

ADRIANA FONSECA BRAGA

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS  
HÚMICOS DE SOLOS E DE HÚMUS

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
DEZEMBRO – 2000

ADRIANA FONSECA BRAGA

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS  
HÚMICOS DE SOLOS E DE HÚMUS

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

APROVADA: 15 de fevereiro de 2000.

---

Prof. Efraim Lázaro Reis  
(Conselheiro)

---

Prof. Carlos Roberto Bellato  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Maria Eliana L. Ribeiro de Queiroz

---

Prof<sup>a</sup> Elita Duarte Costa

---

César Reis  
(Orientador)

*A Deus.*

*Aos meus pais Sebastião e Maria Celeste.*

*Aos meus filhos queridos André, Daniel e Samuel.*

*Ao meu esposo César, com amor.*

## AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao seu Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Em especial ao professor César Reis, pela orientação, pela confiança e pela paciência, imprescindíveis no decorrer do programa.

Aos professores participantes da banca examinadora Maria Eliana Ribeiro de Queiróz, Efraim Lázaro Reis, Elita Duarte Costa e Carlos Roberto Bellato, pelas sugestões na elaboração final desta tese.

Em especial à professora Maria Eliana, pela compreensão e pelo estímulo nos contratemplos, e ao professor Efraim, pelos ensinamentos sempre disponíveis.

Aos amigos de batalha por um mesmo ideal Nilva, Cristina, Carla, Alexandre, Cherrine, Luciene, Márcia e Luzia pelo companheirismo.

A Alfredo e Adriana Barbosa, pela disponibilidade e boa vontade na ajuda dos trabalhos de laboratório.

A Deus, por ter permitido a realização deste trabalho, com seu amor e proteção a mim e à minha família em todos momentos.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, pensaram positivo para que eu concluísse esta pesquisa.

## **BIOGRAFIA**

Adriana Fonseca Braga, filha de Sebastião José de Braga e Maria Celeste Fonseca Braga, nasceu em João Monlevade, MG, em 23 de dezembro de 1967.

Em março de 1988, ingressou no Curso de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, bacharelando-se em dezembro de 1992.

Em agosto de 1996, iniciou o Programa de Mestrado em Agroquímica da UFV, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2000.

## CONTEÚDO

	Página
EXTRATO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Definições .....	5
2.2. Características analíticas do AH e do AF .....	7
2.3. Conceitos de estrutura química .....	9
2.4. Caracterização espectroscópica do ácido húmico .....	10
2.4.1. Absorção na região do visível (400-700 nm) .....	11
2.4.2. Absorção na região do infravermelho .....	12
2.5. Metodologia de extração .....	14
2.5.1. Extração de AH e o uso de N <sub>2</sub> para evitar oxidação .....	15
2.5.2. Extração de AH com solução de NaOH e solução de Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .....	16
2.5.3. Extração de AH com outros reagentes inorgânicos .....	20
2.5.4. Extração de AH com solução de KOH .....	21
2.5.5. Extração de AH com reagentes orgânicos .....	22
2.6. Planejamentos experimentais para misturas .....	25

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
3.1. Material e instrumentos utilizados .....	32
3.2. Reagentes e soluções .....	33
3.3. Preparo da amostra .....	33
3.4. Estudo da extração de AH em função da concentração dos extratores .....	33
3.4.1. Extração de AH em função da concentração de NaOH .....	34
3.4.2. Extração de AH em função da concentração de KOH .....	34
3.4.3. Extração de AH em função da concentração de Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .....	35
3.4.4. Quantificação dos ácidos húmicos extraídos .....	35
3.5. Estudo da extração de AH em função do tempo .....	36
3.5.1. Extração de AH em função do tempo com NaOH .....	36
3.5.2. Extração de AH em função do tempo com KOH e Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ....	36
3.6. Planejamento experimental para misturas .....	37
3.6.1. Extração de ácido húmico .....	38
3.6.2. Purificação do ácido húmico .....	39
3.6.3. Quantificação dos ácidos húmicos .....	39
3.7. Caracterização dos ácidos húmicos .....	40
3.7.1. Espectroscopia dos ácidos húmicos na região do visível .....	40
3.7.2. Espectroscopia dos ácidos húmicos na região do infravermelho .....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1. Processo de extração .....	41
4.2. Estudo da extração de AH em função da concentração dos extratores .....	43
4.3. Estudo da extração de AH em função do tempo .....	48
4.4. Características dos AHs extraídos pelos reagentes puros .....	53
4.4.1. Absorção na região do visível e razões E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub> .....	53
4.4.2. Absorção na região do infravermelho .....	59

	Página
4.5. Experimento com mistura .....	66
4.5.1. Interpretação dos coeficientes .....	71
4.5.1.1. Amostra de vermicomposto .....	71
4.5.1.2. Amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico .....	74
4.5.1.3. Amostra de solo franco argilo-arenoso .....	76
4.5.2. Características dos AHs extraídos por misturas otimizadas .....	77
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83

## EXTRATO

BRAGA, Adriana Fonseca, M. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2000. **Otimização de metodologias de extração de ácidos húmicos de solos e de húmus**. Orientador: César Reis. Conselheiros: Efraim Lázaro Reis e Carlos Roberto Bellato.

O estudo da extração de substâncias húmicas (SHs) de várias matrizes é de interesse para muitos pesquisadores, visto que a extração de SHs constitui etapa indispensável para o estudo de suas características e propriedades. Estas substâncias são uma classe de compostos extremamente importante na química ambiental, tendo em vista suas propriedades de conservação do solo, complexação, transporte e biodisponibilidade de metais, interações com pesticidas etc. O objetivo principal deste trabalho foi otimizar misturas de NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , com o propósito de aumentar a quantidade de ácidos húmicos (AHs) extraídos e caracterizá-los qualitativamente. No presente trabalho foram utilizadas amostras de vermicomposto, Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico e Latossolo Franco Argilo-Arenoso. Os experimentos com misturas foram feitos, utilizando-se um planejamento experimental do tipo “Simplex Centroid” (CORNELL, 1973), em que os extratores puros e as misturas binárias e ternárias destes foram acrescentados às amostras, somando um total de 10 ensaios, com

repetições. As misturas foram agitadas, em atmosfera de nitrogênio, por tempo suficiente para atingir o equilíbrio. Os ácidos húmicos extraídos foram quantificados por espectrofotometria em comprimento de onda de 465 nm. Os experimentos com misturas permitiram verificar a existência de relações não-lineares de segunda e terceira ordens entre as variáveis (extratores), empregando-se modelos polinomiais. Tais interações descreveram efeitos sinérgicos e antagônicos entre os extratores, em relação à quantidade extraída. As misturas de maior eficiência na extração foram: i) na amostra de latossolo Franco Argilo-Arenoso, todas as misturas ternárias contidas na região do Simplex, delimitada pelas proporções máxima e mínima de cada extrator, em porcentagem volume/volume (% v/v), de 55% e 25% em  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ; 60% e 15% em KOH; e 45% e 4% em NaOH. ii) Na amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico, todas as misturas contidas em uma região aproximadamente triangular, cujos vértices, que delimitam a região, são 0%, 0% e 100%; 5%, 0% e 95%; e 0%, 55% e 45% de NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , respectivamente, em proporções (% v/v). iii) Na amostra de vermicomposto, todas as misturas contidas em uma região triangular, cujos vértices são 0%, 100% e 0%; 50%, 50% e 0%; e 20%, 55% e 25% de NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , respectivamente. Os ácidos húmicos foram caracterizados por espectroscopia na região do espectro visível e de infravermelho, o que indicou haver diferenças na razão  $E_4/E_6$  e nas funções orgânicas de diferentes amostras e extratores.

## ABSTRACT

BRAGA, Adriana Fonseca, M. S., Universidade Federal de Viçosa, December, 2000. **Optimization of methodologies of extraction of soil humic acids and humus.** Adviser: César Reis. Committee members: Efraim Lázaro Reis and Carlos Roberto Bellato.

The study of the extraction of humic substances (HS) from various matrices interests many researchers, since HS extraction is a crucial step for the study of its characteristics and properties. These substances constitute an extremely important class of compounds in environmental chemistry, because of its properties of soil conservation, complex formation, transport and bioavailability of metals, pesticide interactions etc. The main objective of this work was to optimize mixtures of NaOH, KOH and Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> to increase the amount of extracted humic acids (HA) and to characterize them qualitatively. In the present work, samples of vermicompost, Humic Red-Yellow Latosol and Silty-Clay-Loam Latosol were used. The experiments with the mixtures were arranged in a Simplex Centroid (CORNELL, 1973) experimental design, where the extractors in pure state and their binary and ternary mixtures were added to the samples, totalling 10 assays, for enough time to reach equilibrium. The extracted humic acids were quantified by spectrophotometry at 465 nm

wavelength. The experiments with the mixtures showed the existence of non-linear relations of second and third order among the variables (extractors), being utilized polynomial models. Such interactions described synergetic and antagonistic effects among the extractors with relation to the amount extracted. The most efficient mixtures in the extraction were: i) in the Silty-Clay-Loam Latosol sample, all the ternary mixtures contained in the Simplex region, delimited by the maximum and minimum proportions of each extractor, in percentage volume/volume (%v/v), of 55% and 25% in  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ; 60% and 15% in KOH; and 45% and 4% in NaOH. ii) In the Humic Red-Yellow Latosol sample, all the mixtures contained in an approximately triangular region, whose vertices that delimit the region are 0%, 0% and 100%; 5%, 0% and 95%; and 0%, 55% and 45% of NaOH, KOH and  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , respectively in proportions (% v/v). iii) In the vermicompost sample, all the mixtures contained in a triangular region, whose vertices are 0%, 100% and 0%; 50%, 50% and 0%; and 20%, 55% and 25% of NaOH, KOH and  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , respectively. The humic acids were characterized by spectroscopy in the region of the visible spectrum and infrared, which indicated differences in the ratio of  $E_4/E_6$  and in the organic functions of different samples and extractors.

## 1. INTRODUÇÃO

Substâncias húmicas (SHs) são amplamente distribuídas na superfície da terra, encontradas em solos, rios, mares e depósitos geológicos. São compostos acídicos, amorfos e hidrofílicos de cor escura, variando de marrom a preta. A massa molecular dessas substâncias varia de algumas centenas até milhões de unidades atômicas (LOBARTINI et al., 1997).

Com vistas na natureza não-específica das substâncias húmicas, AIKEN (1985) descreveram as SHs como uma categoria de substâncias orgânicas heterogêneas, de ocorrência natural biogênica, que podem ser caracterizadas pela coloração variando de amarela a preta e de alta massa molecular. As definições apresentadas por STEVENSON (1994) e MacCARTHY et al. (1990) são semelhantes à de Aiken.

O estudo dessas substâncias desperta grande interesse aos pesquisadores devido às suas propriedades e ampla aplicação. Nos solos, ajuda na retenção de calor devido à sua cor escura e no controle da erosão, pela capacidade de retenção de água, e permite a aeração, pois formam com as argilas complexos argilo-húmicos porosos. Na química ambiental, as SHs são extremamente importantes pela sua capacidade de adsorção de pesticidas e complexação de metais. Resíduos de pesticidas e, ou, metais pesados retidos em SHs podem ser liberados conforme as condições ambientais e se tornam biodisponíveis, podendo

ser perigoso para o homem e o meio ambiente. Além disso, dependendo das características das SHs, podem formar complexos solúveis ou insolúveis com os metais em solos. Devido à capacidade de adsorção de pesticidas, as SHs podem ser utilizadas como filtros de resíduos de atrazina, um poluente proveniente de aplicações na agricultura e de resíduos industriais (CARDOSO et al., 1997).

A maior aplicação das SHs está na utilização como fertilizantes orgânicos, produzidos a partir de lixo urbano, lodo de esgoto e compostagem de esterco animal por minhoca (MELO et al., 1997; BERTON, 1997; SANTISTEBAN et al., 1997). Esses fertilizantes são úteis, pois aumentam a quantidade de matéria orgânica, concentração de nitrogênio, fósforo e potássio em solos pouco férteis.

Embora muitos pesquisadores tenham tentado separar as substâncias húmicas em componentes discretos, nenhuma técnica de separação conseguiu isolar uma substância húmica “pura”, mas apenas diminuir o grau de heterogeneidade da mistura. Isso é feito pelo fracionamento com base na solubilidade em diferentes meios. As metodologias mais utilizadas são aquelas em que se utilizam soluções de hidróxidos para solubilizar as substâncias húmicas. As principais frações são ácido húmico, insolúvel em solução ácida  $\text{pH} < 2$  e solúvel em maiores valores de  $\text{pH}$ , ácido fúlvico, solúvel em água e em soluções de ácidos ou bases para qualquer valor de  $\text{pH}$  e humina, insolúvel em água e em soluções de ácidos e de bases para qualquer valor de  $\text{pH}$ .

A etapa de extração é pré-requisito indispensável para os estudos das características e propriedades dessas substâncias. O método de extração e a fonte do ácido húmico são determinantes do tipo de substância extraída. Portanto, estudo de metodologia de extração é de grande importância para elucidar a natureza dessas substâncias e suas relações com o tipo de amostra.

A necessidade de encontrar extratores mais eficazes, tanto quantitativa quanto qualitativamente, levou os pesquisadores a utilizar hidróxidos alcalinos, agentes complexantes, solventes orgânicos e fluidos supercríticos na extração de substâncias húmicas.

Embora alguns pesquisadores venham utilizando misturas desses extratores (KUMADA, 1985; BUSINELLI et al., 1984; SCHNITZER e SCHUPPLI, 1989; CIAVATTA et al., 1995; SWIFT e POSNER, 1972; GIUSQUIANI et al., 1989; PICCOLO, 1990; CAMPANELLA et al., 1990), não foi encontrado nenhum trabalho na literatura consultada em que se utilizaram planejamentos experimentais para mistura visando otimizar as misturas dos extratores.

Um planejamento experimental para mistura consiste em combinar dois ou mais componentes em proporções predefinidas, em que uma ou mais respostas são obtidas (propriedades de interesse) para cada conjunto de componentes. Tais respostas dependem somente das proporções entre os componentes presentes na mistura e não da quantidade total da mistura ou da quantidade individual de cada componente na mistura (CORNELL, 1990).

É possível, através de poucos ensaios, estimar por meio de modelos matemáticos qual (is) mistura (s) otimiza (m), de alguma maneira, a extração dos AHs.

Diante dessa exposição, constituíram-se objetivos deste trabalho:

- 1) Determinar, utilizando metodologia de misturas, quais as proporções entre NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  formam misturas que extraem maior quantidade de ácido húmico das amostras de solos e vermicomposto.
- 2) Estudar o comportamento do processo de extração em toda a extensão do espaço experimental.
- 3) Verificar se há diferença nos materiais extraídos de diferentes amostras pelos diversos extratores.
- 4) Caracterizar os ácidos húmicos por métodos espectroscópicos.
- 5) Verificar as relações entre as características das amostras e os materiais extraídos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O estudo científico das substâncias húmicas vem sendo realizado há mais de 200 anos. Em 1786, Achard usou álcali para extrair de turfa um material que hoje é chamado de ácido húmico (MacCARTHY et al., 1990). É interessante notar que, hoje, os métodos mais comuns de extração de substâncias húmicas dos solos são baseados no procedimento de Achard.

Atualmente, tem crescido muito o interesse no estudo das substâncias húmicas não só por cientistas do solo, mas também por pesquisadores de outras áreas, como geoquímica orgânica e engenharia sanitária. Esse interesse é devido ao reconhecimento da importante consequência ambiental que existe em razão das substâncias húmicas nos solos ou nas águas. Enquanto a parte mineral do solo tem sido extensivamente estudada e mais bem conhecida que a fração húmus, a dificuldade no estudo das substâncias húmicas origina de sua grande complexidade, as quais não podem ser cristalizadas ou separadas em componentes puros.

Estima-se que 65 a 75% da matéria orgânica em solos predominantemente inorgânicos consiste de substâncias húmicas. Estas são substâncias orgânicas quimicamente complexas que variam em massa molecular, de umas centenas a vários milhares de unidade de massa molecular. São parcialmente aromáticas, amorfas, de coloração escura, hidrofílicas e acídicas. O restante é composto

principalmente por substâncias não-húmicas, como polissacarídeos e proteínas. Assim, as substâncias húmicas são os maiores componentes da matéria orgânica do solo (SCHNITZER, 1982).

As características importantes dessas substâncias são sua habilidade para formar complexos solúveis e precipitados insolúveis em água com íons metálicos, óxidos e hidróxidos e para interagir com minerais e ampla variedade de compostos orgânicos, incluindo alcanos, ácidos graxos, ftalatos dialquil, pesticidas, herbicidas, carboidratos, aminoácidos, peptídios e proteínas. Outra característica importante também é a formação de complexos solúveis em água pelo ácido fúlvico com metais tóxicos, que podem aumentar a concentração desses constituintes em soluções do solo e águas naturais em níveis além de suas solubilidades calculadas.

O progresso no estudo de substâncias húmicas dos solos ocorreu com o desenvolvimento de novas tecnologias para isolar substâncias húmicas aquáticas.

## **2.1. Definições**

MacCARTHY e colaboradores (1990) fizeram distinções entre os termos matéria orgânica do solo, húmus e substâncias húmicas, visando garantir uma correta comunicação no campo do estudo das substâncias húmicas.

O termo matéria orgânica do solo representa os compostos orgânicos do solo, exceto tecidos de animais e plantas não decompostos e a biomassa do solo. A matéria orgânica do solo é freqüentemente dividida em substâncias húmicas e não-húmicas. As substâncias húmicas são os componentes não-identificáveis, de alta massa molecular, de cor variando de amarela a preta, formadas por reações de síntese secundária. As substâncias não-húmicas são formadas por constituintes orgânicos, como polissacarídeos, proteínas, açúcares e aminoácidos (STEVENSON, 1994).

O termo húmus é, algumas vezes, usado como sinônimo de matéria orgânica do solo. Porém, segundo STEVENSON (1994), o húmus representa somente as substâncias húmicas. Na prática, essa distinção é um pouco complicada, visto que as substâncias não-húmicas, como carboidratos, podem

estar ligadas co-valentemente ao material húmico, apesar de poderem ser liberadas por hidrólise ou por outros meios. Contudo, geralmente um material pode ser considerado como substância húmica ainda que contenha fragmentos de componentes identificáveis (MacCARTHY et al., 1990).

AIKEN (1985) definiu substâncias húmicas como uma categoria de substâncias orgânicas heterogêneas, que ocorrem naturalmente; e biogênicas, que podem ser caracterizadas pela cor, variando de amarela a preta e de alta massa molar. Segundo aquele mesmo autor, essa é mais uma descrição do que uma definição, devido à natureza não-específica das substâncias húmicas.

Relacionado à controvérsia no conceito da natureza das SHs, heterogêneas (AIKEN, 1985) ou homogêneas (KONONOVA, 1966), LOBARTINI et al. (1997) conduziram um estudo com o propósito de elucidar a natureza das frações de diferentes massas molares, através de análise elementar, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica. Concluíram que as frações são constituídas de compostos similares com diferenças no grau de polimerização entre as frações. Isso indica que o AH tem composição mais homogênea que o anteriormente postulado.

As substâncias húmicas são resultantes da decomposição dos tecidos de plantas e animais, encontradas em todos os solos, sedimentos e águas, e consistem de uma mistura extremamente complexa de compostos orgânicos. O termo substância húmica é freqüentemente aplicado a outros materiais orgânicos de natureza não-específica. Por exemplo, extrato de lodo de esgoto, “composto” e adubo orgânico (MacCARTHY et al., 1990).

Tipos diferentes de reações podem levar à formação das SHs no solo. Existem várias teorias, sendo a maioria delas defensora de reações de condensação envolvendo polifenóis e quinonas, em que polifenóis, derivados da decomposição de lignina, ou sintetizados por microrganismos, são enzimaticamente (polifenoloxidase) oxidados a quinonas, que sofrem condensação, combinando com aminoácidos ou peptídios para formar polímeros de coloração escura, contendo nitrogênio. O número de moléculas precursoras é grande, e os caminhos do processo são indefinidos, o que explicaria a natureza heterogênea dessas substâncias no solo (STEVENSON, 1994).

Essa teoria tem o suporte da formação da melanina, que envolve reações com quinona. Além de estudos dos produtos de degradações oxidativa e redutiva de AH, em que forma componentes identificados de lignina e de microrganismos.

Embora muitos pesquisadores, durante muito tempo, tenham tentado separar as substâncias húmicas em componentes discretos, nenhuma técnica de separação conseguiu isolar uma substância húmica “pura”, mas apenas diminuir o grau de heterogeneidade da mistura. Em vista dessa dificuldade, as substâncias húmicas foram, durante muitos anos, fracionadas, com base em características de solubilidade. As frações que permaneceram até hoje são chamadas de ácido húmico, ácido fúlvico e humina, definidas como:

ÁCIDO HÚMICO (AH): fração insolúvel em água em pH < 2, mas solúvel em pH maiores.

ÁCIDO FÚLVICO (AF): fração solúvel em água em qualquer valor de pH.

HUMINA (HU): fração insolúvel em água em qualquer valor de pH.

Essas definições refletem os métodos de isolar as várias frações dos solos, e a maioria dos estudos das substâncias húmicas tem sido conduzida sobre os ácidos húmicos e fúlvicos, e com a fração humina em menor extensão, de acordo com RICE e MacCARTHY (1988). Contudo, segundo STEVENSON (1994), a fração AF é descartada na maioria dos estudos sobre matéria orgânica do solo, pois o filtrado ácido de AF, após extração e separação do AH, contém minerais dissolvidos, além de sais formados ( $\text{NaOH} + \text{HCl} \rightarrow \text{NaCl}$ ); um problema que pode ser, contudo, resolvido, passando-se o AF através de uma resina ou submetendo-o à diálise (TOWN e POWELL, 1993).

## **2.2. Características analíticas do AH e do AF**

A composição elementar e o conteúdo de grupos funcionais de um modelo de ácido húmico e de ácido fúlvico, apresentados no Quadro 1, são dados de médias de numerosas análises de AH e AF purificados e extraídos de solos de origens pedológicas diferentes.

Quadro 1 – Características analíticas do modelo de AH e AF

Elemento	AH (% m/m)	AF (%m/m)
C	56,2	45,7
H	4,7	5,4
N	3,2	2,1
S	0,8	1,9
O	35,5	44,8
Grupos funcionais	Cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	
Acidez total	706	1.130
CO <sub>2</sub> H	360	820
OH fenólico	310	310
OH alcoólico	260	500
C=O quinona, cetônica	290	270
OCH <sub>3</sub>	60	80
*E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub>	4,8	9,6

- E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>: razão entre as absorvâncias em 465 e 665 nm.

