titulação isotérmica calorimétrica. O conhecimento sobre a capacidade de ligação do HA com BSA pode auxiliar em estudos futuros sobre a interação de proteínas e substâncias húmicas no solo de importância ambiental e tecnológica ²³.

2. Experimental

2.1. Materiais

A BSA foi adquirida da Sigma-Aldrich, EUA, com 99% de pureza. O ácido húmico Pahokee Peat foi adquirido da International Humic Substances Society (IHSS) e o KCl foi adquirido da Vetec, Brasil, com 99% de pureza. Todos os reagentes foram usados sem purificações adicionais.

2.2. Espectroscopia de fluorescência

O espectrômetro de fluorescência Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, EUA) foi empregado para estudar a interação entre a BSA e o PPHA em vários sistemas. A ligação BSA-PPHA foi examinada por medidas de fluorescência em estado estacionário direto. A amostra foi excitada em dois comprimentos de onda com 5 nm de fenda de excitação e emissão. O comprimento de onda de excitação de 250,00 nm é referente ao PPHA e o de 282,03 nm é referente à excitação da BSA. Os espectros foram registrados entre 283,00 e 700 nm. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C.

A concentração de BSA foi mantida constante a 1 mg mL⁻¹ e a concentração de PPHA variou de 0,001 à 0,01 mg mL⁻¹. Foi utilizado também um controle, no qual a BSA estava ausente. As soluções foram preparadas em tampões de acetato de sódio nos pHs 3,6; 4,8; 5,4 e 5,8 e em diferentes concentrações do eletrólito KCl (0,5; 5 e 50 mM).

A intensidade de fluorescência foi medida por concentrações crescentes de PPHA. Os parâmetros de ligação foram calculadas usando a equação derivada de Benesi-Hildebrand^{24,25}:

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{max}} + \frac{1}{(K_b \Delta F_{max} [PPHA])} \quad (1)$$

Onde ΔF é a diferença na intensidade de fluorescência entre a amostra, com e sem PPHA, ΔF_{max} é a diferença máxima de fluorescência no platô, K_b é a constante de ligação e $[PPHA]$ é a concentração de PPHA (mg mL⁻¹).

3. Resultados e discussão

3.1. Espectroscopia de fluorescência

A Figura 1 mostra os espectros de emissão dos sistemas BSA-PPHA em tampão 3,6 no comprimento de excitação da BSA (283,03 nm) em diferentes concentrações de PPHA.

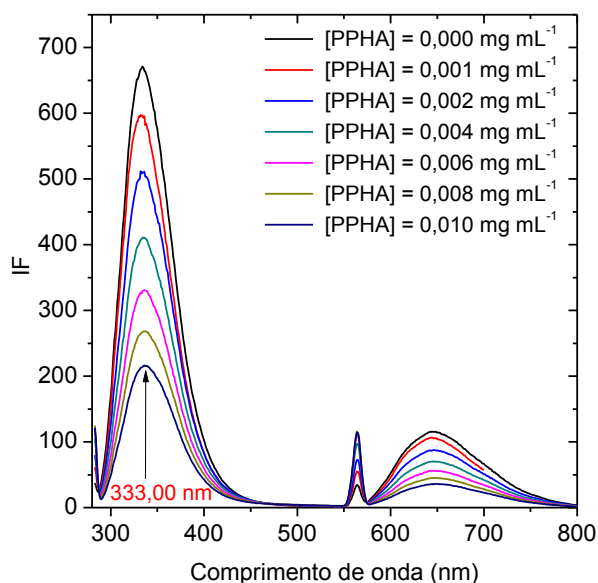


Figura 1. Espectro de emissão para os sistemas PPHA-BSA em tampão 3,6.

Observa-se que à medida que se aumenta a concentração de PPHA, diminui a intensidade de fluorescência (IF) da banda de emissão da BSA. Dessa forma, verificamos que a interação BSA-PPHA diminui a IF da BSA, sem ocorrer deslocamento do comprimento de onda de emissão. O mesmo comportamento foi obtido para todos os sistemas estudados.

A Figura 2 mostra a variação da intensidade da fluorescência (ΔF) em função da concentração de PPHA em diferentes tampões e força iônica, onde ΔF representa a variação da fluorescência da BSA com e sem PPHA.

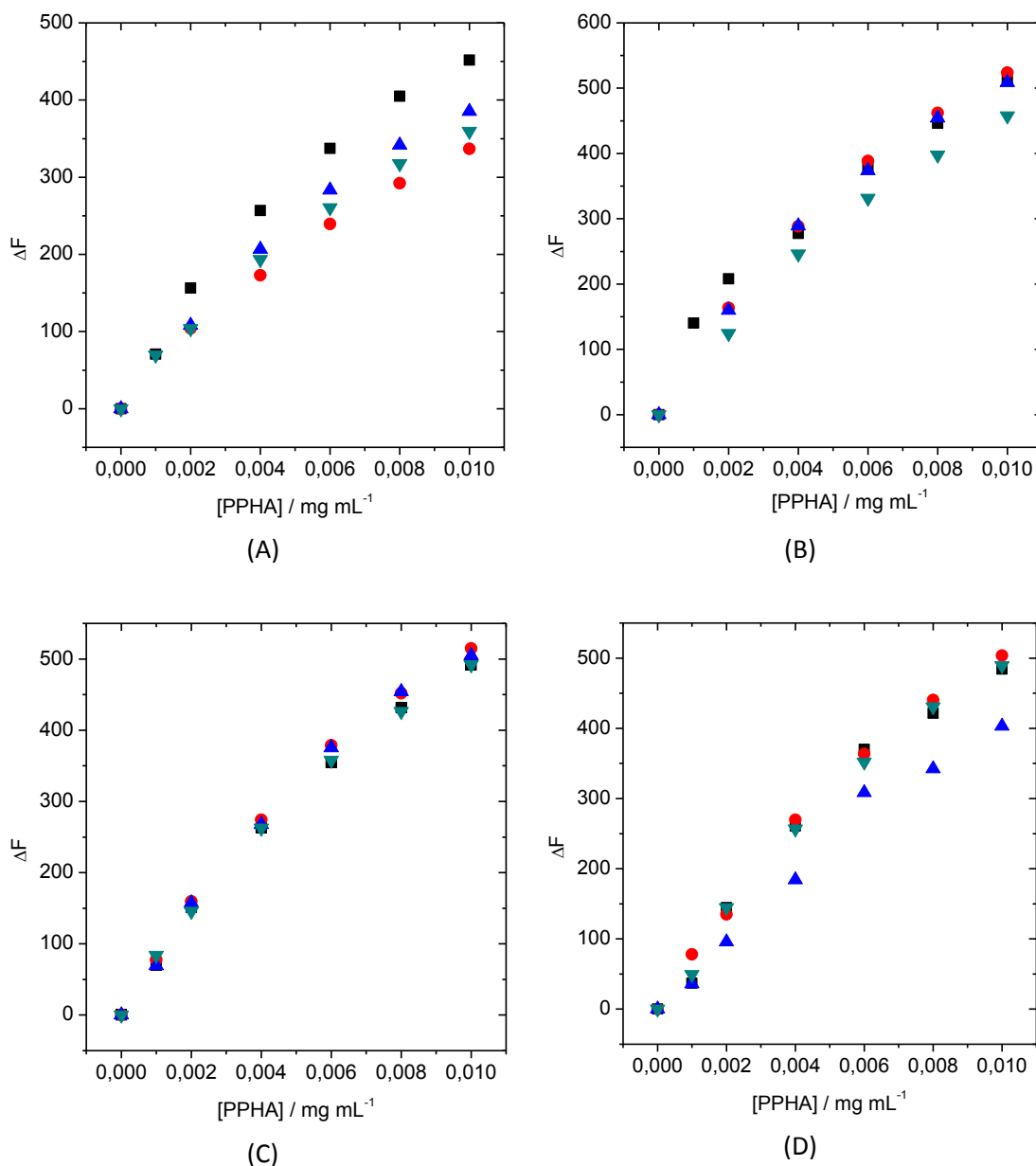


Figura 2. Variação da intensidade de fluorescência (medida em λ_{em} 283,03 nm) em função da concentração de PPHA em tampões acetato: (A) tampão 3,6 (B) tampão 4,8 (C) tampão 5,4 (D) tampão 5,8 e em diferentes forças iônicas: (■) 0 mM de KCl; (●) 0,5 mM de KCl; (▲) 5 mM de KCl; (▼) 50 mM de KCl.