Fonte: SCHNITZER (1986).

Os valores indicaram que o modelo de AH contém  $\pm 10\%$  a mais de C e 10% a menos de O do que o modelo de AF; pouca diferença em H, N e S; o conteúdo de CO<sub>2</sub>H e acidez total do AF são maiores que do AH; ambos, AH e AF, contêm, aproximadamente, a mesma concentração de OH fenólico, C=O total e grupos OCH<sub>3</sub>, mas o AF é mais rico em grupos OH alcoólico que o AH. É através desses grupos que o material húmico reage com metais, minerais e compostos orgânicos.

A razão E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> de AF é duas vezes mais alta que o AH, o que significa que o AF tem menor massa molecular que o AH (CHEN et al., 1977). Essa medida é a razão entre as absorvâncias em 465nm e 665nm, bastante utilizada para caracterização de substâncias húmicas. A razão E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> dos AHs é menor que 5, enquanto razões maiores caracterizam os AFs (KONONOVA, 1966).

### 2.3. Conceitos de estrutura química

As principais estruturas químicas que formam o AH e o AF (Quadro 2) indicaram que os modelos de AH e AF têm estruturas químicas semelhantes, exceto que o AF contém mais estruturas fenólicas e menos estruturas benzenocarboxílicas que o AH.

Quadro 2 – Estruturas químicas dos modelos de AH e AF

<b>Estrutura Química</b>	<b>AH (% m/m)</b>	<b>AF (%m/m)</b>
Alifático	24	22,2
Fenólico	20,3	30,2
Benzenocarboxílico	32	23
Total	76,3	75,4
Aromaticidade*	69	71

Fonte: SCHNITZER (1986).

\*Aromaticidade = (fenólico + benzenocarboxílico)/(alifático + fenólico + benzenocarboxílico) x 100.

A partir das características analíticas e das estruturas químicas, pode-se dizer que 50 a 60% da massa do AH e AF constituem-se de estruturas aromáticas substituídas por grupos OH e COOH, formando os blocos de construção. Alcanos, ácidos graxos, carboidratos e compostos nitrogenados parecem estar adsorvidos nesses blocos de construção aromáticos.

Segundo FELBECK (1971), 50% da molécula de AH é constituída de aminoácidos, hexosaminas, aromáticos policíclicos e grupos funcionais contendo oxigênio. Além de estruturas alifáticas e aromáticas de um único anel, a fração desconhecida parece consistir de compostos de insaturação suficiente para causar coloração escura, característica de todos os compostos húmicos.

Os métodos físico-químicos evidenciaram que a forma e o tamanho das partículas de AH e AF são fortemente afetados pela concentração do material húmico, pelo pH e pela força iônica. Os AH e AF tendem a se agregar em

partículas maiores através da ligação de hidrogênio, e possivelmente de forças de van der Waals, quando a concentração da amostra e a força iônica são altas e o pH é baixo. Quando o pH aumenta, essas forças tornam-se mais fracas, ocorrendo dissociação dos grupos OH fenólicos e carboxílicos, os agregados então se repelem e se separam e as partículas tornam-se menores. Em soluções aquosas diluídas, entre pH 3,5 e 9,0, AH e AF são flexíveis e, em razão de os processos de agregação e dispersão ocorrerem de forma reversível, pode-se concluir que apresentam estruturas que permitem tais mudanças (SCHNITZER, 1986).

As substâncias húmicas de solos e águas, onde provavelmente a concentração de sal e do material húmico é baixa e o pH é maior que 3,0, ocorrem como polieletrólitos lineares e flexíveis. STEVENSON e SCHNITZER (1982) indicaram através de micrografia de transmissão de elétron de AH e AF, que suas soluções aquosas formam planos alongados e filamentos multiramificados de 20 a 100 nm em largura. Partículas esferóides pequenas foram também observadas de 9 a 12 nm de diâmetro, que tendem a se unir formando os “blocos de construção” das estruturas de AH e AF em cadeias e arranjos lineares.

Assim, AH e AF não são moléculas simples, como ácido benzóico ou ácido salicílico, mas associações de moléculas de origem microbiológica e de plantas mantidas juntas, principalmente, por ligações de hidrogênio.

#### **2.4. Caracterização espectroscópica do ácido húmico**

As SHs variam em composição, dependendo da origem, do método de extração e de outros parâmetros, porém são muito semelhantes em suas características químicas. Essas semelhanças é que permitem que as SHs sejam identificadas como uma classe. Os métodos mais comuns de caracterização de SHs são as determinações de grupos funcionais e elementares.

### 2.4.1. Absorção na região do visível (400-700 nm)

A pigmentação escura é uma característica essencial dos AFs e AHs e estudada através dos espectros de absorção no visível, apesar de serem pouco característicos, pois não exibem máximos ou mínimos bem definidos. Contudo, Scheffer (1954) e Welte (1955), citados por KONONOVA (1966), indicaram que os AHs podem ser caracterizados pela razão entre as absorvâncias a 465 e 665 nm, chamadas de  $E_4/E_6$ , as quais são, preferencialmente, muito utilizadas por pesquisadores da área de solo (KUMADA, 1965; KONONOVA, 1966; CHEN et al., 1977; BAES e BLOOM, 1990).

Com relação a essa característica, KUMADA (1985) e KUWASTSUKA et al. (1978) conduziram estudos em que a composição elementar e os espectros de absorção de AH e AF foram determinados e suas relações, discutidas.

A absorção óptica depende da estrutura química das substâncias húmicas e é proporcional ao conteúdo de ligações duplas conjugadas. Os espectros de AH de origem diferentes variam, o que pode estar relacionado ao grau de humificação. Humificação, segundo KUMADA (1965), é definido como a formação de substâncias escuras no solo.

KUWASTSUKA et al. (1978) realizaram um estudo das relações entre composição química elementar e graus de humificação em 39 AHs extraídos de solos diferentes.

Vários pesquisadores, na década de 50, constataram, através de estudos comparativos de AH de origens diferentes, que os AHs mais jovens têm menor densidade óptica que os AHs mais velhos, ou seja, mais maturados (maduros). Essa observação é devida à alta condensação dos aromáticos no húmus mais maduro e à predominância de cadeias laterais nos AHs mais jovens (KONONOVA, 1966).

CHEN et al. (1977), realizando um estudo dos fatores que influenciam a razão  $E_4/E_6$  em AH e AF, verificaram que a razão é, principalmente, influenciada pela massa molar da substância, do pH, da concentração de radical livre e do conteúdo de O, C,  $CO_2H$  e acidez total. Aparentemente, não se relaciona à

concentração relativa de anéis aromáticos condensados e é independente da concentração de AH e AF.

Baixa razão está associada a tamanho molecular e elevada massa molar apresentada por molécula de alto conteúdo de C e baixo conteúdo de O, CO<sub>2</sub>H e acidez total. Alta razão indica moléculas menores com menor conteúdo de C e maior de O, CO<sub>2</sub> e acidez total (CHEN et al., 1977).

De acordo com KONONOVA (1966), a razão E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> é aproximadamente 5,0 para AH extraído de solos podzólicos, 3,5 para AH de solos sob floresta, 3,0-3,5 para AH de Chernozem comuns, 4,0-4,5 para AH de Sierozem e 5,0 para AH de Krasnozem. Razões E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> para AF variam entre 6 e 8,5, dependendo também do tipo de solo extraído. Razão E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> baixa é indicativo de alto grau de condensação de anéis aromáticos, enquanto razão alta é indicativo de grandes proporções de estruturas alifáticas (KONONOVA, 1966).

Valores de  $\Delta \log K = \log K_{400} - \log K_{600}$ , que representam inclinações de curvas  $\Delta \log K$  versus  $\lambda$  (nm), são usados por pesquisadores japoneses para caracterização e distinção de vários tipos de AH, sendo K<sub>600</sub> e K<sub>400</sub> densidades ópticas a 600 e 400 nm do AH dissolvido em solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (KUWASTSUKA et al., 1978).

#### **2.4.2. Absorção na região do infravermelho**

Inúmeros pesquisadores têm utilizado a espectroscopia de infravermelho (IV) para caracterização das SHs (GRIFFITH e SCHNITZER, 1975; GIUSQUANI et al., 1994; BEDROCK et al., 1995; THENG et al., 1967; SCHNITZER e SCHUPPLI, 1989; DEIANA et al., 1990; POPPI e TALAMONI, 1992; ROSA et al., 1998). Embora a espectroscopia de infravermelho seja muito utilizada, existem algumas dúvidas quanto à sua eficiência devido à complexidade dos espectros associada a heterogeneidade, alta massa molecular e pureza das SHs (TAN, 1994).

A absorção na região do IV é devida ao aumento dos movimentos vibracionais e rotacionais dos grupos moleculares e das ligações químicas da

molécula. Basicamente existem dois tipos de vibrações fundamentais: estiramento, cujos átomos permanecem no mesmo eixo de ligação, mas a distância entre os átomos aumenta ou diminui; e deformação, em que as posições dos átomos mudam em relação ao eixo de ligação original.

Quando a radiação IV de mesma frequência a dada vibração de estiramento ou de deformação incide na amostra, a energia é absorvida e a amplitude da vibração é aumentada. A energia absorvida na frequência de ressonância é registrada como pico de absorção para aquele comprimento de onda.

A técnica é útil para investigar a estrutura química, através da identificação dos grupos funcionais (CO<sub>2</sub>H, OH fenólico e alcoólico, C=O, NH<sub>2</sub> etc.), além de estruturas moleculares (alifáticos, componentes aromáticos, peptídios e outras). Dessa maneira, essa técnica é utilizada para caracterização de SHs de origens diversas, para avaliação de reagentes extratores, modificações químicas, como metilação, acetilação e saponificação. Pode ser usada para detectar mudanças na estrutura química das SHs após oxidação e tratamentos similares, para verificar e caracterizar a formação de complexos humato-metal e humato-argila e para identificar possíveis interações de compostos orgânicos, como pesticidas e herbicidas com substâncias húmicas.

Para obter um espectro de IV, a amostra é submetida a uma radiação IV de comprimento de onda de 2,5 a 25  $\mu\text{m}$  ou número de onda de 4.000-400  $\text{cm}^{-1}$ , sendo a quantidade de luz transmitida através da amostra medida pelo espectrômetro, o qual registra a porcentagem (%) de luz transmitida a cada comprimento de onda e produz, em curto intervalo de tempo (5-20 min), uma curva de transmitância *versus* comprimento de onda ou número de onda (STEVENSON, 1994).

Um problema da aplicação da espectroscopia de IV na análise de SH é a interferência devido à umidade adsorvida, que produz bandas nas regiões 3.300-3.000  $\text{cm}^{-1}$  e 1.720-1.500  $\text{cm}^{-1}$ . Uma interferência séria ocorre pelo uso de discos de KBr, cuja umidade deve ser eliminada por vácuo a 75°C, por 30 minutos, antes de preparar a pastilha.

Os espectros de IV de AH e AF apresentam várias bandas características de absorção (Quadro 3).

Quadro 3 – Principais bandas de absorção das substâncias húmicas

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições
3.400-3.300	Estiramento OH
2.940-2.900	Estiramento C-H alifático
1.725-1.720	Estiramento C=O de COOH e cetonas
1.660-1.630	Estiramento C=O de amida e quinona
1.620-1.600	C=C aromático, H ligado C=O de cetonas conjugadas
1.590-1.517	Estiramento simétrico $\text{COO}^-$ , deformação N-H + estir. C=N
1.460-1.450	C-H alifático
1.400-1.390	Deformação OH e estir. C-O de OH fenólico, deform. C-H de grupos $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$ , estir. anti-simétrico $\text{COO}^-$
1.280-1.200	Estiramento C-O e deform. OH de COOH, estiramento C-O de aril-éter
1.170-950	Estiramento C-O de polissacarídios, impurezas Si-O de silicatos

Fonte: STEVENSON (1994).

## 2.5. Metodologia de extração

O fato de as substâncias húmicas serem uma mistura complexa de moléculas orgânicas torna seu estudo difícil, em comparação com o estudo de substâncias discretas. Não há método analítico único para sua determinação, visto que as substâncias húmicas variam conforme o material de origem e com o método de extração. Podem-se apenas ser medidas as quantidades das frações ácido húmico, ácido fúlvico e humina.

Outra dificuldade é a escassez de material-padrão para comparação de dados experimentais interlaboratoriais e validação de métodos. Para contornar

esses problemas, a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) estabeleceu um conjunto de substâncias húmicas-padrão para solo, turfa, leonardita e águas de superfície (MacCARTHY et al., 1990).

O procedimento de extração é uma etapa muito importante e indispensável para o estudo das propriedades e características das substâncias húmicas. A escolha de um reagente extrator deve ser feita, levando-se em consideração dois aspectos principais: i) ele não deve mudar as naturezas química e física das substâncias extraídas e ii) deve ser capaz de extrair quantitativamente as substâncias húmicas (TAN, 1993).

Grande número de extratores inorgânicos e orgânicos tem sido usado e avaliado quanto à eficiência da extração. Dos reagentes inorgânicos, os mais usados são NaOH 0,1 ou 0,5 mol L<sup>-1</sup>, sob a atmosfera de nitrogênio; Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, em pH 9,8 ou pH 7; e misturas de soluções aquosas de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Outros incluem soluções de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaF, Na<sub>2</sub>-EDTA, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> etc. Dentre os reagentes orgânicos estão ácido oxálico, ácido fórmico, fenol, benzeno, clorofórmio ou as misturas destes, acetilacetona, hexametilenotetramina, dodecilsulfato e uréia (Schnitzer e Khan, 1972, citados por TAN, 1993).

### **2.5.1. Extração de AH e o uso de N<sub>2</sub> para evitar oxidação**

Soluções diluídas de NaOH constituem o reagente mais extensivamente utilizado e apresenta melhores resultados em termos quantitativos, porém o seu uso deve ser conduzido sob a atmosfera de nitrogênio, desde que os AHs sofrem alterações estruturais por oxidação pelo oxigênio do ar em condições alcalinas.

Para verificar a influência da atmosfera inerte na diminuição da oxidação do material húmico, durante a extração, ROSA et al. (1998) conduziram extrações de AH em turfas na presença e na ausência de nitrogênio, em tempos diferentes de extração. Constataram haver alterações nos AHs por meio do estudo espectroscópico de infravermelho, ultravioleta e visível e que tais alterações

podem ser minimizadas pelo uso de atmosfera de N<sub>2</sub> e pela diminuição do tempo de extração.

Muito antes deste estudo, Shorey (1930) e Bremner (1950), citados por SWIFT e POSNER (1972), confirmaram que a matéria orgânica absorve oxigênio em condições alcalinas, causando efeitos no ácido húmico, como diminuição da absorvância (UV e VIS) de sua solução e redução da massa molar.

SWIFT e POSNER (1972) verificaram que o efeito da diminuição da massa molecular e da diminuição da absorção no ultravioleta e no visível dos AHs dissolvidos em NaOH era significativamente maior na presença de O<sub>2</sub> do que na presença de N<sub>2</sub>. Outras modificações ocorridas foram o aumento do conteúdo de C=O e COOH e a diminuição de C-H, verificados através do espectro de infravermelho. Na presença de O<sub>2</sub>, cerca de 61% do carbono do AH original foi convertido para AF ou CO<sub>2</sub>, além de uma conversão extensiva de material insolúvel em ácido para material solúvel em ácido.

Essas mudanças são semelhantes às observadas entre AHs extraídos por Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e NaOH (Posner et al., 1968, citados por SWIFT e POSNER, 1972). O reagente Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> extrai, portanto, material húmico mais oxidado e o NaOH menos oxidado e menos solúvel.

É razoável supor que as variações ocorridas se devem ao estado de oxidação das substâncias húmicas, que ocorrem naturalmente e podem ser reproduzidas por oxidação em condições de laboratório.

### **2.5.2. Extração de AH com solução de NaOH e solução de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>**

Diversos pesquisadores utilizaram, no estudo de AH e AF, soluções de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> ou 0,5 mol L<sup>-1</sup> para extração de AH (GRIFFITH e SCHNITZER, 1975; ZALBA et al., 1996; LOBARTINI et al., 1997; PRESTON e SCHNITZER, 1984; SCHNITZER e PRESTON, 1987; POPPI e TALAMONI, 1992; BAES e BLOOM, 1990; BEDROCK et al., 1995).

Alguns pesquisadores utilizaram a metodologia recomendada pela IHSS, que é baseada no tratamento com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente e

sob a atmosfera de N<sub>2</sub> (AMALFITANO et al., 1995; SHINOZUKA e NIHEY, 1994; GIUSQUIANI et al., 1994; MANUNZA et al., 1992).

POPPI e TALAMONI (1992) fizeram um estudo de caracterização de AH e AF, extraídos com NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> de um solo com alto teor de matéria orgânica, utilizando análise química e espectroscópica na região do infravermelho. Eles verificaram que o AF tem 16% menos átomos de carbono, 10% menos átomos de hidrogênio e 18% mais átomos de oxigênio que o AH. Esses resultados evidenciam a menor massa molar do AF em relação ao AH e maior grau de substituição por grupos ácidos (OH, COOH).

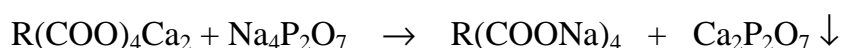
Uma comparação espectroscópica foi feita entre AH e AF de “composto” de lixo urbano e solo, em que o AH e AF foram extraídos pelo procedimento da IHSS e caracterizados por infravermelho e RMN (ressonância magnética nuclear). Desse trabalho, GIUSQUIANI et al. (1994) encontraram como principal diferença o maior conteúdo de grupos alifáticos no AH e AF do “composto” em relação a AH e AF do solo.

Efeitos causados por metilação, hidrólise com HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> e reagentes de extração de AH e AF de solo, como NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> e HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, foram avaliados por espectroscopia de RMN C-13 em trabalho de PRESTON e SCHNITZER (1984). Estes autores observaram, pela análise dos espectros de AH e AF metilados, que quase todos os grupos CO<sub>2</sub>H estão ligados a estruturas aromáticas, e os grupos OH fenólicos são grupos funcionais significantes. Há sinais de estruturas tipo benzeno-carboxílico, propostas como “blocos de construção” do material húmico e sinais de carbono substituídos em anéis aromáticos. Os espectros de AH e AF, hidrolisados em HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup>, indicaram remoção de carboidratos e aminoácidos e aumento do conteúdo de C-aromático.

Em relação ao uso de soluções de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> como reagente de extração de substâncias húmicas, há diversos estudos que o empregam, seja em uma etapa da extração, anterior ou posterior ao uso de solução de NaOH, seja em mistura com NaOH (KUMADA, 1985; BUSINELLI et al., 1984; YOSHIDA et al., 1978; CIAVATTA et al., 1995; SWIFT e POSNER, 1972).

O  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , embora não seja tão eficiente quanto o  $\text{NaOH}$ , é freqüentemente usado para extrações das substâncias húmicas de solos com alto conteúdo de sesquióxidos (KONONOVA,1966). O uso de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  geralmente elimina a necessidade de descalcificar as amostras de solo antes da extração, algumas vezes requerida quando se usa  $\text{NaOH}$ .

Soluções de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e sais de ácidos orgânicos, oxalato de sódio, citrato e tartarato formam complexos solúveis ou precipitados com  $\text{Ca}$ ,  $\text{Fe}$  e  $\text{Al}$ , os quais são substituídos pelo sódio. A reação é representada como



A solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de pH próximo de 9,0 é quase tão eficiente quanto a solução de  $\text{NaOH}$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  para extração de SHs, apesar de ocorrer absorção de oxigênio de 4 a 6% do absorvido quando se usa solução de  $\text{NaOH}$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  na ausência de nitrogênio. Na presença de  $\text{N}_2$ , porém, a auto-oxidação e a hidrólise em solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  são, grandemente, eliminadas (SCHNITZER e SCHUPPLI, 1989).

Substâncias húmicas do solo foram extraídas sob atmosfera de nitrogênio com solução de  $\text{NaOH}$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  por SCHNITZER e SCHUPPLI (1989). Eles utilizaram duas amostras de solos diferentes em características pedológicas, solo “Melfort”, classificado como chernozêmico escuro; e “bainsville”, classificado como “orthic gleysol”, cujos objetivos foram:

- i) Examinar a capacidade de extração dos reagentes.
- ii) Isolar ácido húmico (AH) de cada extrato e determinar algumas características químicas e espectroscópicas, relacionando-as aos extratores.

Esses autores concluíram, através dos espectros de infravermelho e pelo conteúdo de carbono (livre de cinzas e umidade), que o AH extraído pelos dois reagentes nos dois solos foram muito similares, indicando que substâncias semelhantes foram extraídas. Verificaram, através da razão  $E_4/E_6$ , que a solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  extrai AH (solo “bainsville”, menos argila) mais colorido e de maior massa molecular que a solução de  $\text{NaOH}$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ . Porém, razões  $E_4/E_6$  de AH (solo “melfort”, mais argila) são de magnitudes similares, indicando

que as substâncias extraídas são de tamanho e massa moleculares similares. Provavelmente, a coloração mais intensa no extrato por  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  seja proveniente da presença de complexos de matéria orgânica com metais (Schnitzer e Skinner, 1963, citados por SCHNITZER E SCHUPPLI, 1989).

Os espectros de RMN C-13 indicaram que os AHs extraídos por solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  tendem a ser mais aromáticos que os extraídos por solução de  $\text{NaOH}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , os quais foram mais alifáticos, ou seja, a aromaticidade dos AHs extraídos por solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  foi maior do que a dos AHs extraídos por solução de  $\text{NaOH}$ . A magnitude dessas diferenças é dependente do tipo de solo.

Estudo das relações entre as características das SH e a natureza do solo e o mecanismo de extração do reagente foi feito por DICK et al. (1999). As SH extraídas dos solos oxisol e molisol, cujas mineralogias são óxidos de ferro e caulinita, esmectita e caulinita, respectivamente, foram caracterizadas por análise elementar e espectroscopia de RMN. Concluíram que as SHs extraídas com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  eram mais humificadas, com maior caráter aromático e maior proporção de grupos carboxílicos, enquanto as SHs extraídas com  $\text{NaOH}$  eram mais alifáticas, com maior proporção de grupos o-alkila, indicativo de substâncias menos humificadas que as extraídas com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Constataram também maior rendimento no oxisol com  $\text{NaOH}$  e molisol com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , o que poderia estar relacionado à mineralogia dos solos e ao mecanismo de ligação das substâncias húmicas.

No solo molisol, onde predomina mineral 2:1, as SHs são preferencialmente agregadas entre elas mesmas e ligadas aos minerais de argila através de pontes catiônicas, através das quais o  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  irá complexar os cátions, solubilizando as SHs. Já no solo oxisol, as SHs são ligadas, principalmente, por pontes de hidrogênio e por complexação na superfície dos óxidos, em que o  $\text{NaOH}$ , através da ionização, solubiliza os AHs.

GIUSQUANI et al. (1989) conduziram uma extração interessante de AH em lixo urbano (antes e depois da compostagem) e em um solo “loam clay” (textura argilosa), através da solução de  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , após o tratamento

com HCl e a mistura de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> com Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Como o AH do lixo compostado tem menor conteúdo de grupos ácidos e maior valor de E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> que o AH do solo, os referidos autores relataram que o AH do lixo compostado é de menor grau de condensação e de menor massa molecular que o do solo. Os espectros de IV e RMN confirmaram a diminuição de grupos carboxílicos durante o processo de compostagem e o aumento de alifáticos.

### **2.5.3. Extração de AH com outros reagentes inorgânicos**

SCHNITZER et al. (1958) fizeram a comparação entre reagentes extratores de substâncias húmicas, alguns deles Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a pH 7, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> a pH 9,8, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e NaOH, mostrando que todos os extratores removem, essencialmente, SHs semelhantes. Isso foi verificado pelas análises das bandas e pela intensidade dos espectros de infravermelho, pelo conteúdo de carbono e pelo conteúdo de cinzas dos extratos dializados.

THENG et al. (1967) estudaram os AHs obtidos por vários métodos de extração, caracterizando-os por meio dos espectros de absorção nas regiões do ultravioleta, do visível e do infravermelho. Os AHs foram extraídos de solo vermelho-escuro por vários reagentes: a) NaOH 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; b) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5/NaHCO<sub>3</sub>; c) HCl seguido de NaOH 0,5; d) HCl/HF seguido de NaOH 0,5; e) HCl seguido de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>; f) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a pH 7; e g) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, seguido de NaOH 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. As condições de extração foram na presença e ausência de N<sub>2</sub>, à temperatura ambiente ou a 60°C.

Através dos espectros de infravermelho, observaram diferenças significativas, tanto qualitativas como quantitativas, nas intensidades de várias bandas. Os espectros no UV-VIS apresentaram diferenças apreciáveis, exceto para comprimentos de onda muito baixos e muito altos. Os AHs extraídos pelos reagentes mais brandos tiveram maior absorção a 250-290 nm, indicando maior conteúdo de carbonila. Assim, THENG et al. (1967) relataram que o AH extraído por Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> era a fração mais humificada do solo, visto que o processo de humificação vem acompanhado de aumento de grupos carboxilas e carbonilas.

Embora a solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  a pH 7 tenha pH menor que a solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  (pH  $\pm$  8,2), ela é a melhor extratora que o carbonato, posto que, além da solubilização por ionização de grupos ácidos, tem a capacidade de complexar Ca, Fe e Al, liberando AH ligado por esses cátions às partículas do solo.

O pré-tratamento com HCl é quase tão efetivo em remover cátions metálicos quanto a solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , visto que o rendimento em AH extraído pela mistura  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  após tratamento com HCl foi maior que o rendimento em AH extraído por  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  sem esse tratamento. Isso também foi observado pelo aumento de grupos carboxílicos no AH extraído com NaOH, que foi submetido a pré-tratamento com HCl ou com HCl/HF.

Os referidos autores concluíram que a eficiência da extração do AH depende do pH do reagente de extração e da capacidade do reagente de complexar cátions polivalentes.

#### **2.5.4. Extração de AH com solução de KOH**

ROCHA et al. (1998) propuseram uma metodologia alternativa não muito utilizada, cuja extração das substâncias húmicas era feita com KOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  por três horas sob atmosfera de  $\text{N}_2$ . Essa metodologia foi comparada com o procedimento usual, através de rendimento, razão  $E_4/E_6$ , teor de cinzas e composição elementar (C, H, O, N), além de espectroscopia na região do infravermelho.

Houve aumento significativo da quantidade de AH extraída pelo KOH, além de redução no tempo de extração. Essas diferenças foram maiores no solo mais humificado com maior conteúdo de material orgânico, o que indicou que as características da matriz e as propriedades das substâncias húmicas são importantes na escolha de um extrator adequado.

A omissão da etapa de pré-tratamento com HCl na metodologia usual contribuiu para aumentar a quantidade de AH, visto essa etapa ocasionar a perda

de material orgânico do solo na forma de AF de baixo MM (STEVENSON, 1994).

Os menores valores de  $E_4/E_6$  encontrados com a metodologia alternativa indicou maior nível de condensação, comparado à metodologia convencional, com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

O maior conteúdo de oxigênio das SHs extraídas pelo método convencional evidenciou oxidação durante o processo de extração. STEVENSON (1994) relatou que o uso de KOH diminui a oxidação das SH e minimiza possíveis alterações estruturais.

Quanto aos grupos funcionais, não foram encontradas, com as duas metodologias, diferenças nos espectros de infravermelho dos solos diferentes. Isso indicou que as SHs extraídas têm estruturas semelhantes entre os solos de características diferentes. A principal diferença pareceu estar associada com o conteúdo e as características de grupos oxigenados, observados pela análise elementar.

### **2.5.5. Extração de AH com reagentes orgânicos**

Com relação ao uso de solventes orgânicos como reagentes de extração, há vários estudos que os empregam: na maioria deles, os extratos são avaliados e comparados com extratos de reagentes inorgânicos (SCIACOVELLI et al., 1977; ORIOLI e CURVETTO, 1980; PICCOLO, 1988; CAMPANELLA et al., 1990; PICCOLO et al., 1990; GIUSQUIANI et al., 1989; CARTER et al., 1992).

MEHLICH (1984) propôs um método de determinação fotométrica de substâncias húmicas, em que o reagente extrator consistiu de solução de NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup>-DTPA 0,0032 mol L<sup>-1</sup>/álcool 2%. O ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), que é um poderoso complexante, ajuda na solubilização do precipitado de humato de cálcio, e o etanol “atua” na porção lipídica da matéria orgânica do solo.

PICCOLO (1988) investigou as propriedades químicas e físico-químicas de ácido húmico obtido por extração com solventes apróticos: dimetilsulfóxido

(DMSO), dimetilformamida (DMF) e acetona em mistura com HCl de um solo da classe “Dystric Histosol” e comparou os resultados com o extrato obtido de soluções de NaOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Também, verificou mudanças nas características das SHs após purificação com HF-HCl. Tais características foram examinadas por análise elementar, conteúdo de grupo funcional, conteúdo de cinzas, cromatografia de permeação em gel e espectroscopia na região do infravermelho.

As SHs obtidas com os solventes apróticos, em relação às conseguidas com as soluções inorgânicas, apresentam menor quantidade de componentes alifáticos, são mais ricas em grupos funcionais contendo oxigênio e têm menor dimensão molecular. Esse resultado indica que os solventes apróticos têm capacidade de extração seletiva para fração de substâncias húmicas, ligadas mais fracamente aos minerais silicatados, que não sofreram reações de condensação extensivas e que, provavelmente, têm a reatividade aumentada devido ao alto conteúdo de grupos funcionais acídicos. Contrariamente, soluções de NaOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> são capazes de dissolver, através de repulsão eletrostática, grandes quantidades de substâncias húmicas, com alto peso molecular, que estão fortemente ligadas aos minerais silicatados. Essa fração teria reatividade semelhante ao extrato obtido pelos solventes apróticos somente após a purificação.

Verificou-se, através dos cromatogramas de permeação em gel de amostras de AHs purificadas e não-purificadas, que o tratamento com HCl-HF modifica a estrutura molecular das SHs, favorecendo reações de condensação e o aumento do tamanho molecular, especialmente nos extratos de AH de soluções de NaOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e menos nos extratos de misturas apróticas. Além dessas, houve mudanças no conteúdo de grupos funcionais, composição elementar e absorvância dos extratos.

A razão E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> aumentou em todos os extratos após a purificação, indicando que essa característica é dependente da purificação. Valores de E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> do extrato em NaOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> são 1/3 maiores que razões dos extratos das misturas apróticas, exceto para AH extraídos com dimetilsulfóxido (DMSO). Esses resultados não concordam com os verificados nos cromatogramas, contudo

isso não pode ser atribuído simplesmente à dimensão molecular, mas também à composição química, que pode influenciar o valor de  $E_4/E_6$ .

PICCOLO et al. (1990) extraíram do mesmo solo do estudo anterior e com os mesmos reagentes substâncias húmicas, cujas diferenças foram estudadas por espectroscopia de RMN C-13.

Os AHs obtidos pelos solventes apróticos originam espectros com melhor resolução do que os AHs extraídos por NaOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Isso é devido ao fato de os AHs (solventes apróticos) apresentarem menor MM e serem menos contaminados com silicatos, resultado que concordou com o obtido por PICCOLO (1988).

A comparação dos espectros purificados e não-purificados revelou perdas de componentes alifáticos, carboidratos e aminoácidos no AH purificado.

Possivelmente, houve mudanças quimicamente induzidas nos AHs extraídos pelos solventes apróticos, visto que estes extratos, após a purificação, originaram picos de anéis aromáticos não-substituídos mais que os extratos de NaOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ .

CAMPANELLA et al. (1990) utilizaram técnica de análise termogravimétrica (ATG) e espectrometria de infravermelho para estudo de substâncias extraídas do solo “Dystric Histosol” com (a) acetona-HCl  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ ; (b) dimetilformamida (DMF-HCl)  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ ; (c) dimetilsulfóxido (DMSO-HCl)  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ , todos na razão 8:2 por volume; (d) NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  sob atmosfera de  $\text{N}_2$ ; e (e)  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7. Também, foram detectadas mudanças ocorridas no AH, após tratamento com HCl-HF para purificação. Esses autores observaram que as substâncias extraídas pelas misturas a, b e c eram semelhantes, porém em quantidades diferentes. A principal diferença entre os extratos obtidos de misturas apróticas e soluções de NaOH foi o menor conteúdo de resíduo. Por meio da ATG acoplada a infravermelho, os referidos autores verificaram que os extratos obtidos em NaOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  tinham maior complexidade molecular que os obtidos pelas misturas apróticas, afirmando a capacidade dessa técnica em diferenciar e caracterizar substâncias húmicas.

Quanto ao tratamento com a mistura HCl-HF, os extratos resultantes de a, b e c tornaram-se mais homogêneos, já que o conteúdo de grupos fenólicos e quinônicos se mantiveram após o tratamento.

Pôde-se observar, através de todos esses trabalhos, que os pesquisadores tiveram o interesse de conhecer as características das substâncias húmicas por meio de metodologias de extração, as quais se diferenciaram em termos da quantidade e qualidade das SHs extraídas. Pôde-se, também, concluir que essas características dependiam dos mecanismos dos reagentes de extração e da amostra (tipo de solo, vermicomposto ou “composto” de lixo etc.), cujos AHs a serem extraídos eram diferentes, em conteúdo elementar, conteúdo de grupos funcionais e caráter aromático ou alifático etc. Além de estarem presos, ora por ligações de hidrogênio, ora por complexação via pontes catiônicas aos minerais do solo.

## **2.6. Planejamentos experimentais para misturas**

A metodologia usada em experimentação com mistura é baseada em princípios estatísticos e foi desenvolvida nas últimas quatro décadas, iniciando-se com o trabalho de H. Scheffé, em 1958 (SCHEFFÉ, 1958). Hoje, é bastante utilizada em indústrias, pois permite encontrar a melhor proporção entre componentes que formam um produto (ligas metálicas, tintas, mistura de bolo, argamassas, fibras têxteis etc.).

CORNELL (1973) definiu mistura como formulação ou composição de determinadas substâncias. Um experimento com mistura é aquele em que dois ou mais componentes são misturados, em quaisquer proporções, cuja resposta obtida, em cada conjunto de componentes, é função somente das proporções dos componentes presentes na mistura e não da quantidade total da mistura ou da quantidade total de cada componente na mistura.

Um experimento com misturas propõe a possibilidade, por meio de superfícies de resposta, estimar as propriedades de um sistema multicomponente, a partir de um número limitado de observações. Essas observações são obtidas de

combinações pré-selecionadas dos componentes na tentativa de determinar quais delas otimizam a resposta de interesse, que é qualquer propriedade do sistema (CORNELL, 1990).

Num problema de mistura, as variáveis representam proporções, característica que distingue este experimento de um experimento fatorial, cujas variáveis são independentes (pH, concentração, temperatura etc.). As proporções de uma mistura não podem ser negativas e, se expressas como frações da mistura, devem somar uma unidade. Tais restrições causam interdependência entre os componentes ( $x_i$ ) da mistura dada pela equação (1), sendo 'q' o número de componentes.

$$\sum x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad \text{Eq. (1)}$$

Essa interdependência entre as variáveis faz com que o espaço experimental, denominado "simplex", tenha dimensão de uma unidade a menos do que o número de componentes (q) usado na formulação, ou seja, igual a (q-1).

Em misturas de dois componentes (q=2), o simplex é representado pela reta  $x_2 = 1 - x_1$ , e cada ponto dessa reta corresponde a uma mistura diferente. O espaço estudado fica restrito aos pontos da reta, Figura 1(a). Para experimentos cujas variáveis são independentes, todo o espaço dentro do quadrado pode ser estudado.

Em mistura de três componentes (q=3), a equação (2) torna-se  $x_1 + x_2 + x_3 = 1$ , a qual corresponde, geometricamente, a um triângulo equilátero, como plano diagonal contido em um cubo, Figura 1(b).

As misturas ternárias possíveis são representadas pelos pontos situados no interior do triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados, às misturas binárias, e os pontos situados dentro do triângulo correspondem às possíveis misturas dos três componentes. As respostas provenientes podem ser representadas por uma superfície acima do triângulo, que é mais facilmente analisada, fazendo-se sua projeção no plano e mostrando-se as linhas de contorno.

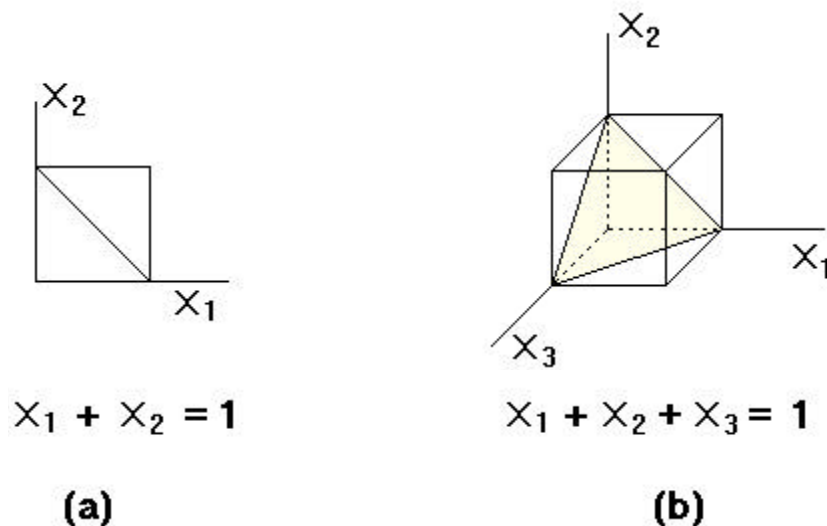


Figura 1 – Espaço experimental de dois componentes (a) e três componentes (b).

As etapas de um experimento com mistura são basicamente:

1. Postular um ou mais modelos para descrever as propriedades de interesse, em função da composição da mistura.
2. Fazer um planejamento experimental, especificando-se as composições das misturas, de acordo com o modelo proposto.
3. Ajustar o modelo aos resultados experimentais.
4. Fazer uma análise de superfície de respostas para determinar as regiões onde melhores valores de respostas podem ser obtidos.

Os planejamentos experimentais devem ter o número de pontos experimentais suficiente para obtenção da estimativa dos parâmetros do modelo escolhido, determinando-os com o mínimo de erro.

Um exemplo de planejamento que possibilita tal determinação é o “Simplex-Lattice”, ou planejamento em rede, desenvolvido por SCHEFFÉ (1958). Consiste de um arranjo simétrico de pontos, referidos como  $\{q, m\}$ , em que  $q$  é o número de componentes na mistura e  $m$  é o grau de polinômio a ser ajustado.

Por exemplo, um sistema com três componentes ( $q=3$ ), para o ajuste de um modelo cúbico ( $m=3$ ), cada componente assumirá as proporções 0, 1/3, 2/3 e 1, de acordo com a equação

$$X_i = 0, 1/m, 2/m, \dots, 1 \quad \text{Eq. (2)}$$

O total de ensaios no “Simplex-Lattice” é definido pelo número de componentes e pelo grau do polinômio, podendo ser determinados pela seguinte expressão combinatorial:

$$C_{q+m+1}^m = \frac{(q+m-1)!}{m!(q-1)!} \quad \text{Eq. (3)}$$

Assim, calcula-se que o “Simplex-Lattice” terá 10 pontos distribuídos no triângulo equilátero, Figura 2(a).

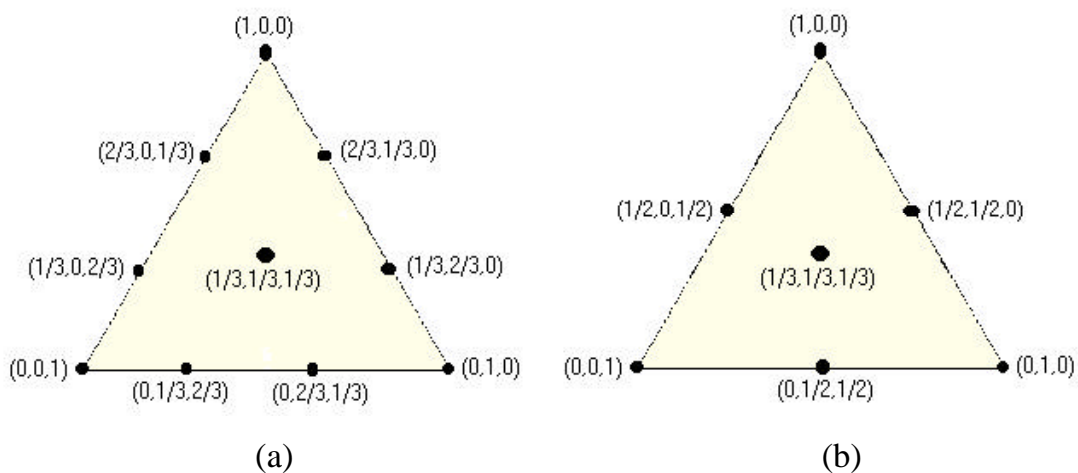


Figura 2 – Planejamentos (a) “Simplex-Lattice” e (b) “Simplex-Centroid”.

Os pontos situados no vértice do triângulo representam os componentes puros. Os pontos localizados nos lados representam as misturas binárias dos componentes, e o ponto central representa uma mistura de três componentes.

O “Simplex-Centroid” é outro planejamento que foi desenvolvido especialmente para o ajuste de um modelo chamado cúbico especial e, ainda assim, necessita de menor número de experimentos para determinação de seus parâmetros. Nesse planejamento, o número de observações é definido por  $(2^q - 1)$ , sendo formados somente por misturas em que os componentes aparecem em iguais proporções. Então, para um sistema de três componentes, o planejamento “Simplex-Centroid” necessitará de apenas sete pontos experimentais, Figura 2(b).

Os modelos matemáticos a serem ajustados aos dados experimentais fornecem as equações de regressão, cujas formas polinomiais são as seguintes

Linear

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q$$

Quadrático

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1q}x_{q-1}x_q$$

Cúbico especial

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1q}x_{q-1}x_q + b_{12\dots q}x_1x_2\dots x_q$$

Cúbico completo

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1q}x_{q-1}x_q + c_{12}x_1x_2(x_1-x_2) + c_{13}x_1x_3(x_1-x_3) + \dots + c_{q-1q}x_{q-1}x_q(x_{q-1}-x_q) + b_{12\dots q}x_1x_2\dots x_q$$

Quando os valores da resposta são obtidos dos pontos do planejamento experimental, os coeficientes “b” dos modelos podem ser estimados, utilizando-se o método dos mínimos quadrados.

O modelo mais simples é o linear ou aditivo, que fornece resultados somente dos componentes puros sobre a resposta. Quando os efeitos de misturas de dois componentes em uma resposta têm que ser avaliados, um modelo quadrático deve ser utilizado para o ajuste e explicar os dados.

A interação entre dois componentes pode ser de dois tipos, interação sinérgica ou antagonica. Quando a resposta associada à mistura de dois componentes é maior que a média das respostas associadas aos componentes puros, tem-se o efeito sinérgico ou efeito de interação positiva. Porém, se este valor for menor, tem-se o efeito de antagonismo, ou seja, a mistura dos dois componentes está contribuindo para diminuir a resposta.

Em muitas situações práticas, podem acontecer que efeitos de interação entre três componentes devam ser considerados, e assim o modelo quadrático não serve para explicar os resultados. Então, necessita-se do uso de modelos mais completos, que incluem termos cúbicos. Para isso há o modelo cúbico completo, o qual necessita de 10 pontos experimentais, para a estimativa de seus parâmetros e um modelo mais simplificado, o modelo cúbico especial, que possui um termo cúbico, muitas vezes suficiente para explicar resultados.

Planejamentos experimentais para misturas têm grande aplicação na ciência, na engenharia e, particularmente, na indústria, os quais têm o objetivo de otimizar as propriedades de uma mistura mudando a sua formulação. Por exemplo, há trabalhos em que os planejamentos são aplicados para otimizar misturas de solventes em cromatografia. HARVEY et al. (1991) otimizaram mistura de metanol, acetonitrila e tetraidrofurano como fase móvel utilizando planejamento do tipo “Simplex-Centroid”.

QIU e WALTERS (1993) utilizaram planejamento experimental do tipo “Simplex-Centroid” para otimizar misturas de solventes ( $H_3PO_4$ , metanol e acetonitrila) para separação cromatográfica de aminoácidos.

REIS e ANDRADE (1996) otimizaram fase móvel de água, acetona e metanol para separar dois pigmentos rodamina-B e rodamina 6G por cromatografia em papel.

Planejamentos combinando variáveis de misturas e variáveis de processo foram utilizados por REIS et al. (1998) para otimizar um método cinético catalítico, cuja sensibilidade foi aumentada pela otimização das misturas dos solventes: água, acetona e dimetilformamida (DMF), como meio reacional na determinação de Cr(VI).