A ΔF aumenta com o aumento da concentração de PPHA para todos os sistemas estudados. Observa-se que para o tampão 5,4 a força iônica teve pouca influência na interação na faixa de concentração de PPHA estudada. Foi no tampão 3,6 que houve uma maior influência da força iônica, sendo crescente a diferenciação da curva na ausência e presença do sal com o crescente aumento da concentração de PPHA. Os sistemas em

tampão 4,8 e 5,8 tiveram a influência da força iônica na ΔF , principalmente, na presença de 50 mM e 5 mM de KCl, respectivamente.

A ligação BSA-PPHA pode ser descrita como um equilíbrio entre a BSA livre e a BSA ligada ao PPHA. Essa ligação pode ser descrita pela equação 1. No entanto, para calcular K_b por esta equação é necessário plotar um gráfico de $1/\Delta F \times 1/[PPHA]$ em mol L⁻¹. Não há um consenso na literatura científica sobre o valor da massa molar dos HA, mas usaremos a sugestão dos pesquisadores Schnitzer e Kunal²⁶, cuja fórmula química média é dada por C₁₈₇H₁₈₆O₈₉N₉S₂. Nós sabemos das limitações desta proposta, no entanto nosso intuito é encontrar um valor aproximado e/ou hipotético de K_b para depois obter os parâmetros termodinâmicos e analisa-los. O gráfico $1/\Delta F$ em função de $1/[PPHA]$ da interação BSA-PPHA em tampão 5,8 na presença de 50 mM de KCl é mostrado na Figura 3. Os outros sistemas tiveram o mesmo comportamento.

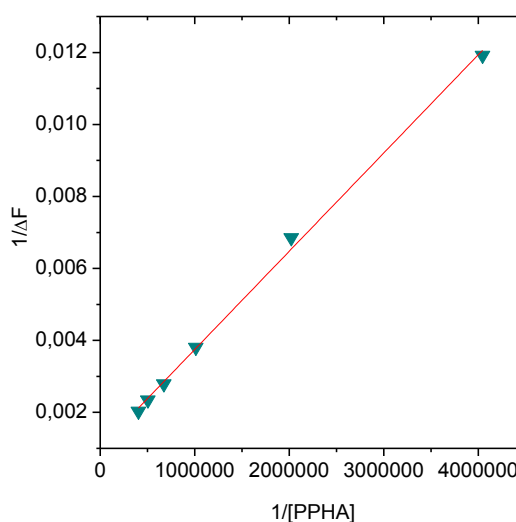


Figura 3. Gráfico $1/\Delta F$ em função de $1/[PPHA]$ da interação BSA-PPHA em tampão 5,8 na presença de 50 mM de KCl.

A partir destas medições foi possível estimar a ΔF_{\max} , K_b e $\Delta_{\text{int}}G$ para todos os sistemas estudados. Os valores estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Constantes de ligação (K_b), intensidade de fluorescência máxima da ligação BSA-PPHA e $\Delta_{int}G$ em diferentes sistemas estimada pela equação (1).

Tampão 3,6	ΔF_{max}	$K_b / (10^5 M^{-1})$	R^2	$\Delta_{int}G / kJ mol^{-1}$
0 mM KCl	833,3	4,000	0,9988	-31,98
0,5 mM KCl	709,2	3,525	0,9965	-31,66
5 mM KCl	1243	2,011	0,9980	-30,27
50 mM KCl	1013	2,468	0,9990	-30,78
Tampão 4,8	ΔF_{max}	$K_b / (10^5 M^{-1})$	R^2	$\Delta_{int}G / kJ mol^{-1}$
0 mM KCl	1174	2,839	0,9974	-31,13
0,5 mM KCl	1192	2,797	0,9999	-31,09
5 mM KCl	1162	2,869	0,9989	-31,15
50 mM KCl	1635	1,530	0,9958	-29,59
Tampão 5,4	ΔF_{max}	$K_b / (10^5 M^{-1})$	R^2	$\Delta_{int}G / kJ mol^{-1}$
0 mM KCl	1109	3,005	0,9998	-31,27
0,5 mM KCl	1151	2,896	0,9992	-31,18
5 mM KCl	1150	2,900	0,9982	-31,18
50 mM KCl	980,4	3,400	0,9977	-31,57
Tampão 5,8	ΔF_{max}	$K_b / (10^5 M^{-1})$	R^2	$\Delta_{int}G / kJ mol^{-1}$
0 mM KCl	1268	2,629	0,9982	-30,94
0,5 mM KCl	1257	2,651	0,9955	-30,96
5 mM KCl	3772	0,5302	0,9932	-26,97
50 mM KCl	1230	2,710	0,9999	-31,01

A equação 1 descreveu o comportamento de interação BSA-PPHA, uma vez que todos os coeficientes de correlação foram maior que 0,9900. O sistema que proporcionou a maior ΔF_{max} foi em tampão 5,8 na presença de 5 mM KCl, cujo valor foi 3772, e o menor valor foi de 709,2 para o sistema tampão 3,6 na presença de 0,5 mM KCl.

Os altos valores da K_b demonstram que há uma forte interação entre BSA-PPHA, sendo que o sistema em tampão 3,6 na ausência de sal é que apresentou a maior constante de ligação. Os valores de K_b para a interação BSA-PPHA demonstraram valores maiores do que outros estudos recentes de interação via espectroscopia de fluorescência, tais como o estudo de LSZ-BSA (K_b na ordem de 10^3)²⁷, BSA-cloridrato de prometazina (K_b na ordem de 10^4)²⁸, BSA-ácido aminofosfínico (K_b na ordem de 10^4)²⁹ e HA-trifeniltin (K_b na ordem de 10^4)²³.

A BSA apresenta o ponto isoelétrico em torno de 4,70³⁰, portanto em tampão 3,6 ela se encontra carregada positivamente. E a maioria dos compostos presentes na matéria orgânica, incluindo o ácido húmico, transporta uma carga negativa, geralmente, atribuída, por exemplo, ao ácido carboxílico e grupos fenólicos, e isso faz com que os compostos de maior dimensão se comportem como polieletrólitos em solução³¹. Portanto, em tampão 3,6, o PPHA apresenta-se carregado negativamente e será atraído eletrostaticamente pela BSA carregada positivamente, justificando o alto valor de K_b neste sistema.

A diminuição do valor de K_b com o aumento da força iônica em tampão 3,6 pode se justificar pelo fato de que há uma menor necessidade da BSA neutralizar a carga negativa do PPHA, já que há cátions que o fazem. Tan *et al.*^{22,20} tiveram resultado semelhante ao estudarem a ligação entre o ácido húmico da Aldrich purificado (PAHA) e a lisozima (LSZ) na presença de KCl em pH 5,0. Os autores concluíram que a ligação PAHA-LSZ tem uma alta afinidade, mas esta afinidade se enfraquece vagarosamente com o aumento da concentração de KCl.