Em trabalho realizado por EIRAS et al. (1994), a sensibilidade do método espectrofotométrico de absorção atômica, na determinação de Cu(II), foi aumentada pela otimização da mistura dos solventes água, etanol e metilissobutilcetona.

Nas metodologias para extração de ácidos húmicos, embora pesquisadores tenham utilizado misturas de extratores (KUMADA, 1985; BUSINELLI et al., 1984; SCHNITZER e SCHUPPLI, 1989; CIAVATTA et al., 1995; SWIFT e POSNER, 1972; GIUSQUIANI et al., 1989; PICCOLO et al., 1990; CAMPANELLA et al., 1990), não foi encontrado na literatura aplicação de planejamentos de mistura para otimizar tais sistemas de extratores.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material e instrumentos utilizados**

- As medidas de massa foram efetuadas em balança analítica Libror AEX – 200B, marca SHIMADZU.
- O aquecimento das amostras, ao precipitar o ácido húmico, foi feito em placa aquecedora CORNING, modelo 320.
- As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro U2000, marca HITACHI.
- As medidas de volume foram realizadas através de pipetas graduadas e volumétricas, balões e buretas.
- A centrífuga utilizada foi a Excelsa Baby, modelo 206/2, marca FANEN.
- A agitação das amostras com os reagentes de extração foi realizada por um agitador horizontal da marca TECNAL.
- A saturação do ambiente de extração com gás nitrogênio foi efetuada em balões infláveis de borracha.
- Os espectros de IV foram obtidos por espectrofotômetro de IV médio, marca PERKIN ELMER, modelo 1000.

- Os dados coletados do IV e VIS foram trabalhados no programa gráfico ORIGIN.

### **3.2. Reagentes e soluções**

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ .
- $\text{NaHCO}_3$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ .
- $\text{KOH}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  em  $\text{KCl}$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ .
- $\text{NaOH}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  em  $\text{NaCl}$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ .
- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  em  $\text{KCl}$  0,25 mol  $\text{L}^{-1}$  e  $\text{NaCl}$  0,25 mol  $\text{L}^{-1}$ .
- Mistura de  $\text{HF-HCl}$  (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{HF}$  e 0,006 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{HCl}$ ).

### **3.3. Preparo da amostra**

Foram utilizadas três amostras com características muito distintas, vermicomposto (húmus de minhoca), amostras de solo da classe Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico (solo orgânico) e solo Franco Argilo-Arenoso (solo arenoso). A amostra de vermicomposto foi passada em peneira de 2 mm, e as amostras de solos foram destorroadas e passadas em peneira de 2 mm.

### **3.4. Estudo da extração de AH em função da concentração dos extratores**

Foram construídas três curvas de extração variando as concentrações de  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , para cada amostra. O objetivo deste estudo foi determinar a concentração de  $\text{NaOH}$ , de  $\text{KOH}$  e de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  que extraía a maior quantidade de substâncias húmicas, isoladamente, para serem utilizadas posteriormente no experimento com misturas.

### **3.4.1. Extração de AH em função da concentração de NaOH**

Para extração de ácido húmico da amostra de vermicomposto com variação da concentração de NaOH, pesou-se 0,5 g da amostra, transferindo-a para frascos de vidro com capacidade para 300 mL. Foram retiradas alíquotas da solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> em NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e adicionadas nos frascos, elevando o volume para 100 mL com solução de NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, de modo que as concentrações da solução extratora se tornassem iguais a 1 x 10<sup>-3</sup>, 5 x 10<sup>-3</sup>, 1 x 10<sup>-2</sup>, 5 x 10<sup>-2</sup>, 1 x 10<sup>-1</sup>, 2 x 10<sup>-1</sup>, 4 x 10<sup>-1</sup>, 8 x 10<sup>-1</sup> e 1 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, borbulhou-se N<sub>2</sub> em cada frasco, fechando-os com balões de borracha preenchidos com N<sub>2</sub>. As misturas vermicomposto/NaOH foram colocadas em um agitador por 20 horas. Após esse tempo, centrifugaram-se as misturas a 1.600 g (FCR) por oito minutos, para separar a humina dos ácidos húmico e fúlvico. À solução contendo AH e AF, adicionou-se ácido clorídrico concentrado com pipeta de Pasteur até que o pH se tornasse próximo de 1, colocando-se a suspensão para aquecer a 70°C, aproximadamente, por 10 minutos; este último procedimento foi adaptado de KONONOVA (1966). Depois disso, as soluções foram deixadas em repouso por uma noite. No dia seguinte, centrifugaram-se as suspensões por sete minutos, separando o sobrenadante que contém o ácido fúlvico, lavando o ácido húmico com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> e centrifugando-se novamente por quatro minutos. Os ácidos húmicos obtidos foram dissolvidos em solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> e transferidos para balões volumétricos. Procedeu-se, então, às leituras de absorvância em 465 nm e 665 nm, em um espectrofotômetro Hitachi U2000.

### **3.4.2. Extração de AH em função da concentração de KOH**

Para extração de ácido húmico da amostra de vermicomposto com variação da concentração de KOH, pesou-se 0,5 g da amostra, transferindo-a para os frascos de vidro de 300 mL. Foram retiradas alíquotas da solução de KOH 1 mol L<sup>-1</sup> em solução de KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e adicionadas nos frascos,

elevando-se o volume para 100 mL com solução de KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, de modo que as concentrações da solução extratora se tornassem iguais a 5 x 10<sup>-3</sup>, 1 x 10<sup>-2</sup>, 5 x 10<sup>-2</sup>, 1 x 10<sup>-1</sup>, 2 x 10<sup>-1</sup>, 4 x 10<sup>-1</sup>, 8 x 10<sup>-1</sup> e 1 mol.L<sup>-1</sup>, em KOH. O restante do procedimento de extração foi conduzido de modo idêntico ao descrito no item 3.4.1.

### **3.4.3. Extração de AH em função da concentração de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>**

Para estudo da quantidade de AH extraída em função da concentração de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, foram retiradas alíquotas da solução de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> e KCl 0,25 mol L<sup>-1</sup>, que foram adicionadas nos frascos já contendo 0,5 g da amostra de húmus, de modo que, aumentando o volume para 100 mL com solução de NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> e KCl 0,25 mol L<sup>-1</sup>, as concentrações se tornassem iguais a 1 x 10<sup>-2</sup>, 2 x 10<sup>-2</sup>, 3 x 10<sup>-2</sup>, 4 x 10<sup>-2</sup>, 5 x 10<sup>-2</sup>, 6 x 10<sup>-2</sup>, 8 x 10<sup>-2</sup> e 1 x 10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>, em Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. O procedimento de extração foi o mesmo descrito no item 3.4.1.

As curvas de extração de AH das amostras dos solos Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico e Franco Argilo-Arenoso, em função da concentração dos extratores NaOH, KOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, foram construídas da mesma maneira que as anteriores; porém pesaram-se 5 g e 2 g desses solos, respectivamente. As massas diferentes foram devidas ao fato de o conteúdo de matéria orgânica ser maior no solo orgânico e menor no solo arenoso.

### **3.4.4. Quantificação dos ácidos húmicos extraídos**

A quantidade dos ácidos húmicos extraídos foi obtida por meio de curvas-padrão feitas com os respectivos AHs extraídos na mesma condição. Alíquotas de aproximadamente 10 mg dos ácidos húmicos extraídos de cada amostra, por cada extrator (NaOH, KOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), foram pesadas, dissolvidas em solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> e aferidas em balões volumétricos de 25 mL. A partir dessas soluções-padrão, foram feitas diluições para preparar as outras soluções

para cada curva-padrão. As leituras de absorvância dessas soluções foram feitas em 465 nm. As quantidades de AHs extraídas foram calculadas através dessas curvas, relacionadas com as quantidades das amostras utilizadas (pesadas) nas extrações.

### **3.5. Estudo da extração de AH em função do tempo**

Foram construídas três curvas de extração de AH com variação do tempo de agitação, para cada amostra. As soluções extratoras foram NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, KOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> e KCl 0,25 mol L<sup>-1</sup>. O objetivo deste estudo foi determinar o tempo mínimo necessário para se atingir o equilíbrio da extração.

#### **3.5.1. Extração de AH em função do tempo com NaOH**

Pesou-se 0,5 g de vermicomposto, que foi transferido para os frascos de vidro de 300 mL. Adicionaram-se 100 mL de solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>. A cada adição, as misturas vermicomposto/NaOH foram borbulhadas com N<sub>2</sub>, e os frascos foram tampados com balões infláveis de borracha contendo gás N<sub>2</sub> e colocados para agitar. Após 10, 30, 60 e 90 minutos e 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16 e 20 horas, esses recipientes foram retirados e centrifugados. As etapas seguintes de floculação, aquecimento, repouso, centrifugação, lavagem e dissolução do ácido húmico foram realizadas como descrito no item 3.4.1. A quantificação dos AHs extraídos foi feita através das curvas-padrão obtidas no item 3.4.4.

#### **3.5.2. Extração de AH em função do tempo com KOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>**

O procedimento executado para determinar o tempo de equilíbrio na extração de vermicomposto com solução de KOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> em

KCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi exatamente igual ao descrito no item 3.5.1. Utilizou-se o mesmo procedimento para determinação do tempo de equilíbrio em solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em NaCl  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ .

A extração de ácido húmico das amostras dos solos orgânico e arenoso, em função do tempo de extração, foi conduzida de modo idêntico ao descrito no item 3.5.1., contudo foram pesados 1 e 5 g desses solos, respectivamente.

### 3.6. Planejamento experimental para misturas

Os componentes que constituem as misturas utilizadas neste experimento foram:

**Solução 1**, NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em NaCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Solução 2**, KOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em KCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

**Solução 3**,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em NaCl  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  e KCl  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ .

As proporções entre os componentes das misturas foram dispostas em um triângulo equilátero, mostrado na Figura 3 (SCHEFFÉ, 1963), obedecendo-se, a um planejamento experimental tipo “Simplex-Centroid”. Nesse experimento, as proporções foram feitas em medidas de volume. Os pontos 1, 2 e 3 indicados nos vértices do triângulo representam os ensaios que utilizaram os componentes puros, ou seja, as soluções 1, 2 e 3, respectivamente. Os pontos 4, 5 e 6 representam as misturas obtidas em volumes iguais das soluções 1 e 2, 1 e 3 e 2 e 3, respectivamente. O ponto 7, ponto central do experimento, representa a mistura em volumes iguais das soluções 1, 2 e 3. Os pontos 8, 9 e 10 são os pontos de verificação para ajuste do modelo, obtidos da mistura das soluções 1, 2 e 3, nas proporções de 4:1:1, 1:4:1 e 1:1:4, respectivamente. As proporções entre os componentes, expressas como frações, são mostradas no Quadro 4.

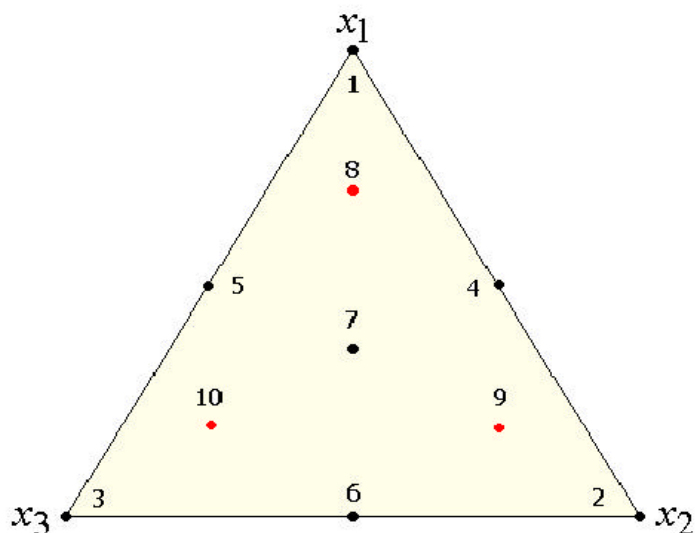


Figura 3 – Ilustração do planejamento experimental ‘Simplex Centroid’.

Quadro 4 – Planejamento experimental

Ensaio	NaOH	KOH	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3
8	2/3	1/6	1/6
9	1/6	2/3	1/6
10	1/6	1/6	2/3

### 3.6.1. Extração de ácido húmico

Pesou-se 0,5 g de vermicomposto, transferindo-o para os frascos de vidro de 300 mL, aos quais foram adicionadas as soluções extratoras, obedecendo às proporções em % volume/volume do planejamento experimental e medindo os volumes em buretas. Os ensaios foram conduzidos de forma totalmente aleatória,

numa seqüência obtida através de sorteio. Borbulhou-se gás nitrogênio às misturas vermicomposto/solução de extração, sendo cada frasco tampado com balões infláveis de borracha preenchidos com nitrogênio e colocados para agitar por 20 horas. Após a agitação, centrifugaram-se as misturas a 1.600 g (FCR) por oito minutos, descartando o resíduo de humina. Nos sobrenadantes, foram adicionados ácido clorídrico concentrado com pipeta de Paster até que o pH se aproximasse de 1, para promover a floculação do ácido húmico. Logo após a floculação, as suspensões foram aquecidas a  $\pm 70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e, depois, deixadas em repouso por uma noite. Centrifugaram-se, então, as suspensões a 1.600 g (FCR) por oito minutos, descartando o sobrenadante contendo o ácido fúlvico e obtendo, então, o ácido húmico.

A extração de ácido húmico das amostras dos solos orgânico e arenoso foi conduzida como descrito no item 3.6.1., porém foram pesados 1 e 5 g das amostras, respectivamente, sendo o tempo de extração de seis horas. As massas medidas foram diferentes devido ao conteúdo de matéria orgânica, sendo maior no solo orgânico e menor no solo arenoso.

### **3.6.2. Purificação do ácido húmico**

Aos frascos contendo os resíduos de ácido húmico foram adicionados 10 mL de solução de HF-HCl. Esses frascos foram agitados por quatro horas, centrifugados a 1.600 g (FCR) por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes, e, por último, o precipitado de ácido húmico foi lavado com água destilada. As amostras foram colocadas para secar em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ , por quatro horas.

### **3.6.3. Quantificação dos ácidos húmicos**

Uma alíquota de mais ou menos 10 mg (a medida de massa foi anotada) dos ácidos húmicos extraídos foi dissolvida em solução de  $\text{NaHCO}_3$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  e o volume, aferido em balão volumétrico de 25 mL. A partir dessa solução,

foram feitas diluições, obtendo-se concentrações variando de  $2,5 \times 10^{-4}$ ,  $2,0 \times 10^{-4}$ ,  $1,5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  e  $5 \times 10^{-5}$ . As leituras foram feitas em 465 nm e os dados obtidos, utilizados para fazer regressões lineares, obtendo-se, assim, as curvas-padrão para cada AH extraído, de cada amostra, por cada extrator (NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), puro, em misturas binárias ou em misturas ternárias. A quantidade de AH extraída em cada ensaio experimental foi calculada, utilizando-se as equações de regressão.

### **3.7. Caracterização dos ácidos húmicos**

#### **3.7.1. Espectroscopia dos ácidos húmicos na região do visível**

Foram dissolvidos cerca de 10 mg dos AHs extraídos em solução de  $\text{NaHCO}_3$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e feitas varreduras na faixa de 700 a 400 nm, utilizando-se um espectrofotômetro HITACHI U2000. Diluições foram feitas quando necessário.

#### **3.7.2. Espectroscopia dos ácidos húmicos na região do infravermelho**

Os espectros de IV dos AHs foram obtidos de pastilhas preparadas com cerca de 100 mg de KBr, pulverizado e secado a  $110^\circ\text{C}$  em mistura com cerca de 1 mg do AH secado e pulverizado em gral de ágata.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Processo de extração**

Considerando a importância e as grandes aplicações das substâncias húmicas já relatadas anteriormente, são muitos os pesquisadores interessados em seu estudo. Este deve, primeiro, passar pelo procedimento de separação da substância a ser estudada, da matriz em que se encontra. O processo de extração não é simples devido à natureza complexa dessas substâncias que ainda estão sendo exploradas.

Neste trabalho, foi feito o estudo de otimização de metodologia para extração do ácido húmico de amostras de solos e de vermicomposto. A otimização foi feita por meio de planejamentos experimentais para misturas que permitem obter modelos matemáticos, os quais dão previsão do comportamento do sistema de extração para quaisquer proporções entre os extratores, de maneira menos trabalhosa, consumindo menos tempo e, ainda, com a confiança de testes estatísticos.

A primeira etapa executada foi a de extração, a qual se baseia na solubilidade das SHs em soluções aquosas com diferentes valores de pH. Quando os reagentes puros NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  ou misturas deles foram adicionados

às amostras, usou-se uma atmosfera de nitrogênio para evitar oxidação das SHs que ocorre em soluções com pH elevado na presença de O<sub>2</sub>.

A solubilização das SHs em meio alcalino ocorre pela ionização dos grupos ácidos, presentes principalmente como grupos carboxílicos e fenólicos, rompendo ligações de hidrogênio entre as hidroxilas destes grupos e moléculas de água adsorvida na superfície da argila. Isso causa a expansão da macromolécula húmica, tornando-as solúveis na forma de humatos e fulvatos de sódio (SCHNITZER, 1986).

A etapa de centrifugação é feita para separar a fase líquida contendo o humato e o fulvato. A fração húmica e os minerais do solo, insolúveis em solução aquosa em qualquer valor de pH, são descartadas.

No início do trabalho no laboratório, o sobrenadante não se tornava límpido, após a centrifugação por causa da presença de argila dispersa, principalmente nas amostras de solo. Para contornar esse problema, foi aumentada a força iônica do meio, proporcionando melhor floculação da argila. Assim, foi possível boa separação da fase líquida pela adição de solução de NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> no extrator NaOH, de solução de KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> no extrator KOH e de solução NaCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> e KCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> no extrator Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

A adição dos sais NaCl ou KCl torna a vizinhança do mineral silicatado carregado positivamente, dispersando a argila até certo ponto. Com o aumento da concentração dos sais ocorria a retirada da água, que dispersava a argila, e a dupla camada elétrica era comprimida, o que promovia a floculação da argila.

Os AHs precipitam em solução aquosa em pH < 2; dessa maneira, foi adicionado HCl concentrado gota a gota até que se iniciasse a floculação. A precipitação dos AHs ocorre pelo processo inverso da solubilização, ou seja, os grupos ácidos são protonados, formando os agregados pela expulsão da água de solvatação. Nessa etapa de floculação foi feito um aquecimento a 60°C por, aproximadamente, 10 minutos, para promover a coagulação das partículas. O aquecimento promove decréscimo no número de íons adsorvidos fazendo reduzir a espessura da dupla camada elétrica, permitindo maior interação entre as partículas e, conseqüentemente, sua floculação (SKOOG et al., 1991).

Após repouso por uma noite, o ácido húmico flocculado foi separado por centrifugação e purificado.

A purificação foi necessária, pois os AHs obtidos se encontravam contaminados com sais, argilas oxídicas e argilas silicatadas, os quais interferem nas análises subseqüentes. Para eliminar esses contaminantes inorgânicos, foi utilizada solução de HF/HCl (0,1/0,006 mol L<sup>-1</sup>), lavando-se no final o ácido húmico com água deionizada. Esse procedimento tem sido freqüentemente utilizado por vários pesquisadores, com a obtenção de resultados satisfatórios, ou seja, AH com teor de cinzas da ordem de 3% m/m (ROCHA et al., 1998).

O ácido fluorídrico (HF) é eficiente para purificação, pois dissolve minerais de argila silicatadas e forma complexos solúveis com cátions di e trivalentes.

A remoção de impurezas orgânicas como proteínas e carboidratos não é muito fácil, pois essas moléculas podem estar ligadas co-valentemente aos AHs (STEVENSON, 1994).

Um esquema em fluxograma do processo de extração com NaOH é mostrado na Figura 4.

#### **4.2. Estudo da extração de AH em função da concentração dos extratores**

Neste experimento, o tempo de extração foi mantido constante em 20 horas, o que garantiu que todos os pontos da curva fossem obtidos com o sistema no equilíbrio.

As reações que ocorrem entre a fase sólida e os extratores dependem, dentre outros fatores, das concentrações desses extratores. O aumento da concentração do extrator provoca deslocamento no equilíbrio da reação, contudo chega a determinadas concentrações em que o sistema atinge uma espécie de saturação dos sítios ácidos da matéria orgânica, não elevando mais a quantidade extraída com o aumento da concentração do extrator, o que caracteriza a capacidade máxima de extração. Atingir a capacidade máxima de extração significa chegar a um ponto em que maiores concentrações do extrator não solubilizam mais AHs, pois a superfície da matriz se encontra “bloqueada” para a

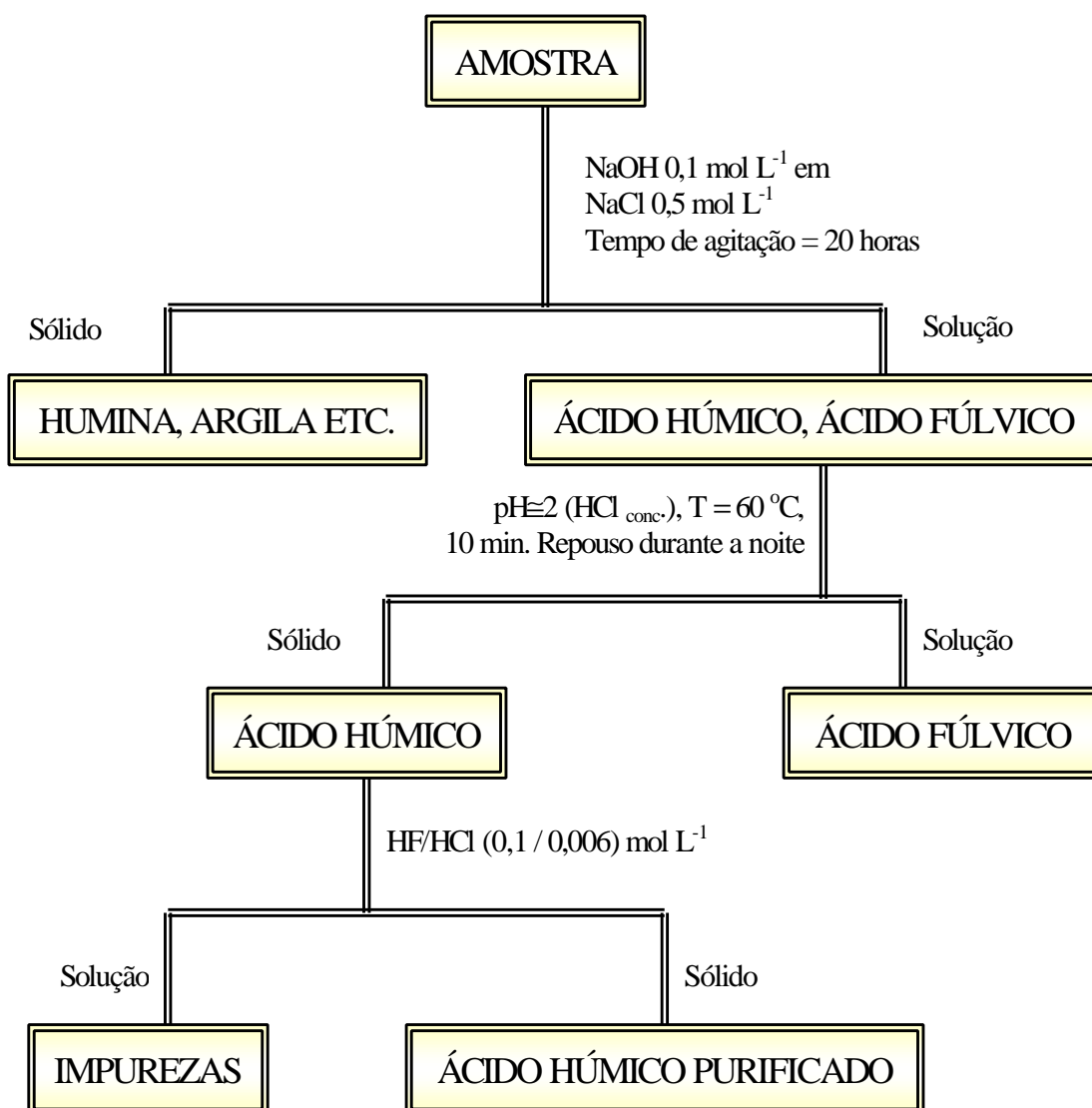


Figura 4 – Fluxograma do processo de extração. O procedimento utilizando outros extratores é o mesmo.

entrada de solvente (extrator), visto que a reação se dá entre uma fase líquida e uma fase sólida. A quantidade de AH extraída em cada amostra é diferente, devido ao fato de o processo de extração depender da natureza da matriz, ou seja, das interações entre o AH e a amostra. Esse comportamento, quantidade extraída *versus* concentração do extrator, pode ser descrito por uma função hiperbólica, que, por método gráfico ou algébrico, estima o valor mínimo de concentração que extrai maior quantidade de ácido húmico.

A concentração mínima encontrada para máxima extração de AH na amostra de húmus com solução de NaOH foi de aproximadamente  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , Figura 5(a). Isso significa que, a partir dessa concentração até  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , praticamente não houve aumento na quantidade extraída. Contudo, a concentração usada no experimento com misturas foi de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , seguindo-se a metodologia sugerida pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), visto que, pela análise da Figura 5(a), o uso dessa concentração não implica grande diferença na quantidade de AH extraída. Além disso, os resultados poderão ser comparados aos resultados da metodologia sugerida pela IHSS. O mesmo comportamento foi observado na amostra de Latossolo Húmico, Figura 5(b).

Para amostra de latossolo de textura arenosa, a capacidade máxima de extração foi atingida para concentração mínima de NaOH de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Isso se deveu ao fato de esse solo possuir menor quantidade de matéria orgânica, fazendo com que a saturação dos sítios ácidos na matéria orgânica fosse atingida em menores concentrações de NaOH, Figura 5(c).

A curva de extração com variação da concentração de KOH indicou que a máxima extração foi atingida a partir da concentração de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  do extrator, em todas as amostras, Figura 6(a, b e c). Entretanto, estabeleceu-se a concentração de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , proposta como metodologia alternativa por ROCHA et al. (1998), pois, de acordo esses autores, tal modificação proporciona melhor rendimento e menor tempo de extração em relação à metodologia convencional que utiliza NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Assim, no experimento com mistura estará presente o ensaio referente à metodologia proposta anteriormente, a qual será avaliada no planejamento, juntamente com outros ensaios.

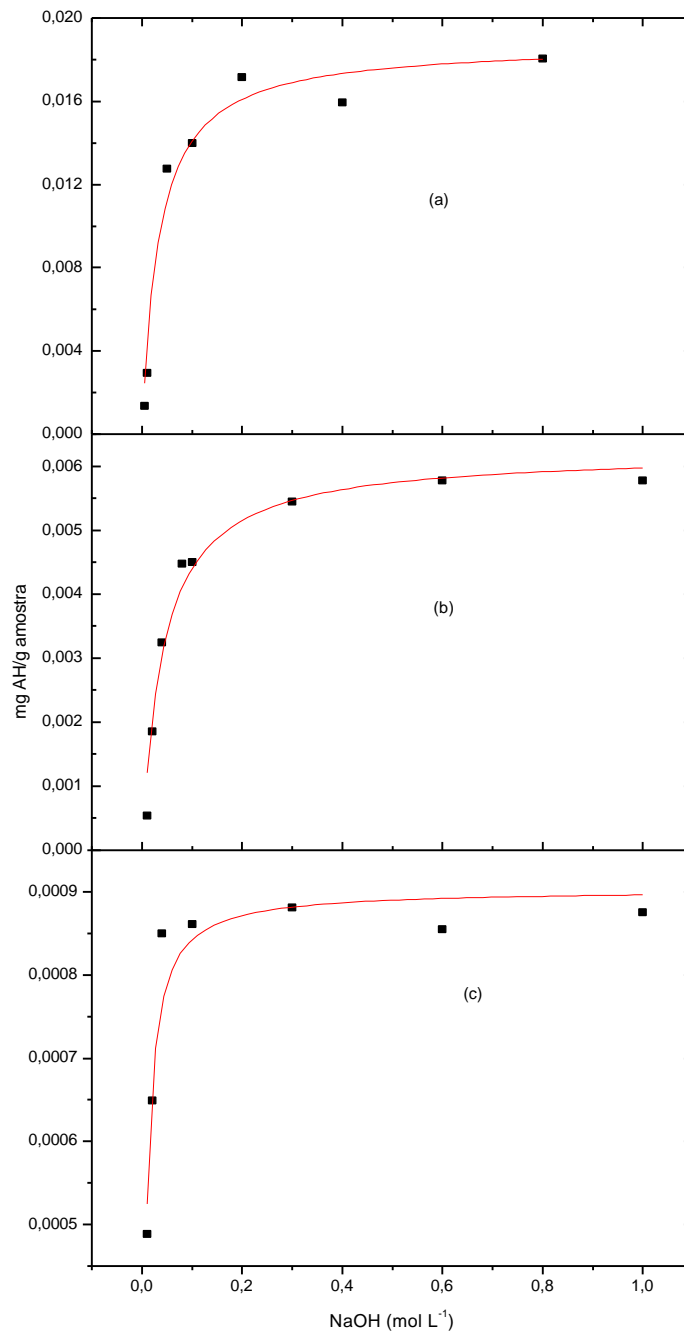


Figura 5 – Extração de AH de diferentes matrizes em função da concentração de NaOH: (a) húmus, (b) solo orgânico e (c) solo arenoso.

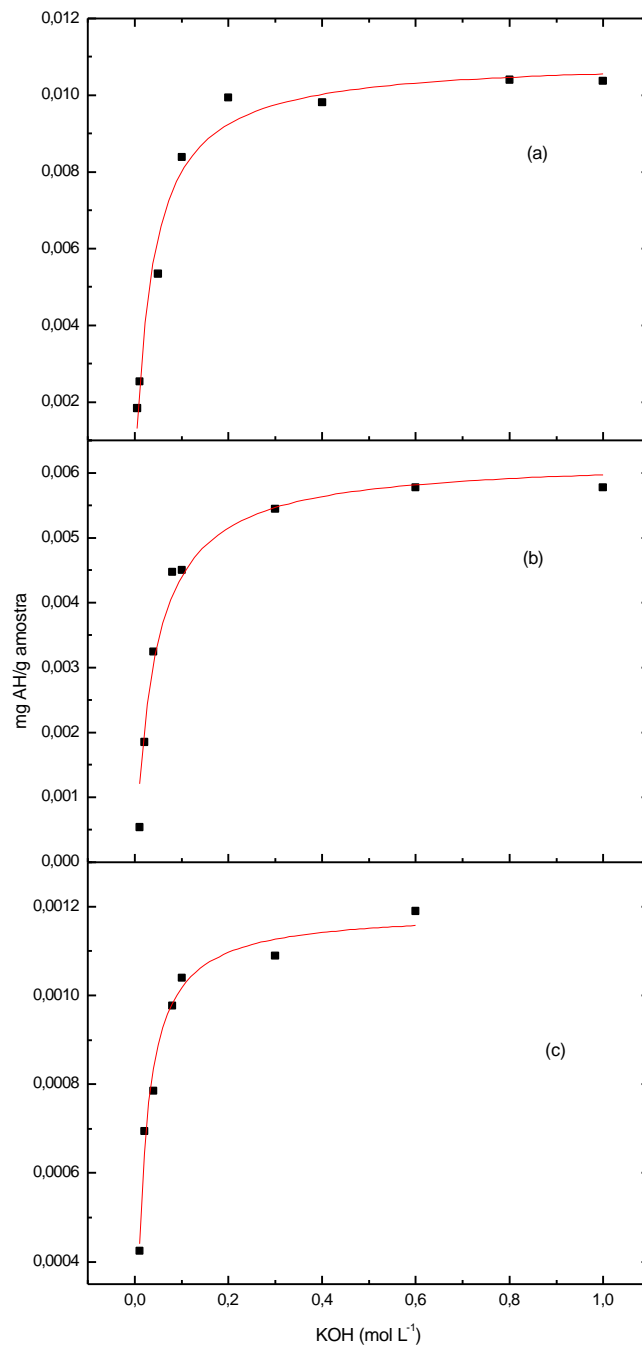


Figura 6 – Extração de AH de diferentes matrizes em função da concentração de KOH: (a) húmus, (b) solo orgânico e (c) solo arenoso.

As curvas referentes à extração com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , Figura 6(a, b e c) diferem um pouco das curvas referentes ao uso de NaOH e KOH, visto que o modelo hiperbólico não se ajustou tão bem aos dados. Com relação ao comportamento da extração com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , Figura 7(a, b e c), pode-se pensar que a concentração máxima de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  utilizada não tenha sido suficiente para atingir a capacidade de extração máxima; contudo, o sal  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , a concentrações maiores, não se solubiliza facilmente. Nesse caso, considerou-se que a concentração referente à máxima extração foi de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 4.3. Estudo da extração de AH em função do tempo

No estudo do tempo de extração, as concentrações dos extratores utilizados foram mantidas constantes nos valores obtidos no item 4.2. A quantidade extraída varia com o tempo, obedecendo-se a uma função hiperbólica. O objetivo deste estudo foi estimar o tempo gasto para o sistema atingir o equilíbrio e observar diferenças no comportamento cinético dos vários sistemas estudados.

Na amostra de vermicomposto, as curvas obtidas por extração com NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , KOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  demonstraram que a quantidade máxima de AH foi extraída no tempo mínimo de 20 horas (1.200 minutos) de extração, Figura 8(a, b e c). Isso significa que o tempo necessário para que o equilíbrio entre fase sólida e solução seja estabelecido, nas concentrações especificadas dos extratores, foi de 20 horas.

As curvas referentes às amostras de solo orgânico e solo arenoso indicaram que o tempo mínimo necessário para atingir o equilíbrio foi de seis horas, nos três extratores, Figuras 9 e 10(a, b e c).

Como pode ser observado pelas inclinações iniciais das curvas de extração, o tempo para que fosse atingido o equilíbrio para amostra de vermicomposto (Figura 8) foi maior do que nas amostras de solos (Figuras 9 e 10), visto que a primeira é constituída, basicamente, de SHs enquanto nos solos há menor quantidade de AH, já que é constituído de substâncias húmicas e não-húmicas.

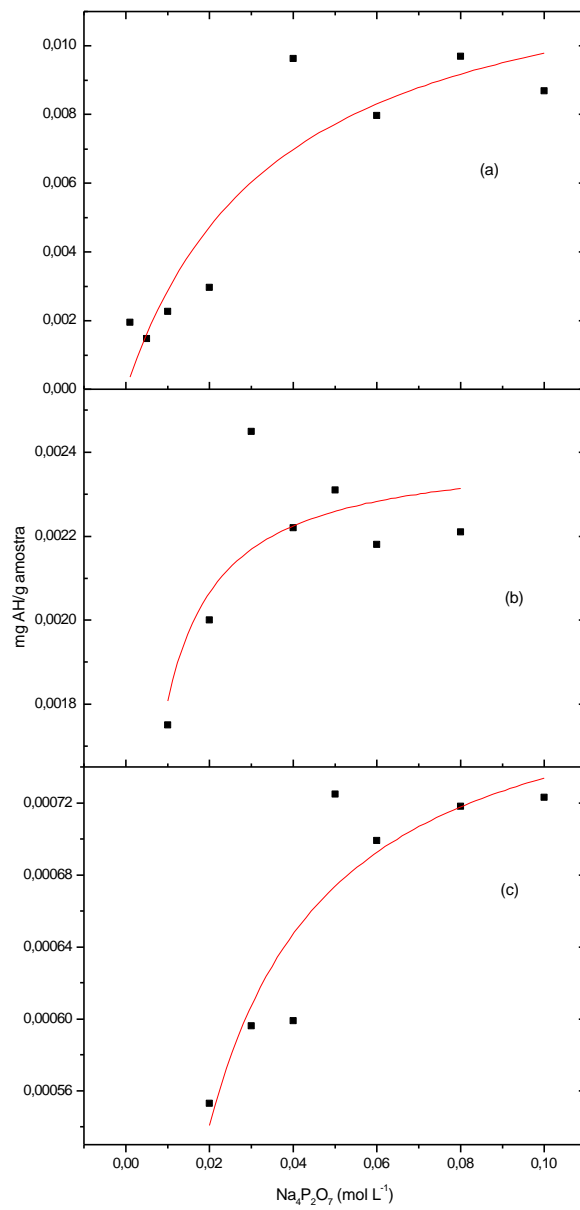


Figura 7 – Extração de AH de diferentes matrizes em função da concentração de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ : (a) húmus, (b) solo orgânico e (c) solo arenoso.

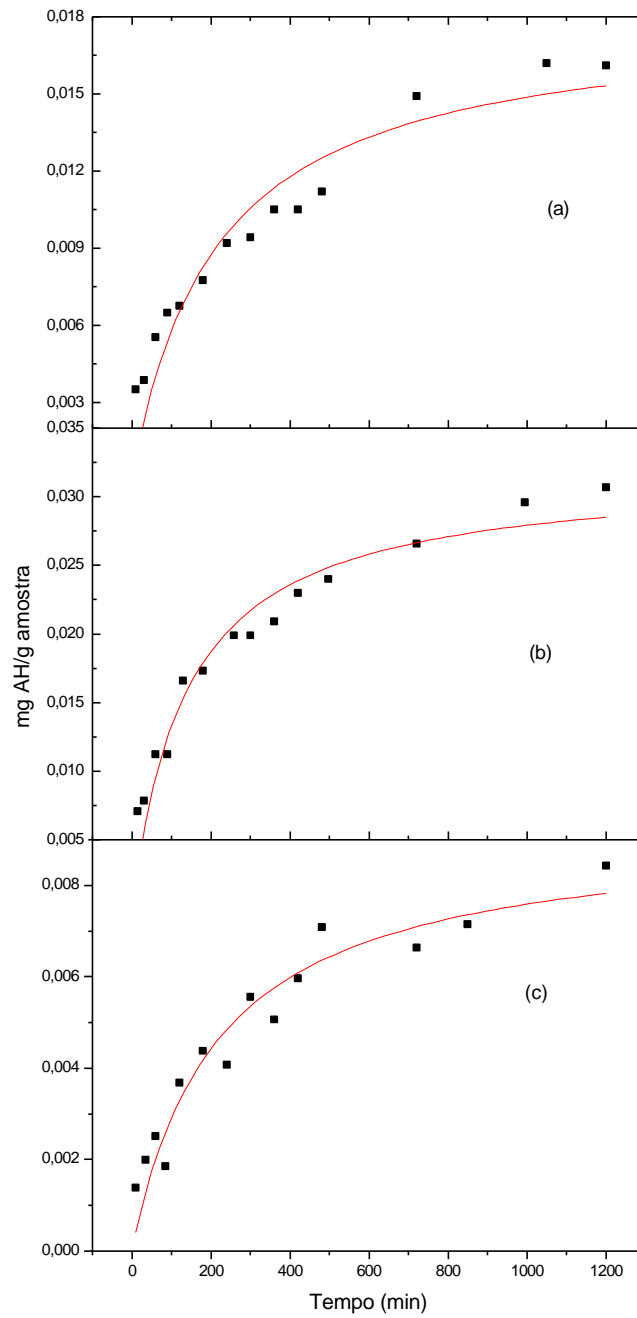


Figura 8 – Extração de AH de vermicomposto em função do tempo de contato com os solventes extratores: (a) NaOH, (b) KOH e (c) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

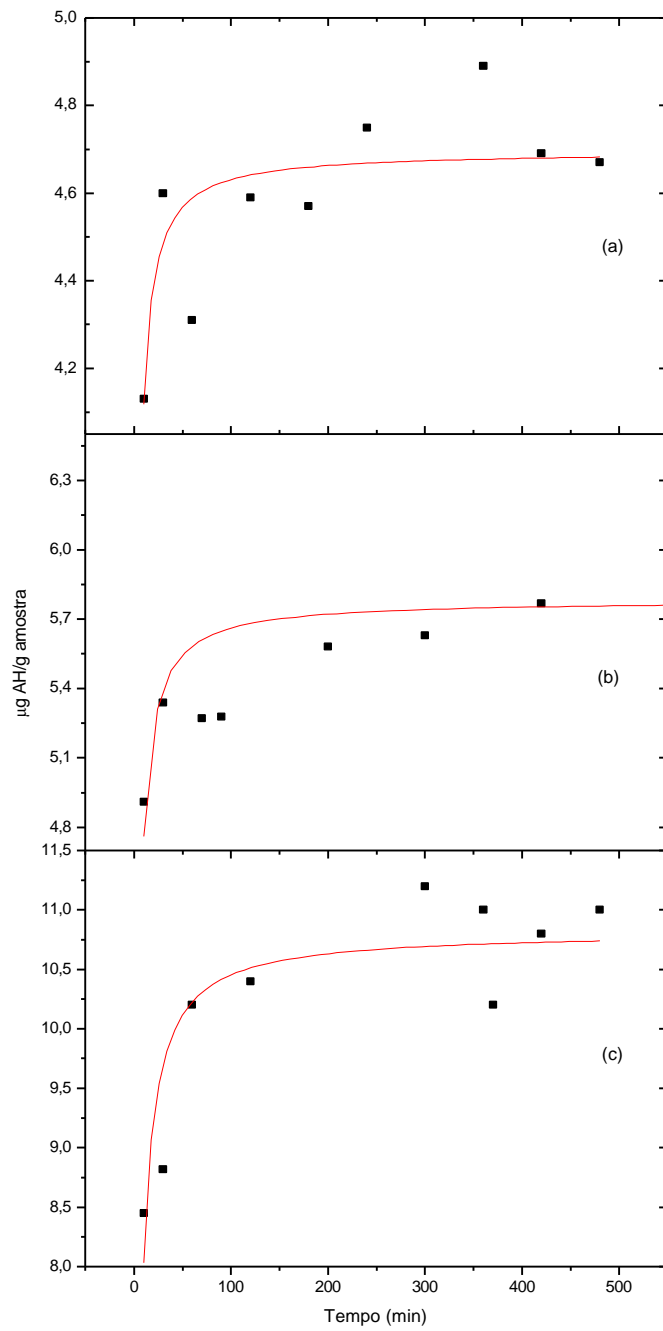


Figura 9 – Extração de AH de solo orgânico em função do tempo de contato com os solventes extratores: (a) NaOH, (b) KOH e (c) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

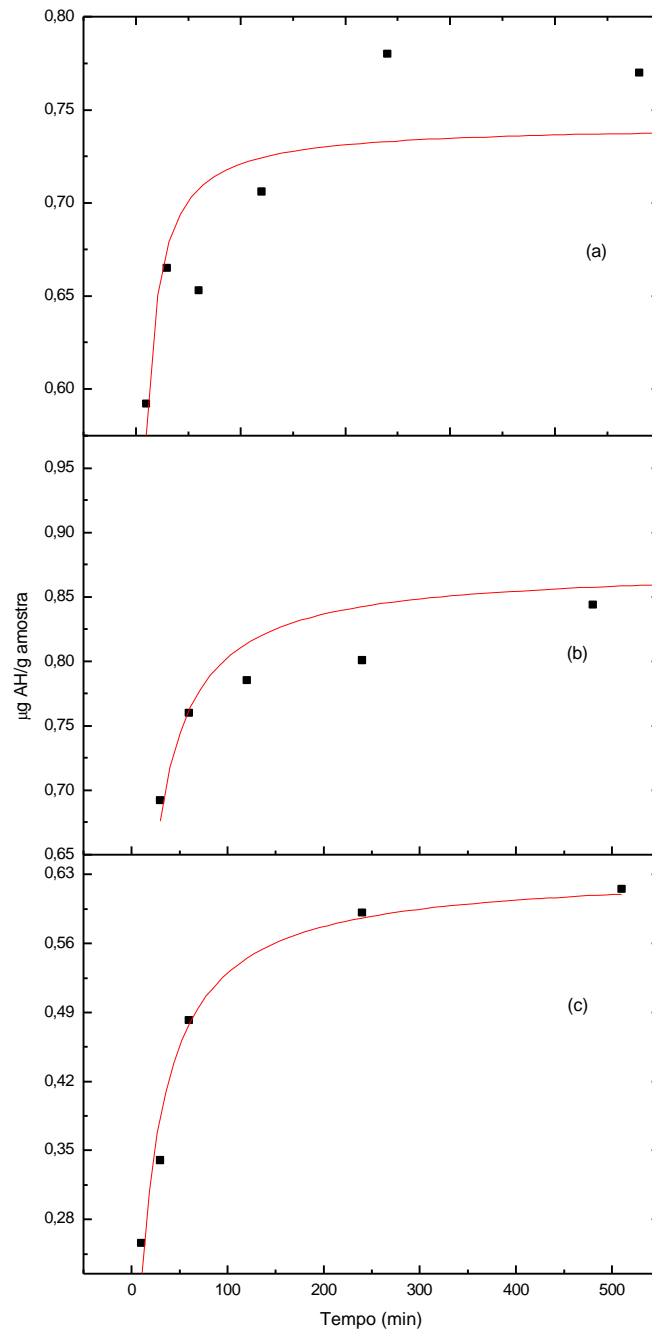


Figura 10 – Extração de AH de solo arenoso em função do tempo em contato com os solventes extratores: (a) NaOH, (b) KOH e (c) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Comparando as curvas, Figura 10(a e c), nota-se que, na extração com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  em solo arenoso, o tempo mínimo para se atingir o equilíbrio foi maior do que na extração com NaOH. Isso pode ser explicado, visto que o  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  solubiliza os AHs por ionização dos grupos OH carboxílicos e fenólicos, devido ao fato de o pH desta solução ser próximo de 9. Além disso, ele complexa os cátions Ca, Fe e Al, que ligam o AH à parte mineral do solo, o que deve necessitar de mais tempo que o NaOH, cujo mecanismo de solubilização somente ocorre através da ionização dos grupos OH e da solvatação das bases conjugadas.