No entanto, a interação BSA-PPHA é uma relação complexa entre interações eletrostáticas e não-eletrostáticas³². De acordo com Li *et al.*³³ ao estudar a interação PAHA-LSZ em diferentes concentrações de KCl afirmam que o aumento da força iônica influencia a interação eletrostática, mas não afeta a atração hidrofóbica, o que pode implicar no aumento da intensidade de ligação entre PAHA-LSZ com o aumento da força iônica. Isto explicaria o fato do por quê o efeito da força iônica reverter: antes do ponto isoelétrico a atração PAHA-LSZ diminui e após o ponto isoelétrico a atração PAHA-LSZ aumenta com o aumento da concentração de sal. A intensidade da atração PAHA-LSZ aumenta com o aumento da concentração de sal quando os íons e contra-íons do sal interagem tanto com a proteína, que no caso da BSA está carregada negativamente, quanto com o ácido húmico, carregado negativamente, neutralizando-os, de tal forma a

favorecer as interações hidrofóbicas e diminuir as repulsões entre os agregados, entre os agregados e as proteínas e ácidos húmicos livres e entre os ácidos húmicos e as proteínas.

Estes fatores explicariam os resultados obtidos na interação da BSA-PPHA nos tampões acima do ponto isoelétrico da BSA, 5,4 e 5,8. No tampão 5,4 não há uma grande alteração de K_b na ausência e na presença de 0,5 e 5 mM de KCl, mas na presença de 50 mM de KCl há um aumento em K_b . No tampão 5,8 há um pequeno aumento gradual em K_b no crescente aumento da concentração de sal, com exceção da concentração de 5 mM de KCl, cujo valor diminui consideravelmente. A diminuição em K_b com o aumento da força iônica em pHs maiores que o ponto isoelétrico da BSA pode ser justificada pelo fato de que a presença de sal blinda algumas forças atrativas eletrostáticas intramoleculares, expandindo a molécula BSA e diminuindo a interação entre BSA-PPHA³⁴, podendo ocorrer o mesmo com o PPHA.

No tampão 4,8, a BSA encontra-se praticamente no seu ponto isoelétrico, portanto a ligação entre BSA-PPHA será governada pelas interações hidrofóbicas, por isso a força iônica não altera muito os valores de K_b , com exceção na presença de 50 mM de KCl, cujo K_b diminui de valor quando comparado a outras concentrações do sal.

A $\Delta_{int}G$ foi obtida por meio da equação de Gibbs ($\Delta_{int}G = -RT \ln K_b$) e os valores negativos obtidos demonstram a espontaneidade da ligação BSA-PPHA. Os valores foram similares para todos os sistemas estudados, sendo o valor que mais se diferenciou foi o de $-26,97 \text{ kJ mol}^{-1}$ no sistema tampão 5,8 na presença de 5 mM KCl. Os demais valores variaram de $-29,59$ a $-31,98 \text{ kJ mol}^{-1}$.

3.2. Experimentos de microcalorimetria

Com o objetivo de compreender melhor os parâmetros termodinâmicos que governam a interação BSA-PPHA foi realizado a titulação calorimétrica isotérmica da solução de PPHA em uma solução de BSA.

A energia livre de Gibbs tem duas contribuições:

$$\Delta_{int}G = \Delta_{int}H - T\Delta_{int}S \quad (9)$$

Os valores de $\Delta_{int}H$ representam a variação da energia entálpica de interação liberada ou absorvida no processo de ligação entre BSA e PPHA. A magnitude da $\Delta_{int}H$ reflete a contribuição de quatro processos ³⁵:

- (i) Associação / dissociação dos íons dos grupos carregados do PPHA e do BSA ($\Delta_{int}H_i$);
- (ii) Interação BSA-PPHA ($\Delta_{int}H_{BSA-PPHA}^o$);
- (iii) Mudanças na solvatação das moléculas de PPHA e BSA ($\Delta_{ads}H_{sol}$);
- (iv) Rearranjo da estrutura molecular do PPHA e da BSA ($\Delta_{ads}H_{rear.conf.}$).

Assim, temos:

$$\Delta_{int}H = \Delta_{int}H_i + \Delta_{int}H_{BSA-PPHA}^o + \Delta_{int}H_{sol} + \Delta_{int}H_{rear.conf.} \quad (10)$$

A primeira contribuição, $\Delta_{int}H_i$ está associada com interações de íons em solução com grupos carregados das moléculas de BSA e de PPHA durante o processo de interação BSA-PPHA, sendo esta interação dos íons um processo exotérmico. A segunda contribuição, $\Delta_{int}H_{BSA-PPHA}^o$ refere-se a interação entre BSA-PPHA. Esta interação ocorre via contribuição hidrofóbica e/ou eletrostática, contribuindo para um $\Delta_{int}H$ exotérmico. A terceira contribuição, $\Delta_{int}H_{sol}$, refere-se a dessolvatação do PPHA e da BSA e este processo é endotérmico, pois para que ocorra é necessário a quebra de interações água-BSA, água-PPHA, íons-PPHA e íons-BSA. A quarta contribuição, $\Delta_{ads}H_{rear.conf.}$, está associada com a mudança conformacional do PPHA e da BSA para que ocorra a interação BSA-PPHA. A mudança conformacional é endotérmica, pois ocorre quebra de interações intramoleculares.

A energia liberada ou absorvida na forma de calor em um processo termodinâmico pode ser medido via técnicas calorimétricas. A calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

tem sido amplamente utilizada na determinação de muitos processos, devido a sua alta sensibilidade, com a possibilidade de detecção de fluxos de energia na ordem de 10^{-9} J³⁶.

A $\Delta_{\text{int}}H$ versus concentração de PPHA na presença de 1 mg mL⁻¹ de BSA em diferentes sistemas obtido por medidas ITC a 25 °C é mostrado na Figura 4.