#### **4.4. Características dos AHs extraídos pelos reagentes puros**

Os AHs obtidos nas condições estabelecidas nos itens 4.2. e 4.3. foram caracterizados por espectrofotometria nas regiões do visível e do infravermelho.

##### **4.4.1. Absorção na região do visível e razões $E_4/E_6$**

As curvas de absorvância *versus* comprimento de onda (Figura 11) nas varreduras de 700 a 400 nm de soluções de ácidos húmicos extraídos por NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  em amostra de solo orgânico apresentam-se com formas e tendências semelhantes com alguma variação na intensidade de absorção. As substâncias do extrato em KOH absorvem mais do que as extraídas em NaOH e estas, mais que as extraídas em  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Isso reflete nos valores de  $E_4/E_6$ , que diminuem na mesma ordem: 7,22 para AH-KOH > 7,13 para AH-NaOH > 5,98 para AH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (Quadro 5).

De acordo com CHEN et al. (1977), o KOH extrai substâncias, com tamanho e massa moleculares menores que as extraídas por NaOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , o que confere um valor de  $E_4/E_6$  maior. O  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  extrai moléculas maiores, de maior massa molecular.

KONONOVA (1966) relatou que os AHs extraídos com solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  têm  $E_4/E_6$  menor devido à alta condensação de anéis aromáticos.

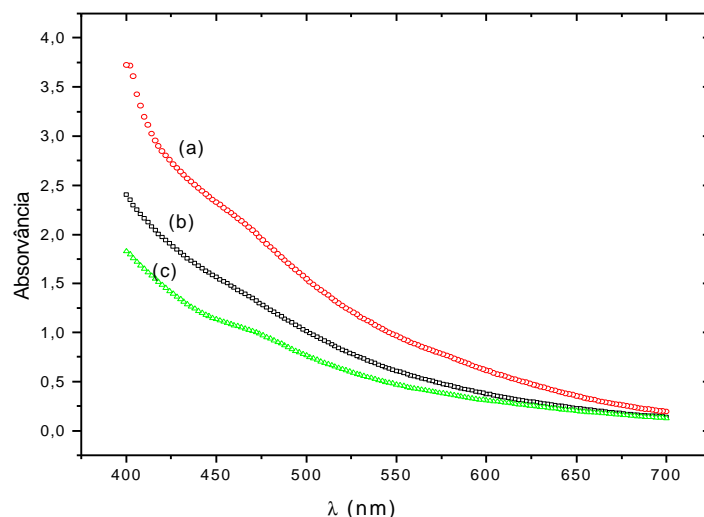


Figura 11 – Espectros de absorção na região do visível de AHs extraídos de solo orgânico por: (a) KOH, (b) NaOH e (c) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

Quadro 5 – Valores de E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> de AHs extraídos por reagentes puros

Amostra/Extrator	Húmus	Solo orgânico	Solo arenoso
NaOH	5,19	7,13	6,73
KOH	6,26	7,22	6,94
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	6,82	5,98	4,36

As curvas de absorvância *versus* comprimento de onda (Figuras 12 e 13) nas varreduras de 700 a 400 nm de soluções de ácidos húmicos extraídos do solo arenoso e de húmus, respectivamente, por NaOH, KOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> apresentam-se com formas semelhantes e variação de intensidade de absorção típicas, ou seja, há aumento da absorção com a diminuição do comprimento de onda, como encontrado por KUMADA (1965).

Os valores de E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> encontrados nos AHs extraídos do solo arenoso (Quadro 5), por NaOH e por KOH, são muito próximos, isto é, 6,73 e 6,94,

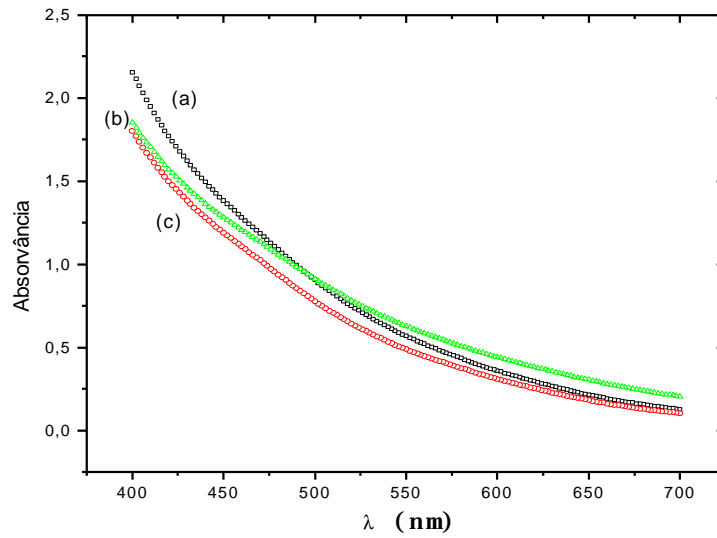


Figura 12 – Espectros de absorção na região do visível de AHs extraídos de solo arenoso por: (a) NaOH, (b)  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e (c) KOH.

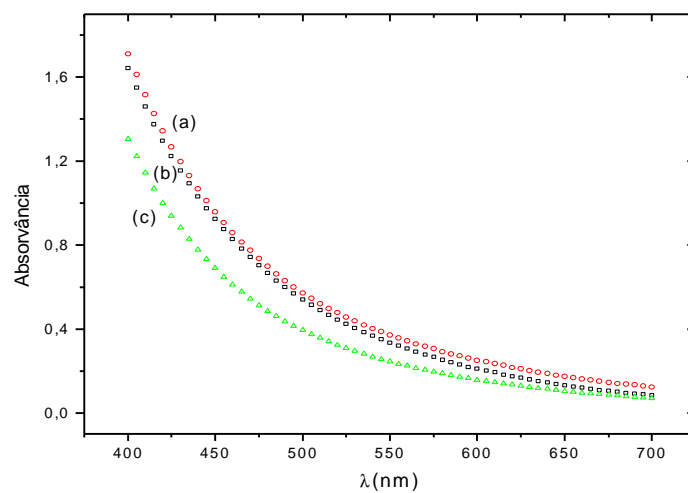


Figura 13 – Espectros de absorção na região do visível de AHs extraídos de húmus por: (a) NaOH, (b)  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e (c) KOH.

respectivamente. Porém, nos AHs extraídos com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , a razão  $E_4/E_6$  é bem menor, 4,36, o que indica que  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  extraiu substâncias de tamanho e massa moleculares maiores do que o NaOH e KOH, de acordo com CHEN et al. (1977).

Os valores calculados de  $E_4/E_6$  para os AHs extraídos de húmus variam (Quadro 5), sendo menor nos AHs extraídos com NaOH, 5,19; e maiores nos AHs extraídos com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 6,82, e com KOH, 6,26. Nesse caso, de acordo com CHEN et al. (1977), o NaOH estaria extraindo substâncias com tamanho e massa moleculares maiores que o KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Essas diferenças encontradas nos valores de  $E_4/E_6$  nos AHs extraídos por reagentes diferentes de uma mesma amostra devem estar associadas aos mecanismos de solubilização de AHs por cada reagente e também associadas às formas em que os AHs estão ligados à parte inorgânica da amostra analisada.

Em relação às curvas obtidas das varreduras dos AHs extraídos por NaOH (Figura 14) e por KOH (Figura 15) nas amostras húmus, solo orgânico e solo arenoso, pode-se ver que elas se apresentam como curvas típicas, variando nos valores de  $E_4/E_6$  (Quadro 5), os quais são 7,13 e 7,22 para AHs extraídos de solo orgânico, 6,73 e 6,94 para AH extraído de solo arenoso e 5,19 e 6,26 para AH extraído de húmus, respectivamente. Os menores valores encontrados para AHs extraídos de húmus podem ser indicativos de substâncias de tamanho e massa moleculares maiores, de acordo com CHEN et al. (1977), e com alto grau de condensação de anéis aromáticos, segundo KONONOVA (1966).

A absorvância em 600 nm é menor em AH extraído de húmus (Figura 13) em relação às amostras de solos (Figuras 11 e 12), tanto em NaOH, KOH ou  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , fato que indica menor grau de humificação, ou seja, AH com menor número de ligações duplas conjugadas (KUMADA, 1965), ou AH com baixa condensação dos anéis aromáticos (KONONOVA, 1966), características essas apresentadas por AHs mais “jovens”.

Esse resultado é coerente, visto que o AH extraído de solo orgânico e solo arenoso são AHs mais “maduros”, pelo tempo em que foram formados.

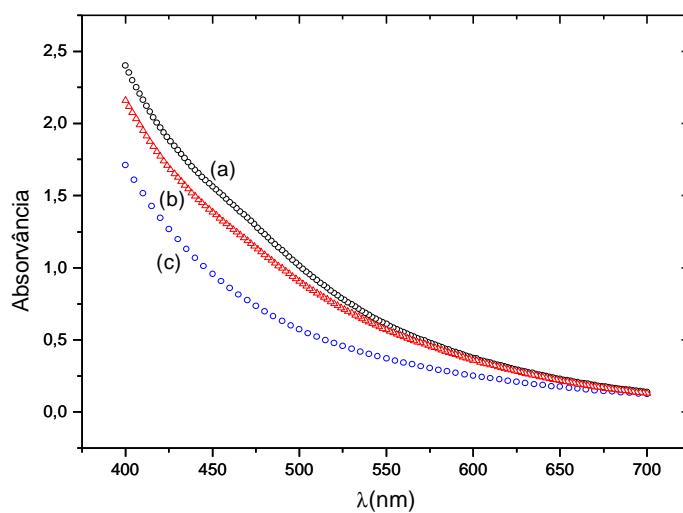


Figura 14 – Espectros de absorção na região do visível de AHs extraídos com NaOH de diferentes matrizes: (a) solo orgânico, (b) húmus e (c) solo arenoso.

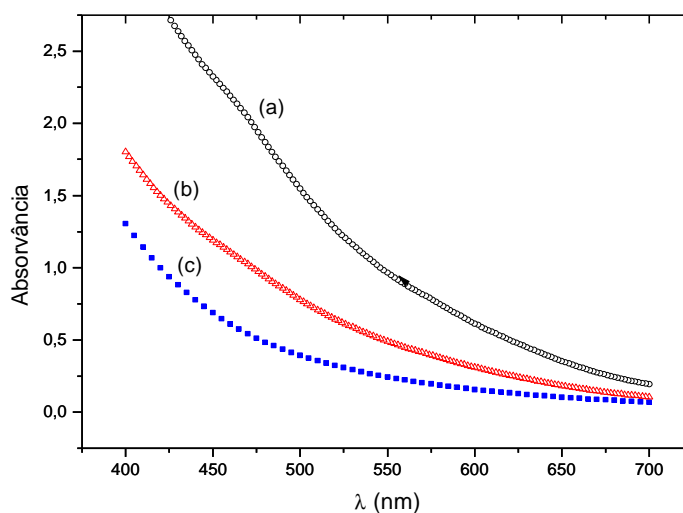


Figura 15 – Espectros de absorção na região do visível de AHs extraídos com KOH de diferentes matrizes: (a) solo orgânico, (b) solo arenoso e (c) húmus.

As curvas obtidas das varreduras do AH extraído por  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  das amostras húmus, solo orgânico e solo arenoso (Figura 16) têm formas características, contudo a curva referente à amostra de solo orgânico apresenta uma banda a 475 nm, que pode ser um AH do tipo P, o qual apresenta três bandas distintas em 615, 570 e 450 nm, classificação essa de acordo com a de KUMADA (1965).

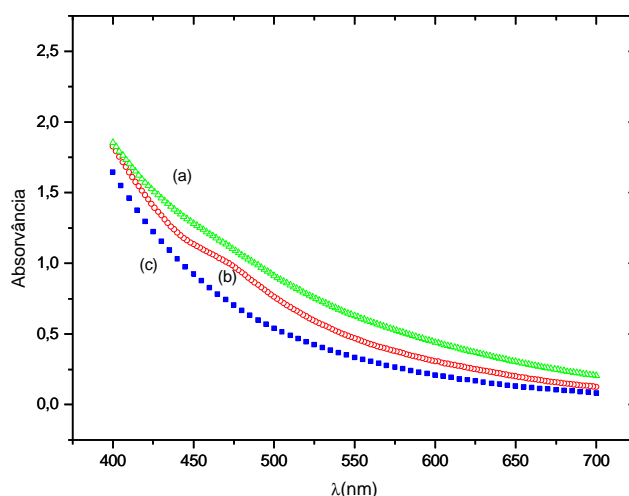


Figura 16 – Espectros de absorção na região do visível de AHs extraídos com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  de diferentes matrizes: (a) solo arenoso, (b) solo orgânico e (c) húmus.

Os valores de  $E_4/E_6$  (Quadro 5) iguais a 6,82 nos AHs extraídos de húmus, 5,98 nos AHs extraídos de solo orgânico e 4,36 nos AHs extraídos de solo arenoso, todos com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , apresentaram-se com pequenas variações quando comparados com os de AHs extraídos por NaOH e KOH das mesmas amostras. Esse resultado, provavelmente, está relacionado à ação do reagente usado ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ).

A ação do  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  na extração dos AHs ocorre através da complexação dos cátions Ca, Fe ou Al, que ligam os AHs à parte inorgânica da amostra, além da ionização dos grupos OH carboxílicos e fenólicos devido ao pH 9. Isso pode

explicar o fato de os valores de  $E_4/E_6$  dos AHs extraídos dos solos com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  serem menores que os valores de  $E_4/E_6$  dos AHs extraídos por  $\text{NaOH}$  e  $\text{KOH}$  dos mesmos solos, cujo mecanismo de extração envolve somente ionização dos grupos  $\text{OH}$  carboxílicos e fenólicos. Dessa maneira, os AHs extraídos dos solos, por  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  com valores de  $E_4/E_6$  menores, provavelmente têm estrutura química diferente, de tamanho e massa moleculares maiores, de maior grau de condensação dos anéis aromáticos e, então, maior complexidade molecular.

#### 4.4.2. Absorção na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho (IV) obtidos nos AHs extraídos pelos extratores  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{KOH}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  das amostras de solo orgânico, solo arenoso e vermicomposto são mostrados, respectivamente, nas Figuras 17, 18 e 19. As principais bandas de absorção encontradas nos espectros de IV e as respectivas atribuições são apresentadas no Quadro 6, sendo a maioria delas características de AHs encontradas na literatura (STEVENSON, 1994; POPPI e TALAMONI, 1992; DEIANA et al., 1990; ROCHA et al., 1998).

A banda larga de absorção na região de  $3.400\text{--}3.300 \text{ cm}^{-1}$  é freqüentemente atribuída a estiramento  $\text{OH}$ , ligado por ponte de hidrogênio, de grupos fenólicos, podendo haver contribuição de  $\text{OH}$  alifático de água e amina.

A banda de  $2.940\text{--}2.900$  de estiramento assimétrico de  $\text{C-H}$  alifático indica caráter alifático dos AHs. Essa banda não aparece no espectro dos AHs obtidos pelos três reagentes na amostra de solo orgânico (Figura 17). Contudo, nos espectros dos AHs das amostras de solo arenoso e vermicomposto (Figuras 18 e 19), apareceram as bandas definidas a  $2.932$  e  $2.944 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, sendo as amostras de AHs submetidas à análise nas mesmas condições.

A banda próxima de  $1.720 \text{ cm}^{-1}$  apareceu em todos os espectros, atribuída principalmente a estiramento  $\text{C=O}$  de grupos  $\text{—CO}_2\text{H}$  e, secundariamente, a cetonas ou aldeídos.

Quadro 6 – Principais bandas e regiões de absorção encontradas nos espectros de IV dos AHs das três amostras

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
3.400 – 3.300	Estiramento OH ligado por ponte de hidrogênio de grupos fenólicos (contribuição de OH alcoólico)
2.940 – 2.900	Estiramento assimétrico de C-H alifático
2.356	Estiramento C≡N
1.720	Estiramento C=O de grupos CO <sub>2</sub> H e cetonas
1.636	Estiramento C=O de grupos amida, quinona
1.630 – 1.600	Estiramento C=C de anel aromático, de C=O de cetonas conjugadas e estir. assimétrico de íons COO <sup>-</sup>
1.504	C=C aromático
1.456	Deformação angular de C-H alifático (grupos CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> )
1.420	Deformação OH e estiramento C-O de OH fenólico, deformação C-H de grupos CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> , estiramento simétrico do íon COO <sup>-</sup>
1.240	Estiramento C-O e deformação OH de COOH
1.228	Estiramento C-O e deformação angular de OH de COOH
1.120	Estiramento C-O de éteres
1.036	Estiramento C-O de álcoois primários
1.080 – 1.050	Estiramento C-O de polissacarídeo
928	Dímero de ácido carboxílico
820	Deformação angular fora do plano de ligações C-H de anéis aromáticos
748	Aromáticos dissubstituídos

Fonte: SILVERSTEIN et al. (1979).

Nas amostras de solo orgânico e vermicomposto (Figuras 17 e 18), os AHs extraídos com KOH apresentaram banda intensa em  $748\text{ cm}^{-1}$ , característica de aromáticos dissustituídos, fato que levou a indicação de que espécies contendo maior percentagem de aromáticos dissustituídos podem ser mais extraídas com KOH ou que pode estar ocorrendo substituição no anel aromático devido ao KOH ( $0,5\text{ mol L}^{-1}$ ).

Na amostra de vermicomposto (Figura 19), os espectros de AHs extraídos pelos mesmos reagentes em relação aos espectros dos solos (Figuras 17 e 18) são mais ricos em detalhes e apresentam bandas um pouco mais intensas, visto que aparecem na região de  $1.720\text{-}1.600$ , três picos,  $1.720$ ,  $1.636$  e  $1.600\text{ cm}^{-1}$ , enquanto nos espectros dos AHs dos solos orgânico e arenoso aparecem apenas dois picos,  $1.720$  e  $1.624\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.720$  e  $1.636\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Aparecem também três picos em  $1.506$ ,  $1.456$  e  $1.420\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos a C=C de aromático, CH alifático e OH fenólico, respectivamente, o que não foi verificado nas amostras de solos.

Pequena diferença foi observada na intensidade do pico a  $1.720\text{ cm}^{-1}$  nas amostras de solo orgânico e vermicomposto (Figuras 17 e 19). Houve diminuição na intensidade dos picos nos espectros dos AHs extraídos por NaOH e KOH em relação à intensidade do pico na mesma posição ( $\lambda^{-1}$ ) no espectro do AH extraído com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  da amostra de vermicomposto (Figura 19). Nesse caso, pode-se dizer que o  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  esteja extraíndo AH com maior quantidade de grupos  $\text{—CO}_2\text{H}$  da amostra de vermicomposto. Resultado semelhante ao encontrado por THENG et al. (1967). Na amostra de solo orgânico, ocorreu o contrário, e a intensidade da banda a  $1.720\text{ cm}^{-1}$  dos AHs extraídos com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  diminuiu em relação à intensidade no espectro do AH extraído com NaOH e KOH (Figura 17). Esse fato está associado ao aumento de intensidade de cor, indicando diminuição no conteúdo de  $\text{—CO}_2\text{H}$  dos AHs extraídos por  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  nessa amostra (STEVENSON, 1994).

Tal resultado se assemelha ao encontrado por GIUSQUIANI et al. (1989), que avaliaram características de AHs de “composto” de lixo, encontrando diminuição da absorção em  $1.720\text{ cm}^{-1}$ , associada à diminuição de grupos  $\text{—CO}_2\text{H}$  no processo de compostagem.