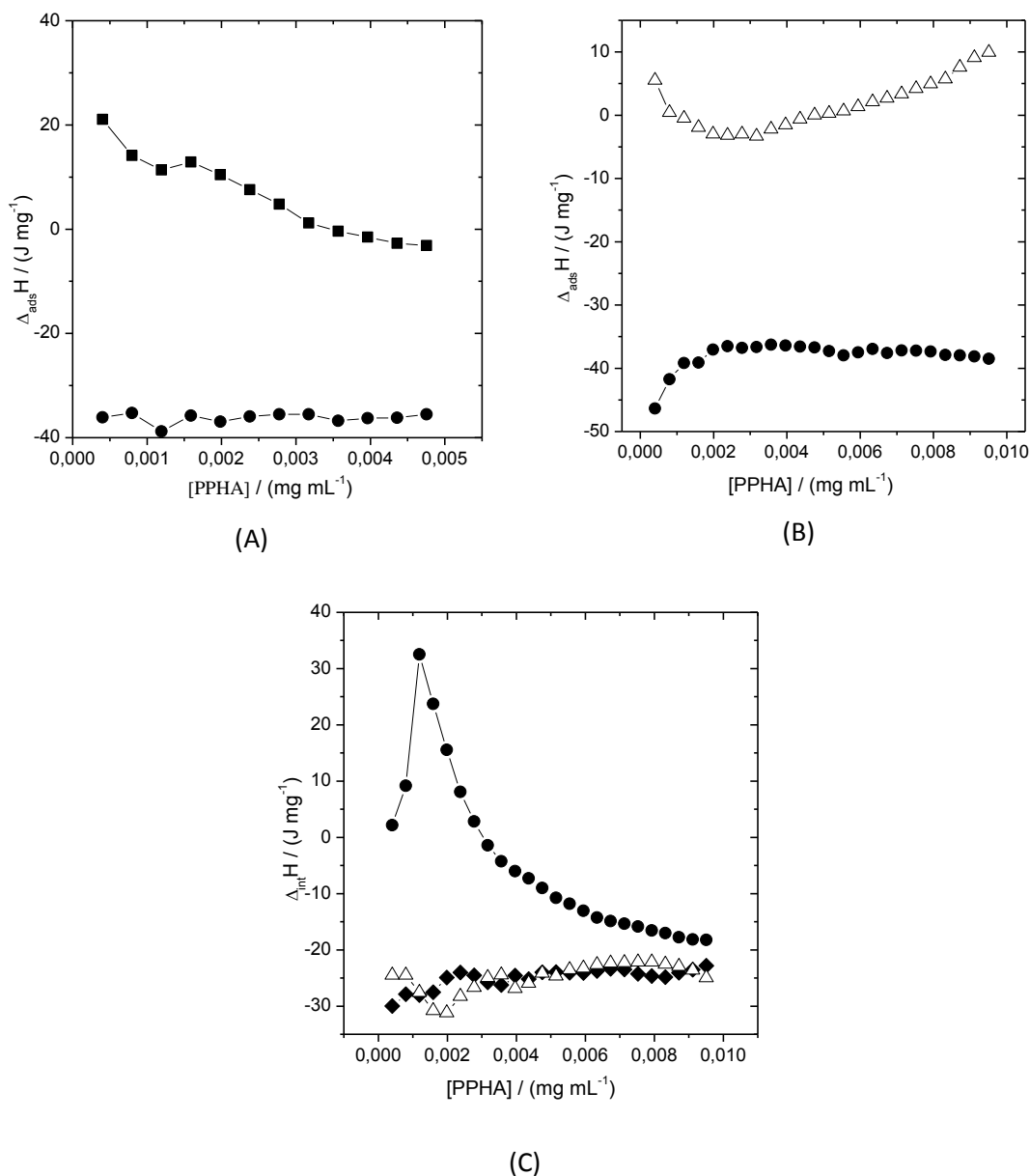


Figura 4. $\Delta_{\text{int}}H$ (J mg⁻¹) versus [PPHA] (mg mL⁻¹) do processo de interação BSA-PPHA nos tampões de acetato de sódio (A) 3,6, (B) 4,8 e (C) 5,8 em diferentes forças iônicas: (■) 0 mM de KCl; (◆) 0,5 mM de KCl; (●) 5 mM de KCl; (△) 50 mM de KCl.

Não foi possível medir a variação da entalpia nos demais sistemas, pois não houve sinal significativo de energia detectável pelo ITC.

As curvas de $\Delta_{int}H$ apresentam diferentes perfis. O processo de interação BSA-PPHA em tampão 3,6 apresenta um valor de $\Delta_{int}H$ inicialmente endotérmico e que vai se tornando exotérmico à medida que se aumenta a concentração de PPHA. Neste mesmo tampão, só que na presença de 5 mM de KCl tem-se uma curva aproximadamente constante e exotérmica ao longo da concentração de PPHA.

Já em tampão 4,8 na presença de 0,5 mM de KCl, os valores de $\Delta_{int}H$ são exotérmicos e vão se tornando menos exotérmicos até, aproximadamente, 0,002 mg mL⁻¹ de PPHA e, a partir desta concentração, o valor de $\Delta_{int}H$ torna-se praticamente constante. Na presença de 50 mM de KCl em tampão 4,8, o processo de interação BSA-PPHA é inicialmente endotérmico e apresenta um perfil exotérmico até a concentração de PPHA de 0,0025 mg mL⁻¹ e após essa concentração o perfil torna-se endotérmico, atingindo valores de $\Delta_{int}H$ positivos.

Em tampão 5,8 na presença de 0,5 mM de KCl, os valores de $\Delta_{int}H$ são exotérmicos e com a crescente concentração de PPHA tornam-se vagarosamente menos exotérmicos. Na presença de 5 mM de KCl, os primeiros valores de $\Delta_{int}H$ são endotérmicos até atingirem um valor máximo na concentração de 0,002 mg mL⁻¹ de PPHA. Após essa concentração o perfil da curva é exotérmico até atingir valores negativos de $\Delta_{int}H$. Já na presença de 50 mM de KCl, os valores de $\Delta_{int}H$ são todos exotérmicos passando por um mínimo em 0,002 mg mL⁻¹ de PPHA e tornando-se, levemente, constante a partir de 0,005 mg mL⁻¹ de PPHA.

Os valores da $\Delta_{int}H$ são o resultado das contribuições endotérmicas e exotérmicas dado pela equação (10). Assim, se o valor de $\Delta_{int}H$ é positivo, as contribuições endotérmicas ($\Delta_{ads}H_{sol}$ e $\Delta_{ads}H_{rear.conf.}$) absorvem mais energia do que àquela liberada nas contribuições exotérmicas ($\Delta_{int}H_i$ e $\Delta_{int}H_{BSA-PPHA}^0$). O inverso também é verdadeiro.

A partir dos dados calorimétricos e da energia livre de Gibbs obtida pelo modelo da equação 1 é possível determinar a contribuição entrópica do processo de interação BSA-PPHA. Para calcular a $\Delta_{\text{int}}H^{\circ}$ pela aproximação para uma diluição infinita é necessário extrapolar a curva de $\Delta_{\text{int}}H^{\circ}$ (kJ mol^{-1}) em função da concentração de PPHA. Para isso, iremos utilizar a hipotética massa molar PPHA utilizada anteriormente.

Assim, os valores de $\Delta_{\text{int}}H^{\circ}$, $T\Delta_{\text{int}}S$ e $\Delta_{\text{int}}G$ foram determinados para os sistemas que obtiveram a curva no ITC (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos da interação BSA-PPHA nos tampões de acetato de sódio e na presença de diferentes concentrações de KCl.

Sistemas	$\Delta_{\text{int}}G^{\circ}$ (kJ mol^{-1})	$\Delta_{\text{int}}H^{\circ}$ (kJ mol^{-1})	$T\Delta_{\text{int}}S^{\circ}$ (kJ mol^{-1})	R^2
Tampão 3,6	-31,98	108,0	140,0	0,9928
Tampão 3,6 em 5 mM de KCl	-30,27	-146,9	-116,7	0,9473
Tampão 4,8 em 0,5 mM de KCl	-31,09	-231,8	-200,7	0,9676
Tampão 4,8 em 50 mM de KCl	-29,59	-0,9038	28,69	0,9606
Tampão 5,8 em 0,5 mM de KCl	-30,96	-127,5	-96,54	0,9368
Tampão 5,8 em 5 mM de KCl	-26,97	-88,65	-61,69	0,9399
Tampão 5,8 em 50 mM de KCl	-31,01	-67,42	-36,41	0,8516

O coeficiente de correlação foi maior que 0,93 para os sistemas estudados, com exceção do sistema em tampão 5,8 na presença de 50 mM de KCl, cujo valor foi de 0,8516. Mas, mesmo assim, o modelo estudado mostra um ajuste aos dados. $T\Delta_{\text{int}}S$ é positivo para os sistemas em tampão 3,6 e 4,8 na presença de 50 mM de KCl, sendo que no primeiro a variação entálpica é desfavorável. Portanto, em tampão 3,6 a interação BSA-PPHA é governada pela entropia. Nos demais sistemas estudados, não há uma contribuição entrópica favorável ao processo de interação BSA-PPHA, sendo, portanto, o processo dirigido pela entalpia.

A contribuição entrópica ocorre pelo balanço de dois processos. O primeiro está associado com a mudança conformacional tanto da PPHA quanto da BSA quando interagem entre si e a subsequente possível interação eletrostática entre os íons dos eletrólitos e os grupos ionizáveis do PPHA e da BSA^{37,38}. Esta interação reduz o grau de

translação das espécies carregadas e, portanto, diminui a entropia do sistema. O segundo processo está relacionado à interação BSA-PPHA. Para que BSA interaja com PPHA, ambas as moléculas precisam ser dessolvatadas e isto libera mais moléculas para a solução, aumentando a entropia configuracional do sistema. Portanto, o balanço destes dois processos é que causa a $\Delta_{\text{int}}S$.

4. Conclusão

A interação BSA-PPHA em diferentes tampões de acetato de sódio e em diferentes concentrações de KCl foi estudada via espectroscopia de fluorescência e ITC. Os espectros de emissão demonstraram que à medida que se aumenta a concentração de PPHA há uma menor emissão na banda característica da BSA. Este fator demonstra a ocorrência da interação BSA-PPHA. Houve um efeito da força iônica do sal KCl na interação BSA-PPHA nos sistemas estudados, sendo que em tampão 5,4 o efeito foi pouquíssimo pronunciado.

Os altos valores da K_b demonstram que há uma forte interação entre BSA-PPHA, sendo que o sistema em tampão 3,6 na ausência de sal é que apresentou a maior constante de ligação.

A $\Delta_{\text{int}}G$ foi negativa e similar para todos os sistemas estudados, demonstrando a espontaneidade da ligação BSA-PPHA. E a $T\Delta_{\text{int}}S$ foi positiva para os sistemas em tampão 3,6 e 4,8 na presença de 50 mM de KCl, sendo que no primeiro a variação entálpica foi desfavorável. Nos demais sistemas estudados, não houve uma contribuição entrópica favorável ao processo de interação BSA-PPHA, sendo, portanto, o processo dirigido pela entalpia.

Em geral, é preciso maiores estudos para uma melhor elucidação da interação BSA-PPHA, pois o presente estudo não dá informações sobre a mudança conformacional e a atividade da BSA e do PPHA após a interação. Para ser capaz de responder a essa

pergunta é necessário mais informação sobre a estrutura dos complexos, a reversibilidade dos complexos e os rearranjos estruturais da molécula de proteína e do PPHA.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem as agências CNPq, FAPEMIG, CAPES (PNPD), a ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) pelo suporte financeiro.

6. Referências bibliográficas

1. Bolto, B. A., Soluble polymers in water purification. *Progress in Polymer Science* **1995**, *20* (6), 987-1041.
2. Avena, M. J.; Wilkinson, K. J., Disaggregation Kinetics of a Peat Humic Acid: Mechanism and pH Effects. *Environmental Science & Technology* **2002**, *36* (23), 5100-5105.
3. Sutton, R.; Sposito, G., Molecular structure in soil Humic Substances: the new view. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (23), 9009-9015.
4. Duval, J. F. L.; Wilkinson, K. J.; van Leeuwen, H. P.; Buffle, J., Humic Substances Are Soft and Permeable: Evidence from Their Electrophoretic Mobilities†. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (17), 6435-6445.
5. Avena, M. J.; Vermeer, A. W. P.; Koopal, L. K., Volume and structure of humic acids studied by viscometry: pH and electrolyte concentration effects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, *151* (1-2), 213-224.
6. Kam, S.-K.; Gregory, J., The interaction of humic substances with cationic polyelectrolytes. *Water Research* **2001**, *35* (15), 3557-3566.
7. Kvinnesland, T.; Odegaard, H., The effects of polymer characteristics on nano particle separation in humic substances removal by cationic polymer coagulation. *Water Science Technology* **2004**, *50* (12), 185-91.
8. Hankins, N. P.; Lu, N.; Hilal, N., Enhanced removal of heavy metal ions bound to humic acid by polyelectrolyte flocculation. *Separation and Purification Technology* **2006**, *51* (1), 48-56.
9. Hayes, M. H. B.; Edward Clapp, C. E., Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure and environmental influences. *Soil Science* **2001**, *166*, 723-737.
10. Nichols, K. A.; Wright, S. F., Comparison of glomalin and humic acid in eight native U.S. soils. *Soil Science* **2005**, *170*, 985-997.
11. Schindler, F. V.; Mercer, E. J.; Rice, J. A., Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry* **2007**, *39* (1), 320-329.

12. Brower, M.; Cashion, R.; Bonaventura, J., Functional properties of hemoglobin immobilized in coacervates prepared from gelatin-a and polyanionic carbohydrates. *Biotechnology and bioengineering* **1990**, *35* (8), 831-836.
13. Xia, J.; Mattison, K.; Romano, V.; Dubin, P. L.; Muhoberac, B. B., Complexation of trypsin and alcohol dehydrogenase with poly(diallyldimethylammonium chloride). *Biopolymers* **1997**, *41* (4), 359-365.
14. Kelleher, B. P.; Simpson, A. J., Humic substances in soils: are they really chemically distinct? *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (15), 4605-4611.
15. Tan, W. F.; Koopal, L. K.; Weng, L. P.; van Riemsdijk, W. H.; Norde, W., Humic acid protein complexation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2008**, *72* (8), 2090-2099.
16. Madliger, M.; Gasser, C. A.; Schwarzenbach, R. P.; Sander, M., Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to silica particles. Effects on transport and bioactivity. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45* (10), 4377-4384.
17. Rao, M. A.; Russo, F.; Granata, V.; Berisio, R.; Zagari, A.; Gianfreda, L., Fate of prions in soil: Interaction of a recombinant ovine prion protein with synthetic humic-like mineral complexes. *Soil Biology and Biochemistry* **2007**, *39* (2), 493-504.
18. Polano, M.; Anselmi, C.; Leita, L.; Negro, A.; De Nobili, M., Organic polyanions act as complexants of prion protein in soil. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, *367* (2), 323-329.
19. Sarkar, J. M., Formation of [14C]cellulase-humic complexes and their stability in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **1986**, *18* (3), 251-254.
20. Tan, W. F.; Koopal, L. K.; Norde, W., Interaction between Humic Acid and Lysozyme, Studied by Dynamic Light Scattering and Isothermal Titration Calorimetry. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43* (3), 591-596.
21. Tomaszewski, J. E.; Madliger, M.; Pedersen, J. A.; Schwarzenbach, R. P.; Sander, M., Adsorption of Insecticidal Cry1Ab Protein to Humic Substances. 2. Influence of Humic and Fulvic Acid Charge and Polarity Characteristics. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46* (18), 9932-9940.
22. Li, Y.; Tan, W.; Koopal, L. K.; Wang, M.; Liu, F.; Norde, W., Influence of Soil Humic and Fulvic Acid on the Activity and Stability of Lysozyme and Urease. *Environmental Science & Technology* **2013**, *47* (10), 5050-5056.
23. Zhang, H.-M.; Zhou, Q.-H.; Xue, M.-G.; Wang, Y.-Q., Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between triphenyltin and humic acids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *78* (3), 1018-1022.
24. Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H., A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* **1949**, *71* (8), 2703-2707.
25. Rahimi Yazdi, S.; Corredig, M., Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chemistry* **2012**, *132* (3), 1143-1149.
26. Ghosh, K.; Schnitzer, M., Macromolecular Structures of Humic Substances. *Soil Science* **1980**, *129* (5), 266-276.