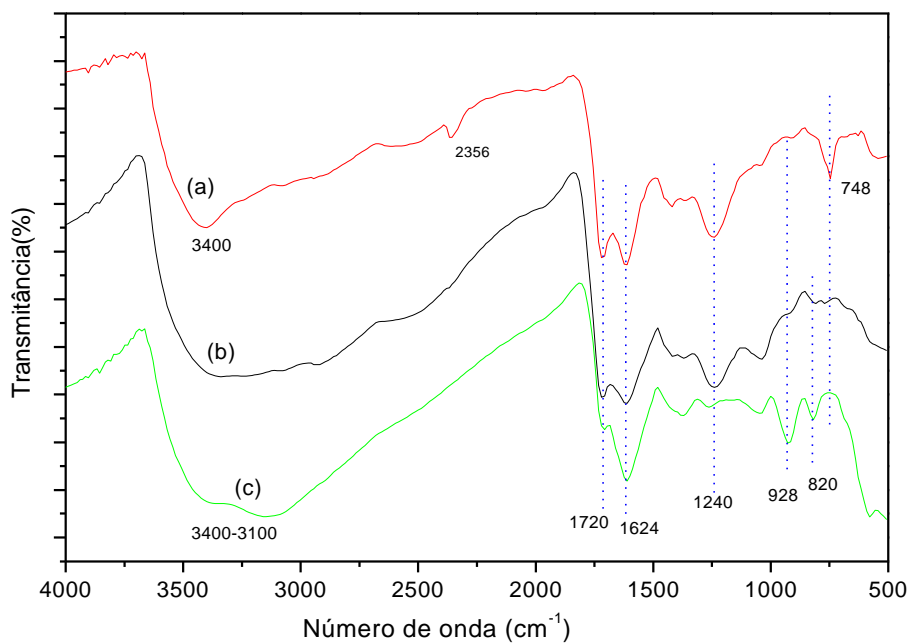


Figura 17 – Espectros de IV de AHs extraídos de solo orgânico por diferentes extratores: (a) KOH, (b) NaOH e (c) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

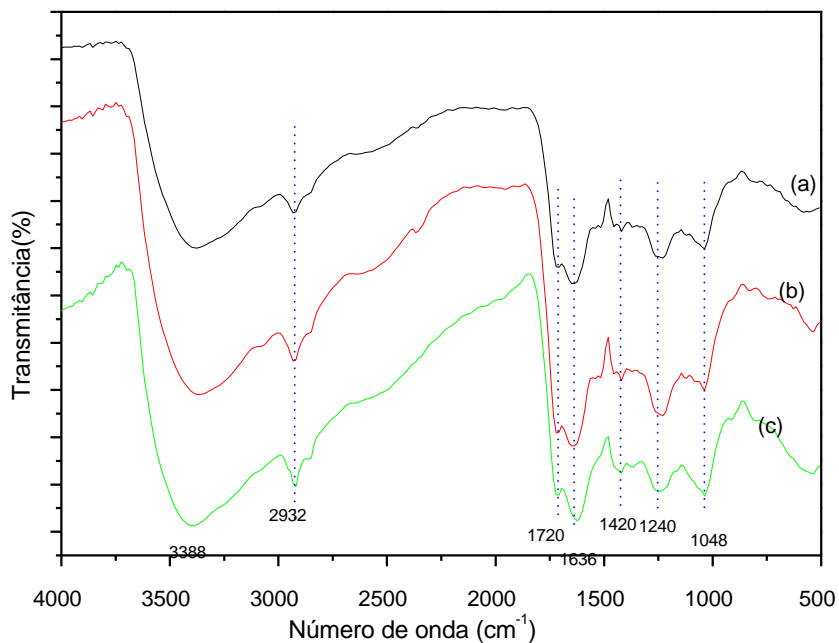


Figura 18 – Espectros de IV de AHs extraídos de solo arenoso por diferentes extratores: (a) NaOH, (b) KOH e (c) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

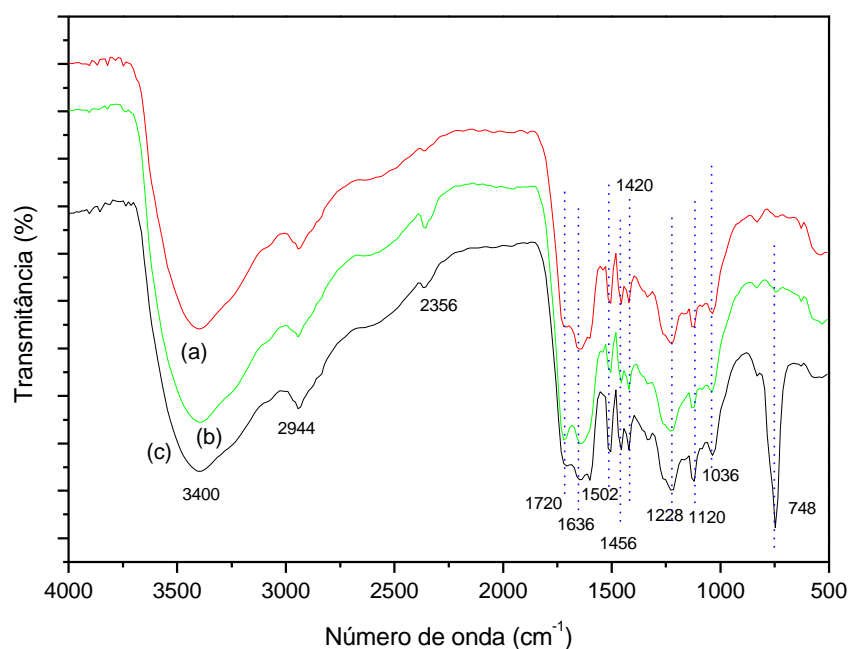


Figura 19 – Espectros de IV de AHs extraídos de vermicomposto por diferentes extratores: (a) NaOH, (b) Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e (c) KOH.

SCHNITZER e SCHUPPLI (1989) encontraram que solução de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> extrai AH de solo da classe “Orthic Gleysol” de massa molar maior e de coloração mais intensa que a solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>.

Na amostra de solo orgânico (Figura 17), as diferenças apresentadas foram: i) uma banda a 2.356 cm<sup>-1</sup>, que pode estar associada a um estiramento —C≡N no espectro AH extraído por KOH (LIDE, 1994) e ausente nos espectros dos AHs em NaOH e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; ii) duas bandas a 928 e 820 cm<sup>-1</sup>, atribuídas a dímero de ácido carboxílico e deformação angular fora do plano de ligação C-H de anéis aromáticos, respectivamente, no espectro de AH extraído com Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e ausentes nos espectros de AHs extraídos com NaOH e KOH. A presença dessas bandas indica que a solução de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> está extraíndo AH com maior caráter aromático (SCHNITZER e SCHUPPLI, 1989). Isso é explicado pela ação do reagente e pela característica da amostra de solo orgânico, cujo AH se encontra em um estágio “maduro”, de natureza mais aromática (KONONOVA, 1966).

Na amostra de solo arenoso, os espectros dos AHs extraídos pelos três reagentes apresentam bandas similares, indicando que as características, em termos de conteúdo e tipo de grupos funcionais dos AHs extraídos, são as mesmas. Nesse caso, o solo analisado, em que as SHs se encontram em um estágio estabilizado de humificação, pelo tempo longo em que foram formadas, é que determinou as características das SHs extraídas e não os extratores utilizados.

Nas Figuras 20, 21 e 22, mostram-se os espectros de IV dos AHs extraídos com o mesmo reagente em diferentes amostras. Nestas, pôde-se visualizar que o NaOH (Figura 20) extraía AHs com características muito semelhantes nas amostras de solos e um pouco diferentes na amostra de vermicomposto. Porém, algumas diferenças foram observadas através dos espectros dos AHs extraídos pelo KOH (Figura 21) e pelos espectros dos AHs extraídos pelo  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (Figura 22).

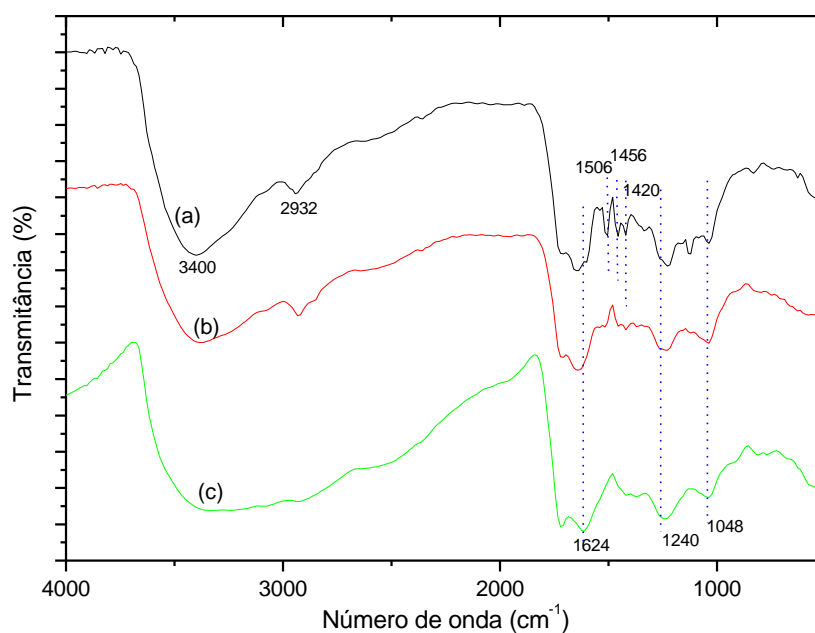


Figura 20 – Espectros de IV de AHs extraídos com NaOH de diferentes matrizes: (a) vermicomposto, (b) solo arenoso e (c) solo orgânico.

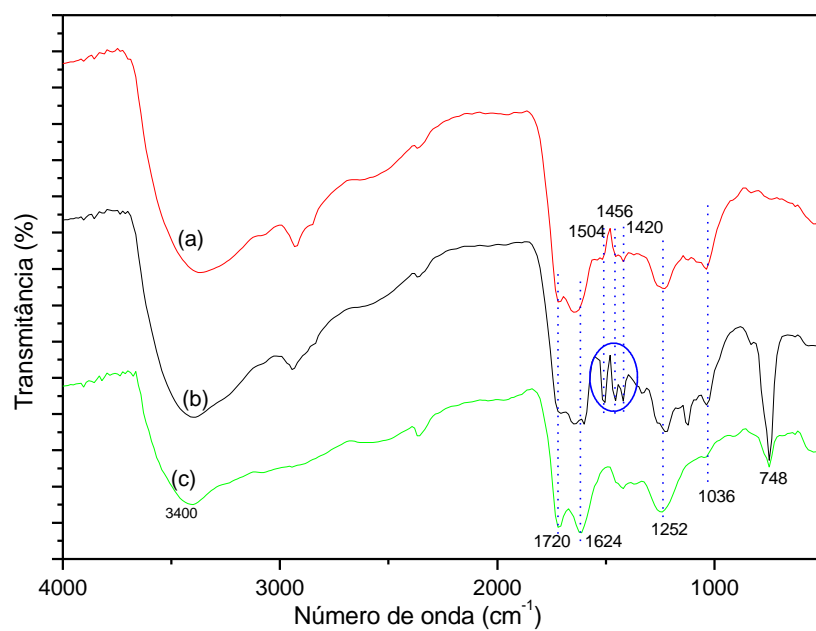


Figura 21 – Espectros de IV de AHs extraídos com KOH de diferentes matrizes: (a) solo arenoso, (b) vermicomposto e (c) solo orgânico.

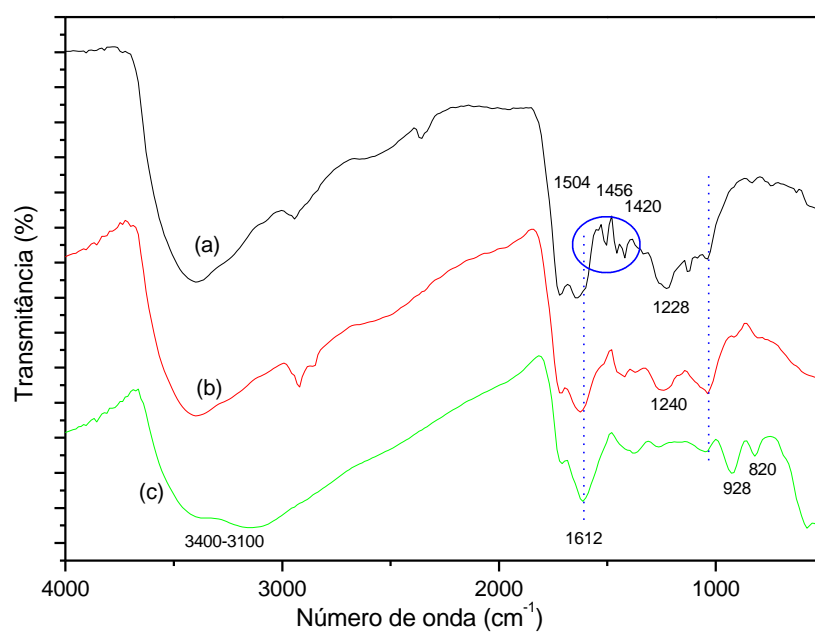


Figura 22 – Espectros de IV de AHs extraídos com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  de diferentes matrizes: (a) vermicomposto, (b) solo arenoso e (c) solo orgânico.

Em relação ao KOH (Figura 21), verificaram-se algumas diferenças: i) os picos em  $748\text{ cm}^{-1}$  nos espectros de AHs das amostras de vermicomposto e solo orgânico e ii) os picos em  $1.504$ ,  $1.456$  e  $1.420\text{ cm}^{-1}$  no espectro dos AHs da amostra de vermicomposto, cujas atribuições foram referidas no Quadro 6.

Observou-se que, na amostra de maior conteúdo de matéria orgânica, vermicomposto (Figura 21), o pico em  $748\text{ cm}^{-1}$  foi mais intenso do que na amostra de solo orgânico; esse pico não apareceu no AH extraído da amostra de menor conteúdo de matéria orgânica, solo arenoso. Isso pode estar relacionado à maior complexidade molecular ou à maior aromaticidade dos AHs extraídos de fontes mais orgânicas, visto que tal banda se referiu a aromáticos dissubstituídos. Tal fato evidenciou correlação positiva entre quantidades de aromáticos em AH e conteúdo de matéria orgânica nas mostras.

O  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (Figura 22) extraiu AHs, de cada amostra, com características diferentes. As diferenças foram identificadas pelos picos em  $1.504$ ,  $1.456$  e  $1.420\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos basicamente a C=C aromático, OH fenólico e grupos  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  (Quadro 6), no espectro do AH da amostra de vermicomposto, além dos picos  $928$  e  $820\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos a dímero de ácido carboxílico e ligações C-H de anéis aromáticos (Quadro 6), no espectro do AH da amostra de solo orgânico.

A princípio, esse fato evidenciou que as características das matrizes contribuem mais para determinar a natureza dos AHs extraídos. Contudo, os AHs extraídos pelo NaOH das amostras dos dois solos analisados foram semelhantes entre si, o que evidencia que o processo de extração por esse reagente também contribui na determinação das características dos AHs extraídos.

#### **4.5. Experimento com mistura**

Neste experimento, várias extrações foram realizadas, utilizando-se os extratores puros NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , as misturas binárias destes KOH-NaOH, KOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , NaOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e as misturas ternárias KOH-NaOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , obedecendo a um planejamento experimental. Aos dados obtidos

dessas extrações foram ajustados modelos polinomiais de Scheffé (SCHEFFÉ, 1958). Tais modelos permitiram avaliar o comportamento das misturas de extratores em relação à quantidade extraída e determinar quais as misturas entre os extratores que foram mais eficientes na extração.

Os resultados obtidos dos planejamentos experimentais de misturas com as amostras de vermicomposto, solo orgânico e solo arenoso são apresentados no Quadro 7.

Modelos quadrático e cúbico foram ajustados aos dados do Quadro 7, utilizando-se os programas MIXREG e MIXPLOT contidos no pacote ARTHUR (BARROS NETO et al., 1995). Nesse programa, utiliza-se o método dos mínimos quadrados para estimar os coeficientes “b” dos modelos polinomiais para misturas propostos por SCHEFFÉ (1958). Tais modelos são mostrados a seguir:

#### **Modelo Quadrático**

$$Y(x_1, x_2, x_3) = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

#### **Modelo Cúbico Especial**

$$Y(x_1, x_2, x_3) = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Nos dois modelos ajustados, o teste F para regressão foi significativo em nível  $\alpha$  de 0,01, ou seja, pelo menos uma das variáveis ou das relações não-lineares entre elas está influenciando significativamente a extração, naquele nível de probabilidade (Quadro 8). Como os modelos quadrático e cúbico são significativos, deve-se usar um critério para escolher um entre eles. Para escolha do modelo, é necessário fazer outro teste F, o qual compara a redução da soma quadrática do desvio por unidade de parâmetros adicionada, com a própria média quadrática do modelo contendo maior número de parâmetros (REIS e ANDRADE, 1996). No presente caso, o teste deve ser feito, comparando-se os modelos quadrático e cúbico. Deve-se, portanto, verificar se o termo cúbico  $b_{123}$  é estatisticamente igual a zero, ou seja, é necessário testar a hipótese de nulidade ( $H_0: \beta_{123} = 0$ ). A equação 5 foi usada para testar tal hipótese.

Quadro 7 – Resultado de extração de AHs em cada ensaio do planejamento

Ensaio	KOH	NaOH	Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Vermicomposto	Solo orgânico	Solo arenoso
	(% V/V)			(mg AH/kg amostra)		
1	100	0	0	21,40	4,92	0,73
				21,60	4,40	0,81
2	0	100	0	36,70	4,55	0,73
				36,9	5,42	0,78
3	0	0	100	8,92	11,36	0,65
				10,60	10,27	0,58
4	50	50	0	35,10	5,39	0,62
				31,80	4,37	0,70
				31,30	4,49	0,72
5	0	50	50	25,90	5,16	0,85
				26,40	4,63	0,91
				28,20	4,98	0,97
6	50	0	50	35,80	9,71	1,04
				36,80	9,68	1,01
				36,90	9,07	1,12
7	33,33	33,33	33,33	33,60	6,42	1,01
				-	6,61	1,06
				32,40	6,32	1,09
8	66,66	16,66	16,66	29,40	5,22	0,91
				36,50	5,34	0,94
9	16,66	66,66	16,66	37,10	7,52	0,86
				34,40	7,33	0,88
10	16,66	16,66	66,66	32,70	6,21	1,01
				30,10	6,18	1,09

Quadro 8 – Testes estatísticos dos modelos ajustados

Modelos	Vermicomposto		Solo orgânico		Solo arenoso	
	Quad.	Cúbico	Quad.	Cúbico	Quad.	Cúbico
Regressão $F_{\text{calc.}}$	39,26	31,21	33,03	26,64	25,46	44,57
Regressão $F_{\text{tab.}} (\alpha = 0,01)$	4,34	4,20	4,25	4,01	4,25	4,01
Falta de ajuste $F_{\text{calc.}}$	2,93	3,80	2,14	2,69	9,78	3,88
Falta de ajuste $F_{\text{tab.}} (\alpha = 0,01)$	5,21	5,74	5,04	5,56	5,04	5,56

$$F = \frac{[(SQD_{\text{quad.}} - SQD_{\text{cub.}}) / d]}{SQD_{\text{cub.}} / (N - p)} \quad \text{Eq. (5)}$$

em que  $d$  é a diferença entre os números de parâmetros dos dois modelos,  $SQD$  é a soma dos quadrados dos desvios nos modelos quadrático e cúbico,  $N$  é o número total de ensaios e  $p$  é o número de parâmetros no modelo quadrático. A hipótese  $H_0$  é sempre rejeitada se  $F_{\text{calc}}$  for maior que  $F_{\text{tab}}$ , ou seja,  $\beta \neq 0$ .

No Quadro 9, mostra-se o resultado do teste para escolha entre modelos. Esse resultado indica que o modelo quadrático é o mais apropriado para amostras de vermicomposto e solo orgânico, sendo o modelo cúbico mais apropriado para a amostra de solo arenoso.

Quadro 9 – Teste para escolha entre modelos

Amostra	Quadrático X Cúbico
Vermicomposto	$F_{\text{calc.}} = 0,19, F_{\text{tab.}} = F_{1, 16, 0,05} = 4,49$
Solo orgânico	$F_{\text{calc.}} = 0,38, F_{\text{tab.}} = F_{1, 17, 0,05} = 4,45$
Solo arenoso	$F_{\text{calc.}} = 18,23, F_{\text{tab.}} = F_{1, 17, 0,05} = 4,45^*$

\*Significativo em um nível  $\alpha = 0,05$  de probabilidade.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo (SHELTON et al., 1983), foi feito o teste da falta de ajuste (Quadro 8). Essa falta de ajuste é medida,

comparando-se valores de resposta observados dos pontos experimentais 8, 9 e 10 (Figura 3), chamados de pontos de verificação, com valores de resposta estimados pelo modelo.

Verificou-se, nesse caso, que a falta de ajuste (Quadro 8) do modelo quadrático foi significativa, o que já compromete a qualidade do seu ajuste, sendo confirmada pelo teste de escolha entre os modelos.

Para amostra do solo arenoso, o teste F da falta de ajuste no modelo escolhido foi significativo em nível  $\alpha$  de 0,05, e isso significa que existe pequena falta de ajuste. Porém, o modelo foi aceito, visto que o objetivo deste estudo foi encontrar uma região do “simplex” que represente uma extração máxima de AH, sem necessidade de um ajuste mais rigoroso. Para amostras de vermicomposto e solo orgânico, o teste F da falta de ajuste nos modelos escolhidos foram não-significativos em nível  $\alpha$  de 0,01, confirmando a qualidade do modelo em explicar o comportamento do sistema.

Embora o teste F para regressão indique que exista pelo menos um parâmetro influenciando significativamente a extração, ele não evidencia qual(is) desse(s) parâmetro(s) é (são) significativo(s). Para isso, foi necessário fazer o teste t de Student para cada coeficiente e obter as equações de regressão. Através desses reagentes, pode-se, então, conhecer a influência dos reagentes extratores puros, ou em misturas binárias ou misturas ternárias na resposta (quantidade de AH), que se desejam otimizar.

As equações de regressão ajustadas aos dados experimentais, indicando apenas os termos significativos em um nível  $\alpha$  de 0,01, com os respectivos erros entre parênteses, são:

### **Vermicomposto**

$$Y(X_1, X_2, X_3) = \frac{22,1625}{(\pm 1,29)} X_1 + \frac{35,9093}{(\pm 1,29)} X_2 + \frac{10,7341}{(\pm 1,29)} X_3 + \frac{45,1388}{(\pm 5,38)} X_1 \cdot X_3 + \frac{52,1703}{(\pm 5,38)} X_2 \cdot X_3 \quad Eq. (6)$$

### **Solo orgânico**

$$Y(X_1, X_2, X_3) = \frac{4,8362}{(\pm 0,078)} X_1 + \frac{5,0363}{(\pm 0,078)} X_2 + \frac{10,2275}{(\pm 0,078)} X_3 - \frac{11,3173}{(\pm 1,33)} X_1 \cdot X_3 + \frac{6,3827}{(\pm 1,33)} X_2 \cdot X_3 \quad Eq. (7)$$

## Solo arenoso

$$Y(X_1, X_2, X_3) = 0,7754X_1 + 0,7326X_2 + 0,6348X_3 + 0,8868X_1 \cdot X_3 + 1,4849X_2 \cdot X_3 + 3,2115X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad Eq. (8)$$

$(\pm 0,00) \quad (\pm 0,00) \quad (\pm 0,00) \quad (\pm 0,02) \quad (\pm 0,02) \quad (\pm 0,854)$

em que

$$X_1 = (\% \text{ NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1});$$

$$X_2 = (\% \text{ KOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}); \text{ e}$$

$$X_3 = (\% \text{ Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \text{ } 0,1 \text{ mol L}^{-1}).$$

### 4.5.1. Interpretação dos coeficientes

Para avaliar o efeito de cada coeficiente na resposta, deve-se considerar a ordem do termo com o qual ele está associado (SNEE, 1979). Por exemplo, para a amostra de vermicomposto (equação 6), o coeficiente  $b_{23}$  teria que ser igual a  $4 \times 35,9093$  para ter o mesmo efeito do coeficiente  $b_2$ , pois o termo quadrático  $X_2X_3$  assume o valor  $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$ , que, multiplicado pelo coeficiente igual a 52,1703, diminui quatro vezes, ou seja,  $52,1703 \times \frac{1}{4} = 13,0425$ . Nesse caso, pode-se observar que o coeficiente  $b_2$ , associado ao componente puro KOH, é o que exerce maior efeito na resposta, ou seja, esse reagente extrai maior quantidade de AH da amostra de vermicomposto. Então, ao comparar o efeito médio dos termos quadráticos ou cúbicos, observou-se que o termo linear contribui muito mais no valor da resposta.