27. Bi, S.; Pang, B.; Wang, T.; Zhao, T.; Yu, W., Investigation on the interactions of clenbuterol to bovine serum albumin and lysozyme by molecular fluorescence technique. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *120* (0), 456-461.
28. He, L.; Wang, X.; Liu, B.; Wang, J.; Sun, Y.; Gao, E.; Xu, S., Study on the interaction between promethazine hydrochloride and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Journal of Luminescence* **2011**, *131* (2), 285-290.
29. Kaboudin, B.; Moradi, K.; Faghihi, M. R.; Mohammadi, F., The fluorescence spectroscopic studies on the interaction of novel aminophosphinic acids with bovine serum albumin. *Journal of Luminescence* **2013**, *139* (0), 104-112.
30. Carter, D. C.; Ho, J. X., Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry* **1994**, *45*, 153-203.
31. De Wit, J. C. M.; Van Riemsdijk, W. H.; Nederlof, M. M.; Kinniburgh, D. G.; Koopal, L. K., Analysis of ion binding on humic substances and the determination of intrinsic affinity distributions. *Analytica Chimica Acta* **1990**, *232* (0), 189-207.
32. Newcombe, G.; Drikas, M., Adsorption of NOM onto activated carbon: electrostatic and non-electrostatic effects. *Carbon* **1997**, *35* (9), 1239-1250.
33. Li, Y.; Tan, W. F.; Wang, M. X.; Liu, F.; Weng, L. P.; Norde, W.; Koopal, L. K., Influence of lysozyme complexation with purified Aldrich humic acid on lysozyme activity. *European Journal of Soil Science* **2012**, *63* (5), 550-557.
34. Jones, K. L.; O'Melia, C. R., Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. *Journal of Membrane Science* **2000**, *165* (1), 31-46.
35. Chilom, G.; Bruns, A. S.; Rice, J. A., Aggregation of humic acid in solution: contributions of different fractions. *Organic Geochemistry* **2009**, *40* (4), 455-460.
36. Süß, D.; Cohen, Y.; Talmon, Y., The microstructure of the poly(ethylene oxide)/sodium dodecyl sulfate system studied by cryogenic-temperature transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering. *Polymer* **1995**, *36* (9), 1809-1815.
37. Giles, C. H.; Smith, D.; Huitson, A., A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *47* (3), 755-765.
38. Larsericsdotter, H.; Oscarsson, S.; Buijs, J., Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *289* (1), 26-35.

CONCLUSÃO GERAL

A interação HA com diferentes superfícies depende da natureza da superfície, do pH, da força iônica e da origem do HA. Há uma forte interação entre HA e os MWCNT, sendo o processo espontâneo para todos os sistemas estudados. Elevados valores de Γ_{\max} foram observados em todas as condições estudadas apontando a potencialidade do MWCNT como adsorvente para os HA e a obtenção de compósitos com aplicações estratégicas

Pela primeira vez, determinou-se os parâmetros termodinâmicos de adsorção de HA em MWCNTs por meio da técnica ITC. Com os valores de entalpia obtidos pelo ITC e os valores de energia livre de Gibbs obtido pelo modelo de Langmuir foi possível estudar quais são os fatores termodinâmicos que favorecem o processo de adsorção. O processo de adsorção será entálpica e/ou entropicamente favorável dependendo do sistema estudado.

As outras superfícies estudadas foram as argilas e os óxidos. Estas se encontram presentes no solo e formam agregados com o HA. As isotermas de adsorção mostraram que o mecanismo de adsorção de HA nestas superfícies dependem da natureza da superfície, da concentração do polieletrólito e do pH. O modelo que melhor se ajustou aos sistemas estudados foi o de Langmuir, com exceção da montmorinolita em pH 4.0 e 6.0 e que o processo de adsorção será entálpica e/ou entropicamente favorável dependendo do sistema.

É importante ressaltar que alguns valores de $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$ obtidos pela ITC foram altos, tais como a adsorção de LHA em MWCNTs na presença de 100 mM de NH_4Cl e 100 mM de NaSCN e a adsorção de PPHA em illita na presença de 0 e 10 mM de NaCl e em goetita na presença de 10 mM de NaCl . Estes valores de entalpia, assim como os demais, foram obtidos apenas a título de comparação entre os sistemas, pois o valor real da $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$

deve ser obtido pela massa molar média de cada ácido húmico estudado. Os valores obtidos foram calculados com uma massa molar média da literatura, o que faz necessário medirmos a massa molar média destes ácidos húmicos estudados via, por exemplo, espalhamento de raios X e refazer os cálculos. A mesma consideração deve ser feita para o estudo da interação BSA-HA. Todavia, a explicação teórica da $\Delta_{\text{ads}}\text{H}^\circ$ e da $\Delta_{\text{ads}}\text{S}^\circ$ não se modifica, o que torna a discussão realizada válida.

Além da interação do HA com superfícies, foi estudado pela primeira vez a interação do HA com uma proteína modelo, BSA. Os espectros de emissão demonstraram que há uma intensa interação BSA-PPHA, influenciada pela força iônica e pelo pH. A $\Delta_{\text{int}}\text{G}$ foi negativa e similar para todos os sistemas estudados, demonstrando a espontaneidade da ligação BSA-PPHA. E a entropia foi positiva para os sistemas em tampão 3,6 e 4,8 na presença de 50 mM de KCl, sendo que no primeiro a variação entálpica foi desfavorável. Nos demais sistemas estudados, não houve uma contribuição entrópica favorável ao processo de interação BSA-PPHA, sendo, portanto, o processo dirigido pela entalpia.

Em geral, nossos estudos contribuem para uma melhor compreensão da interação dos HA em diferentes superfícies e substâncias. Isto possibilita, futuramente, o desenvolvimento de técnicas e produtos que auxiliem na estabilização da matéria orgânica do solo, evitando a emissão de CO_2 com o manejo do solo em atividades agrícolas.

ANEXOS

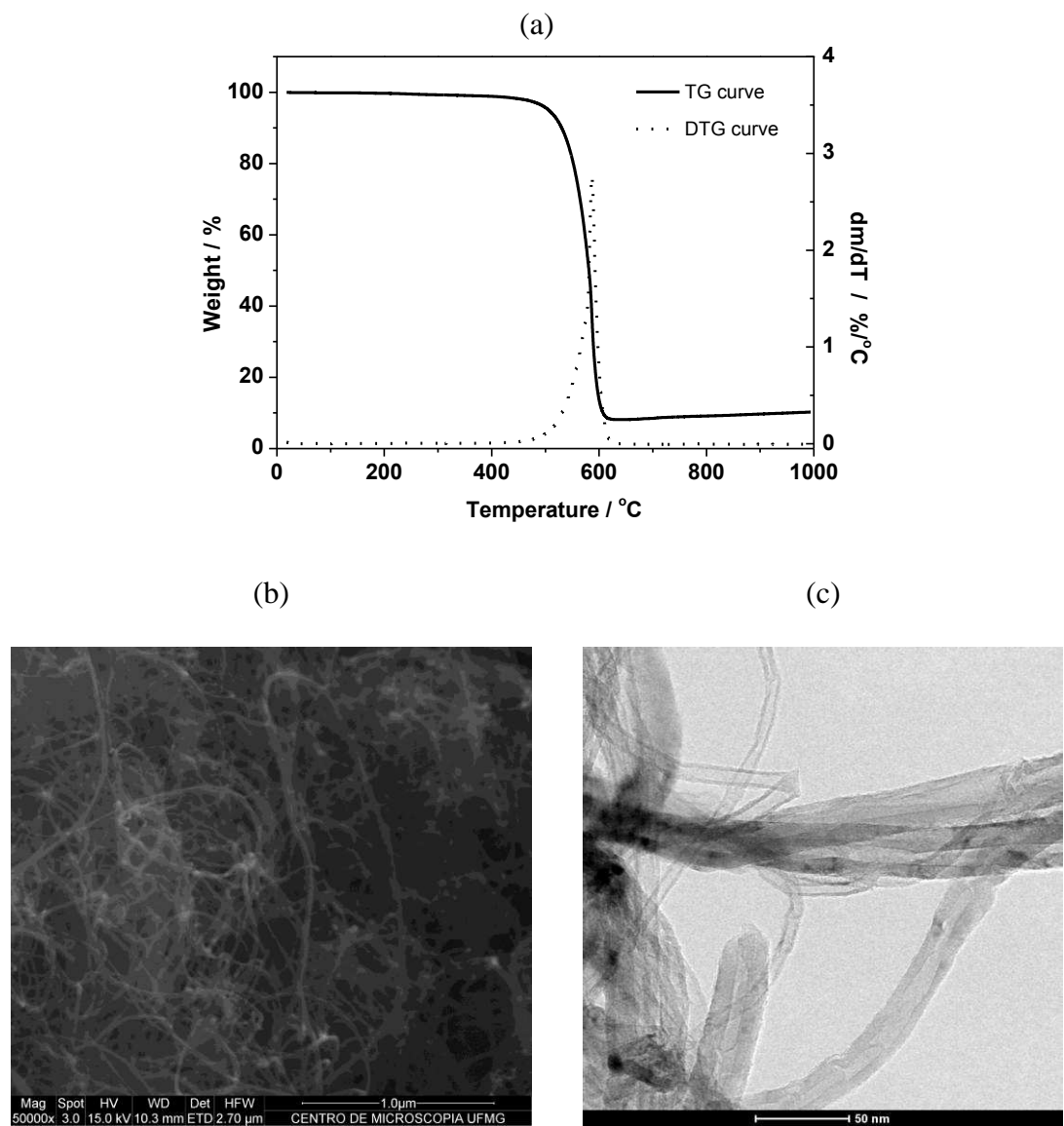


Figura 1. (a) Curvas de TG e DTG, (b) imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura e (c) imagens de transmissão eletrônica de amostras MWCNTs.

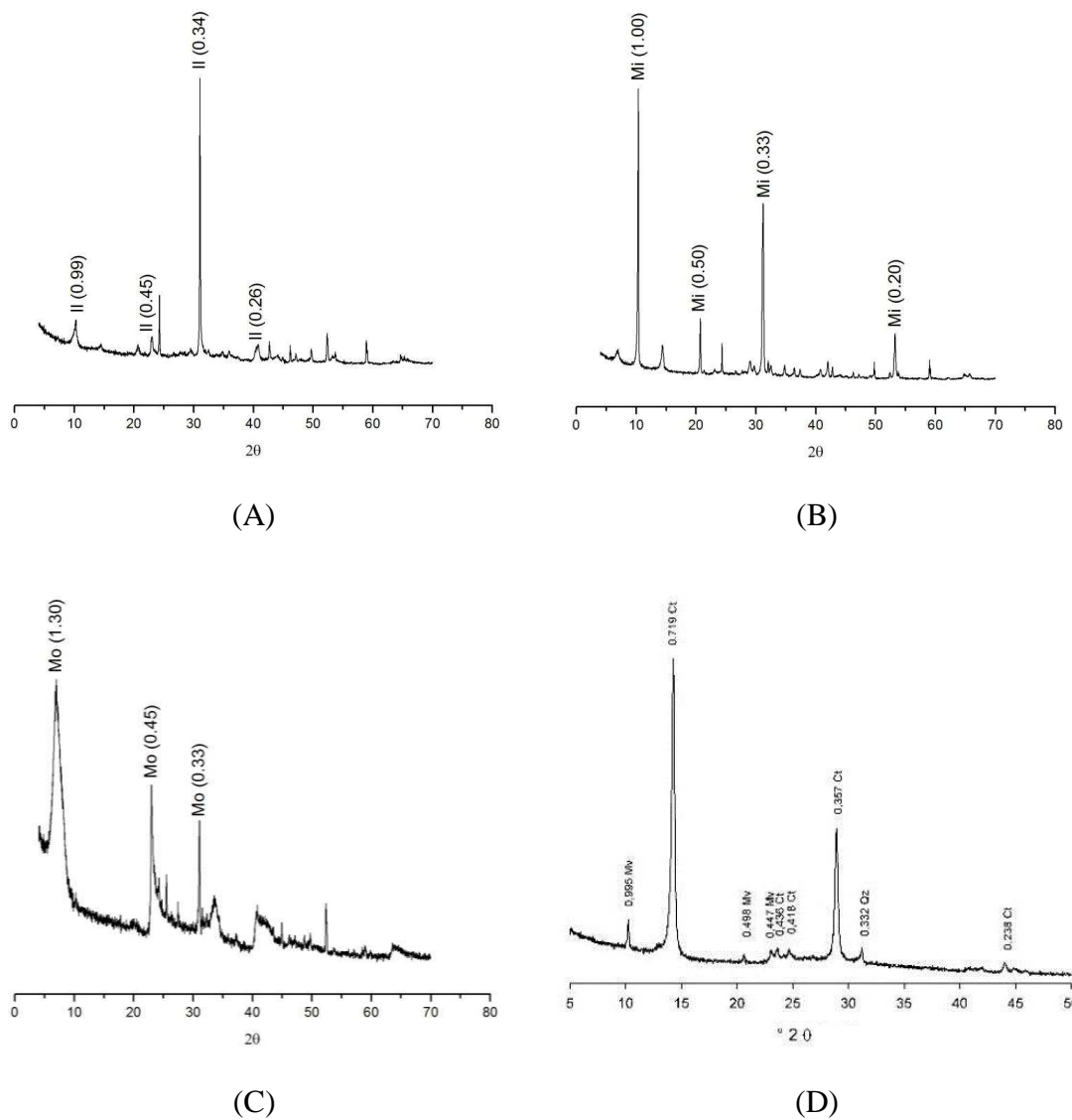


Figura 2. Difratoograma de raios X dos adsorventes argilominerais. (A) ilita ; (B) mica; (C) montmorinólita; (D) caulínita. Os picos selecionados são característicos deste mineral e entre parênteses encontram-se as distâncias interplanares (d) em nanômetros.

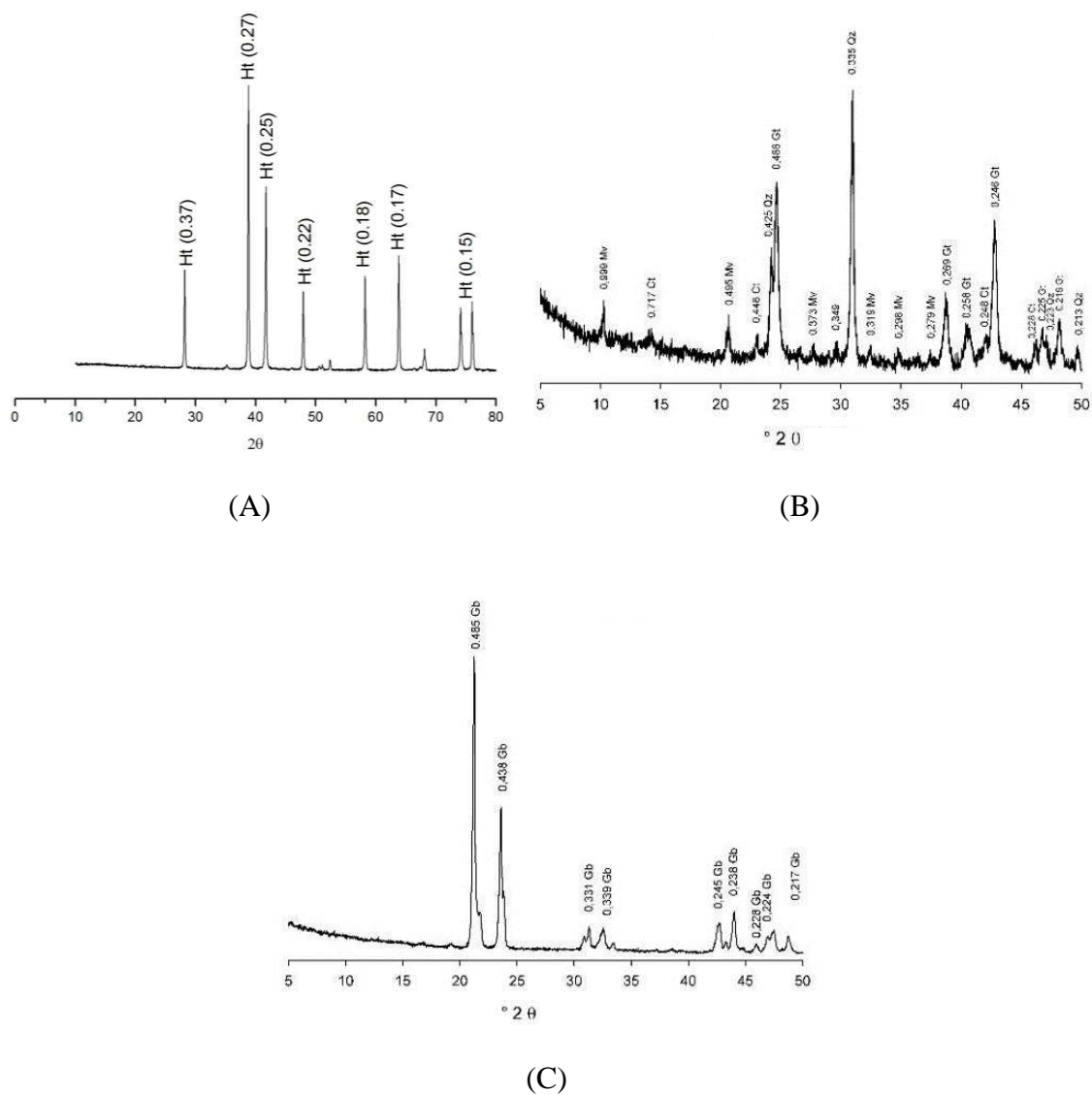


Figura 3. Difratoograma de raios X dos adsorventes óxidos. (A) hematita; (B) goethita; (C) gibbsita. Os picos selecionados são característicos deste mineral e entre parênteses encontram-se as distâncias interplanares (d) em nanômetros

Table 2. Thermodynamic parameters of adsorption of PPHA onto clays and oxides at different systems.

PPHA	Model	ΔG (kJ mol ⁻¹)	R2
pH 4.0 Illite	Langmuir	-7.586	0.9930
	Thermodynamic	-10.36	0.9389
	Freundlich	-11.00	0.9745
pH 4.0 Kaolinite	Langmuir	-9.414	0.9925
	Thermodynamic	-15.31	0.9225
	Freundlich	10.83	0.9755
pH 4.0 Mica	Langmuir	-14.23	0.9963
	Thermodynamic	-21.30	0.9531
	Freundlich	6.539	0.9741
pH 4.0 Montmorillonite	Langmuir	-22.83	0.9649
	Thermodynamic	-10.87	0.9731
	Freundlich	6491	0.8504
pH 4.0 Gibbsite	Langmuir	-13.87	0.9996
	Thermodynamic	-21.83	0.9473
	Freundlich	7.825	0.9896
pH 4.0 Hematite	Langmuir	-13.75	0.9962
	Thermodynamic	-13.87	0.9772
	Freundlich	4.079	0.8875
pH 4.0 Goethite	Langmuir	-28.30	0.9985
	Thermodynamic	-16.79	0.9774
	Freundlich	5.980	0.7711
pH 6.0 Illite	Langmuir	-5.263	0.9867
	Thermodynamic	-6.974	0.9368
	Freundlich	12.51	0.9479
pH 6.0 Kaolinite	Langmuir	-11.01	0.9951
	Thermodynamic	-13.13	0.9531
	Freundlich	-10.20	0.9579
pH 6.0 Mica	Langmuir	-9.348	0.9953
	Thermodynamic	-8.409	0.9745
	Freundlich	9.864	0.9836
pH 6.0 Montmorillonite	Langmuir	-22.83	0.9226
	Thermodynamic	-4.138	0.9982
	Freundlich	13.24	0.9766
pH 6.0 Gibbsite	Langmuir	-24.40	0.9936
	Thermodynamic	-15.79	0.7815
	Freundlich	8.374	0.9855
pH 6.0 Hematite	Langmuir	-12.24	0.9947
	Thermodynamic	-11.92	0.9852
	Freundlich	3.350	0.8946
pH 6.0 Goethite	Langmuir	-22.83	0.9894
	Thermodynamic	-6.410	0.9814
	Freundlich	9.762	0.0488
pH 4.0, Illite 1 mM NaCl	Langmuir	-8.922	0.9981
	Thermodynamic	-12.87	0.9787
	Freundlich	10.56	0.9632
pH 4.0, Kaolinite 1 mM NaCl	Langmuir	-9.096	0.9902
	Thermodynamic	-12.60	0.9871
	Freundlich	11.20	0.9893
pH 4.0, Mica 1 mM NaCl	Langmuir	-7.646	0.9881
	Thermodynamic	-6.955	0.9760
	Freundlich	8.653	0.9469

pH 4.0, Montmorillonite 1 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9965
	Thermodynamic	9.361	0.9760
	Freundlich	22,83	0.9469
pH 4.0, Illite 10 mM NaCl	Langmuir	-5.713	0.9845
	Thermodynamic	-7.034	0.9330
	Freundlich	13.03	0.7811
pH 4.0, Kaolinite 10 mM NaCl	Langmuir	-9,279	0.9992
	Thermodynamic	-5.490	0.6158
	Freundlich	13.48	0.9619
pH 4.0, Mica 10 mM NaCl	Langmuir	-10.73	0.9846
	Thermodynamic	-9.949	0.8020
	Freundlich	8.395	0.6890
pH 4.0, Montmorillonite 10 mM NaCl	Langmuir	-5.063	0.9961
	Thermodynamic	-5.484	0.9824
	Freundlich	11.50	0.8827
pH 4.0, Illite 100 mM NaCl	Langmuir	-6.200	0.9971
	Thermodynamic	-7.620	0.9912
	Freundlich	13.10	0.7840
pH 4.0, Kaolinite 100 mM NaCl	Langmuir	-10.93	0.9995
	Thermodynamic	-19.84	0.9599
	Freundlich	10.77	0.9142
pH 4.0, Mica 100 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9916
	Thermodynamic	-27.00	0.9815
	Freundlich	9.117	0.7946
pH 4.0, Montmorillonite 100 mM NaCl	Langmuir	-7.860	0.9745
	Thermodynamic	-5.476	0.3154
	Freundlich	11.93	0.9347
pH 4.0, Gibbsite 1 mM NaCl	Langmuir	-15.38	0.9914
	Thermodynamic	-13.77	0.8234
	Freundlich	7.293	0.9912
pH 4.0, Hematite 1 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9970
	Thermodynamic	-20.41	0.9469
	Freundlich	-0.4548	0.9531
pH 4.0, Goethite 1 mM NaCl	Langmuir	-22.83	0.9779
	Thermodynamic	-14.79	0.9633
	Freundlich	7.998	0.8997
pH 4.0, Gibbsite 10 mM NaCl	Langmuir	-18.36	0.9981
	Thermodynamic	-13.24	0.0073
	Freundlich	9.054	0.7060
pH 4.0, Hematite 10 mM NaCl	Langmuir	-19.45	0.9998
	Thermodynamic	-14.77	0.9675
	Freundlich	2.364	0.8306
pH 4.0, Goethite 10 mM NaCl	Langmuir	-12.30	0.9938
	Thermodynamic	-11.54	0.9542
	Freundlich	6.281	0.7705
pH 4.0, Gibbsite 100 mM NaCl	Langmuir	-16.02	0.9998
	Thermodynamic	-8.968	0.9624
	Freundlich	-7.540	0.9688
pH 4.0, Hematite 100 mM NaCl	Langmuir	-20.32	0.9933
	Thermodynamic	-15.95	0.9923
	Freundlich	-0.2274	0.9419
pH 4.0, Goethite 100 mM NaCl	Langmuir	-12.27	0.9820
	Thermodynamic	-10.56	0.9086
	Freundlich	9.608	0.8768