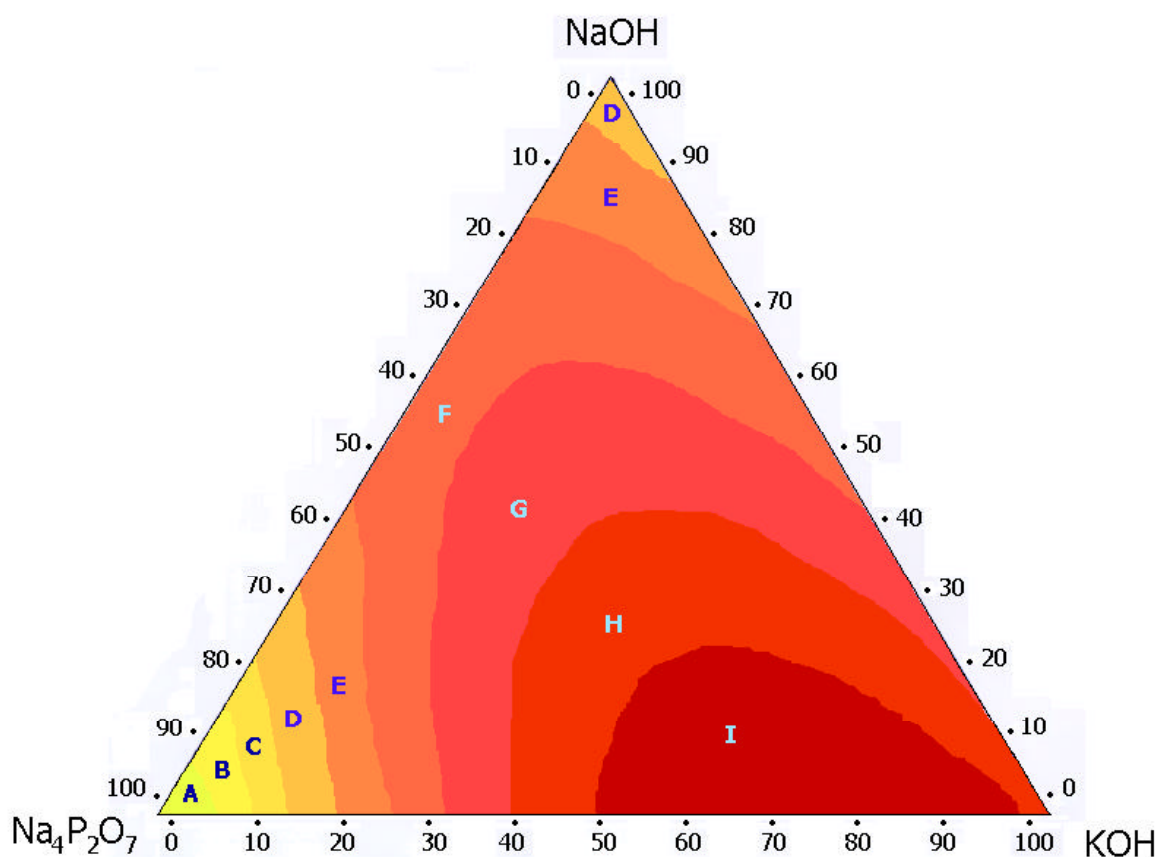
#### 4.5.1.1. Amostra de vermicomposto

Neste sistema, teve-se a contribuição significativa dos componentes puros (NaOH, KOH,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) e das interações entre NaOH/  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e KOH/  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . A interação entre os componentes NaOH/KOH não foi significativa, o que significa que o processo de extração se comporta, de maneira aditiva, em relação à mistura das duas variáveis, não havendo acréscimo nem decréscimo na extração.

Analisando a equação (6), pode-se observar que o maior coeficiente, 35,9093, associado à variável  $X_2$  (KOH), contribui mais para aumentar a resposta, ou seja, maior quantidade de AH é extraída quando se usam maiores proporções de KOH como extrator. Em relação aos componentes  $X_1X_3$  (NaOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) e  $X_2X_3$  (KOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), ambos exercem efeitos positivos, ou seja, houve sinergismo entre essas misturas binárias, contribuindo para aumentar a resposta. Isso significa que a quantidade de AH extraída pelas misturas NaOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e KOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  é maior do que a média das quantidades extraídas utilizando componentes puros NaOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  ou KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , respectivamente. Isso faz com que a região de máxima extração na projeção da superfície de respostas se desloque um pouco na direção do  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , como pode ser visto na Figura 23. Todas as misturas contidas na região I da Figura 23 proporcionam extração mais eficiente.

O fato de o KOH 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  puro ser o melhor extrator de AH na amostra de vermicomposto pode ser explicado pelo mecanismo em que o KOH exerce sobre as SHs para solubilizá-las. Esse mecanismo envolve ionização dos grupos ácidos e solvatação das bases conjugadas, sendo os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  responsáveis pela interação e solvatação das cargas negativas dissociadas, de comportamento diferente em meio aquoso. O menor raio iônico hidratado do íon  $\text{K}^+$  em relação ao  $\text{Na}^+$  permitiu maior eficiência na interação de cargas intermolecular e intramolecular presentes nas SHs. Essa eficiência contribuiu, significativamente, para a solvatação e o aumento no rendimento de extração do AH com o uso de KOH nessa amostra, que é constituída quase que totalmente de matéria orgânica (ROCHA et al., 1998).

Relacionado ao melhor extrator de AH da amostra de vermicomposto, o KOH, em analogia com o NaOH mais comumente usado, pode extrair AH mais alifático e menos humificado, como observado por SCHNITZER e SCHUPPLI (1989) e DICK et al. (1999), ou mais rico em C, carboidratos (HAYES et al., 1989), com maior caráter hidrofóbico e menos oxidado, verificado por THENG et al. (1967).



A	$10,73 \leq Y < 13,92$	D	$20,29 \leq Y < 23,48$	G	$29,85 \leq Y < 33,03$
B	$13,92 \leq Y < 17,10$	E	$23,48 \leq Y < 26,66$	H	$33,03 \leq Y < 36,22$
C	$17,10 \leq Y < 20,29$	F	$26,66 \leq Y < 29,85$	I	$36,22 \leq Y < 39,40$

$$Y(X_1, X_2, X_3) = 22,1625 X_1 + 35,9093 X_2 + 10,7341 X_3 + 45,1388 X_1 \cdot X_3 + 52,1703 X_2 \cdot X_3 \quad Eq.(6)$$

$(\pm 1,29)$        $(\pm 1,29)$        $(\pm 1,29)$        $(\pm 5,38)$        $(\pm 5,38)$

$X_1 = \text{NaOH}$     $X_2 = \text{KOH}$     $X_3 = \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

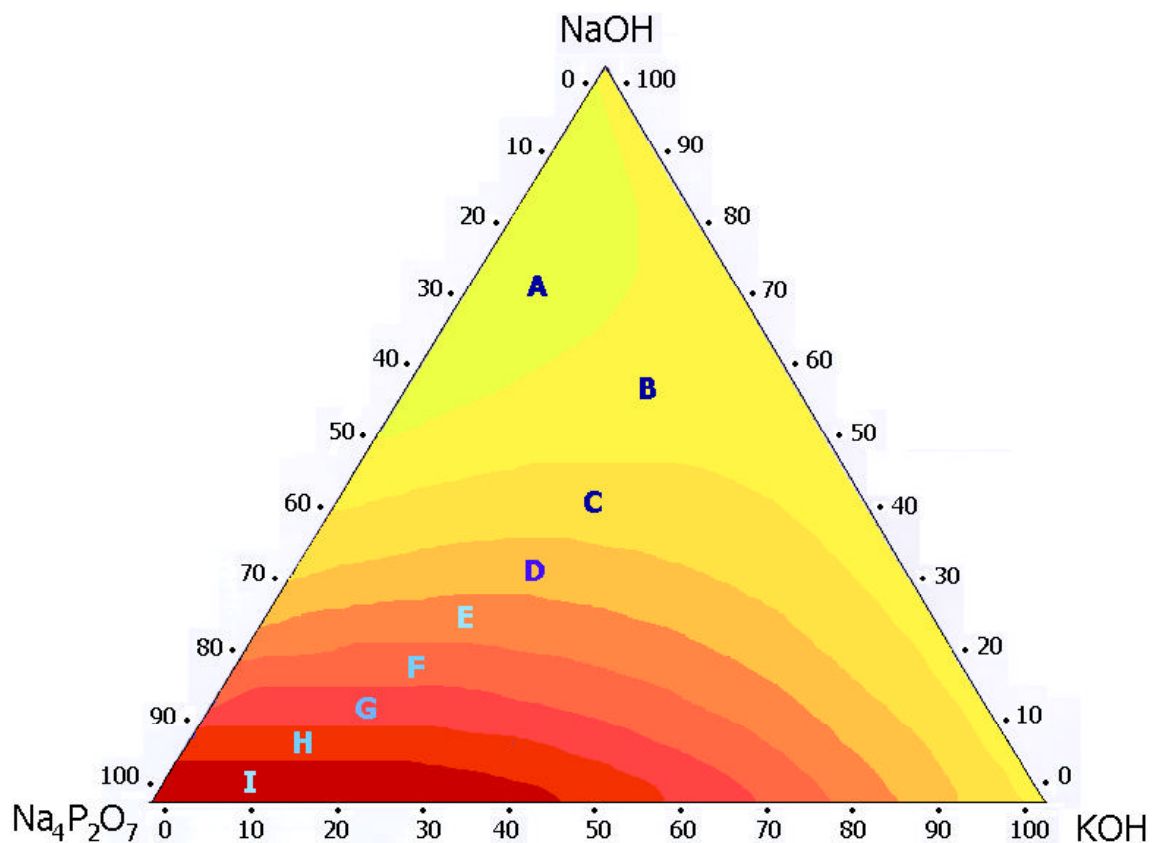
Figura 23 – Projeção da superfície de respostas gerada pela equação 6 (extração de AH de vermicomposto). As proporções dos componentes são dadas em porcentagem (v/v) das soluções dos extratores. O rendimento, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , é representado por Y.

Nessa amostra, o extrator menos versátil foi o  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , visto que o mecanismo de extração envolve, principalmente, a ionização dos ácidos húmicos, e, como o pH da solução extratora foi mantido em 9, o meio não foi muito propício à ionização.

#### 4.5.1.2. Amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico

No sistema formado por solo orgânico-misturas de extratores, o comportamento com respeito à quantidade extraída também foi descrito por um modelo quadrático representado pela equação (7). Os componentes puros ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$  e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) e as misturas  $\text{NaOH-Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  e  $\text{KOH-Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  produziram efeitos significativos na extração. O valor do coeficiente  $X_3$ , 10,23, indicou que misturas contendo maiores proporções de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  extraem mais AH. O efeito de interação  $X_2X_3$ , representado pelo coeficiente  $b_{23} = 6,38$ , fez com que a região de máxima extração ficasse um pouco deslocada na direção do  $\text{KOH}$  (Figura 24). O sistema otimizado indica que todas as misturas contidas na região I da Figura 24 produzem melhores respostas, ou seja, extraem maior quantidade de AH. Nesse sistema, houve efeito antagônico entre as variáveis  $X_1X_3$ , ou seja, a resposta produzida pela mistura dos componentes  $\text{NaOH-Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , na proporção 1:1, é menor do que a média das respostas obtidas pelos componentes puros  $\text{NaOH}$  e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ .

No solo, os AH podem estar formando complexos argilo-húmicos com os metais (Figura 25). Quando é adicionada a solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , este reage, com o metal liberando o ácido húmico. Tal fenômeno pode explicar o fato de a solução de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  extrair maior quantidade de AH da amostra de solo orgânico, visto que tal solo apresenta alta porcentagem da fração argila (Quadro 10). Além disso, os AHs extraídos por  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  têm caráter mais aromático (DICK et al., 1999) e mais ácido (HAYES et al., 1989), o que confere maior capacidade de complexação.

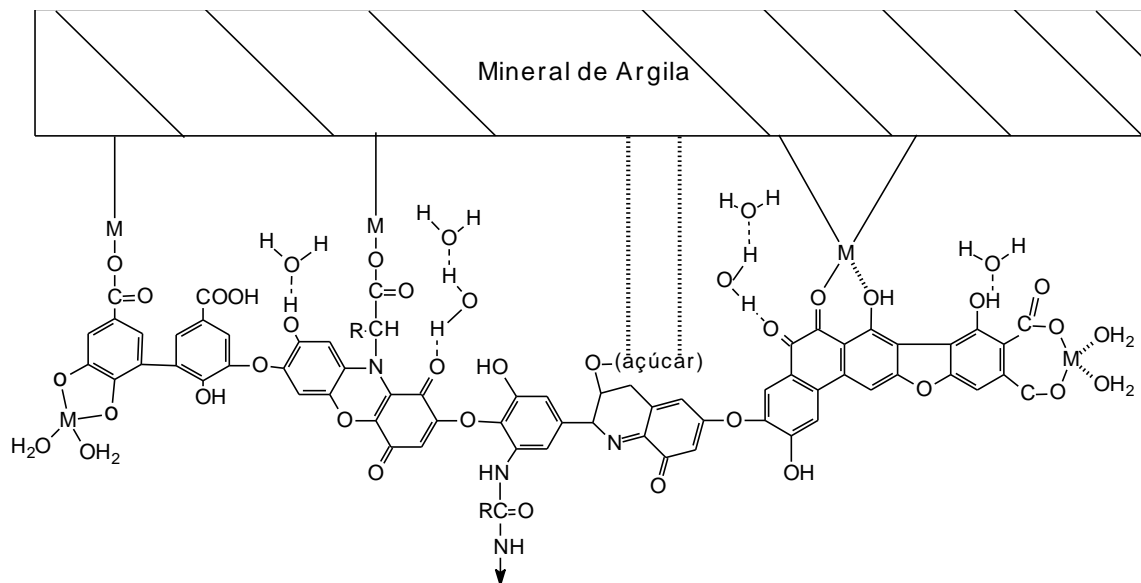


A	$4,06 \leq Y < 4,76$	D	$6,14 \leq Y < 6,84$	G	$8,23 \leq Y < 8,92$
B	$4,76 \leq Y < 5,45$	E	$6,84 \leq Y < 7,53$	H	$8,92 \leq Y < 9,62$
C	$5,45 \leq Y < 6,14$	F	$7,53 \leq Y < 8,23$	I	$9,62 \leq Y < 10,31$

$$Y(X_1, X_2, X_3) = \underset{(\pm 0,078)}{4,8362} X_1 + \underset{(\pm 0,078)}{5,0363} X_2 + \underset{(\pm 0,078)}{10,2275} X_3 - \underset{(\pm 1,33)}{11,3173} X_1 \cdot X_3 + \underset{(\pm 1,33)}{6,3827} X_2 \cdot X_3 \quad Eq.(7)$$

$$X_1 = \text{NaOH} \quad X_2 = \text{KOH} \quad X_3 = \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$$

Figura 24 – Projeção da superfície de respostas gerada pela equação 7 (extração de AH de Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico). As proporções dos componentes são dadas em porcentagem (v/v) das soluções dos extratores. O rendimento, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , é representado por Y.



Fonte: STEVENSON (1994)

Figura 25 – Modelo representativo do complexo argilo-húmico.

Quadro 10 – Características mineralógicas e físico-químicas dos solos analisados

Amostra	argila	pH	Ca <sup>++</sup> (cmol <sub>c</sub> /kg)	Mg <sup>++</sup> (cmol <sub>c</sub> /kg)	H + Al <sup>+++</sup> (cmol <sub>c</sub> /kg)	Al <sup>+++</sup> (cmol <sub>c</sub> /kg)	K <sup>+</sup> (μg/g)	MO (dag/kg)
Solo orgânico	63%	5	1,17	0,57	8,10	1,20	64	7,09
Solo arenoso	22%	4,97	0,53	0,13	3,90	0,40	18,67	1,12

#### 4.5.1.3. Amostra de solo franco argilo-arenoso

O comportamento deste sistema em relação à quantidade de AH extraída foi mais bem explicado por um modelo cúbico especial; nesse caso, houve a contribuição significativa do efeito causado pela relação não-linear de terceira ordem  $X_1X_2X_3$  (equação 8). Os coeficientes associados às variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ , que representam os componentes puros, não diferem significativamente entre si, ou seja, NaOH, KOH ou  $Na_4P_2O_7$  puros extraem praticamente a mesma quantidade de AH. As relações não-lineares de segunda ordem  $X_1X_3$  e  $X_2X_3$

indicam que existem efeitos sinérgicos entre os componentes NaOH-Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e KOH-Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, sendo o coeficiente X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> maior, o que fez com que a região de máxima extração se deslocasse para mais próximo de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e KOH (Figura 26).

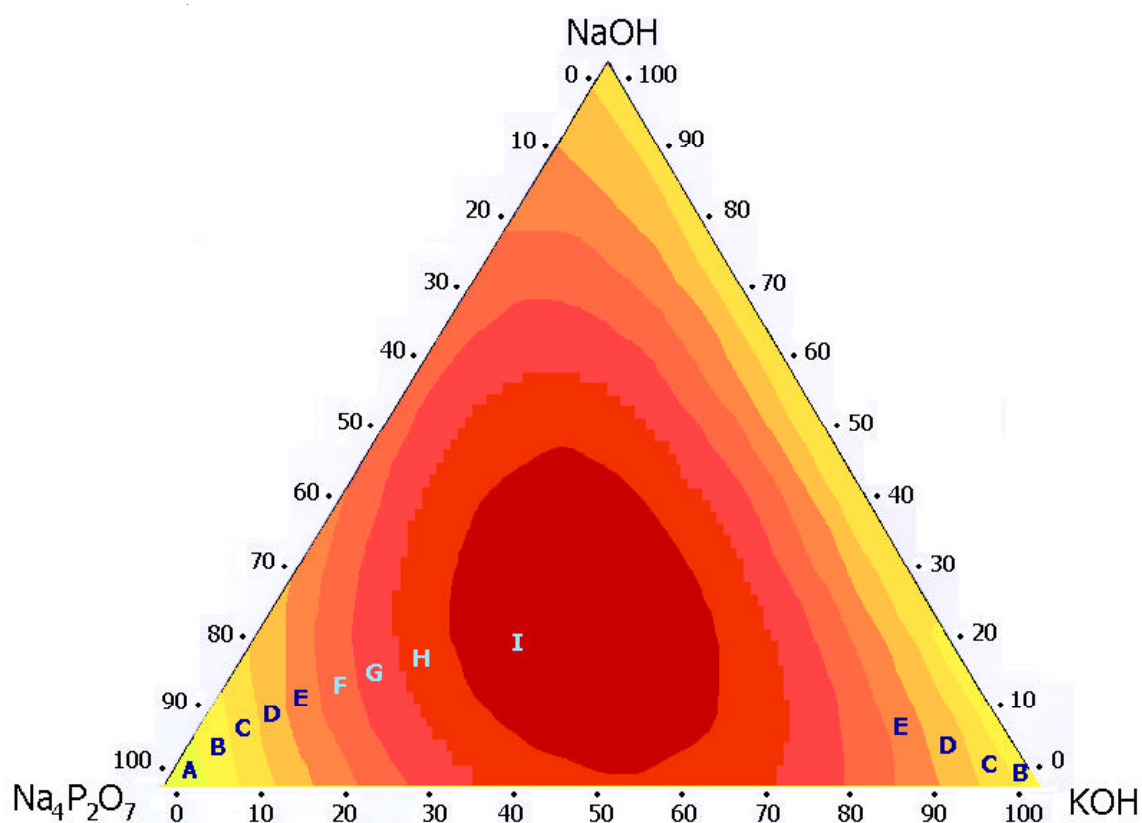
A interação entre as variáveis X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> não foi significativa, o que mostra que o efeito entre as duas variáveis é simplesmente aditivo. Como pode ser visto na região B da Figura 26, o valor da resposta é o mesmo em toda a extensão do simplex, que vai do NaOH até o KOH. O coeficiente b<sub>123</sub> igual a 3,212 evidencia que existe efeito sinérgico entre as três variáveis, ou seja, misturas contendo os três componentes dentro da região I extraem maior quantidade de AH.

As características deste solo (Quadro 9) indicam que, devido à pequena porcentagem de argila, apenas parte do ácido húmico estará formando o complexo argilo-húmico, que é mais bem extraído com o Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Outra parte do ácido húmico é extraída apenas por ionização dos grupamentos ácidos, o que aumenta o efeito do KOH e do NaOH. A contribuição total dos extratores gera o efeito interativo, fazendo com que determinadas misturas dos três componentes sejam mais eficientes na extração.

#### **4.5.2. Características dos AHs extraídos por misturas otimizadas**

Com o objetivo de verificar as características qualitativas em relação à presença de determinados grupos funcionais dos AHs extraídos pelas misturas otimizadas, foi selecionado um ponto em cada região de máxima extração nas Figuras 23, 24 e 26. Na amostra de vermicomposto, a mistura otimizada constituiu-se de 70% v/v de KOH e 30% v/v de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. A mistura constituída de 80% de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e 20% de KOH foi usada para extração de AH, na amostra de Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico; para extração na amostra de solo franco argilo-arenoso, foi selecionada a mistura de 40% de KOH, 40% de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e 20% de NaOH.

Os espectros de infravermelho obtidos para os AHs extraídos nessas condições são apresentados na Figura 27.



A	$0,63 \leq Y < 0,69$	D	$0,79 \leq Y < 0,85$	G	$0,95 \leq Y < 1,01$
B	$0,69 \leq Y < 0,74$	E	$0,85 \leq Y < 0,90$	H	$1,01 \leq Y < 1,06$
C	$0,74 \leq Y < 0,79$	F	$0,90 \leq Y < 0,95$	I	$1,06 \leq Y < 1,11$

$$Y(X_1, X_2, X_3) = \underset{(\pm 0,001)}{0,7754} X_1 + \underset{(\pm 0,001)}{0,7326} X_2 + \underset{(\pm 0,001)}{0,6348} X_3 + \underset{(\pm 0,022)}{0,8868} \cdot X_1 \cdot X_3 + \underset{(\pm 0,022)}{1,4849} X_2 \cdot X_3 + \underset{(\pm 0,854)}{3,2115} X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad Eq.(8)$$

$X_1 = \text{NaOH}$     $X_2 = \text{KOH}$     $X_3 = \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

Figura 26 – Projeção da superfície de respostas gerada pela equação 8 (extração de AH de solo franco argilo-arenoso). As proporções dos componentes são dadas em porcentagem (v/v) das soluções dos extratores. O rendimento, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , é representado por Y.

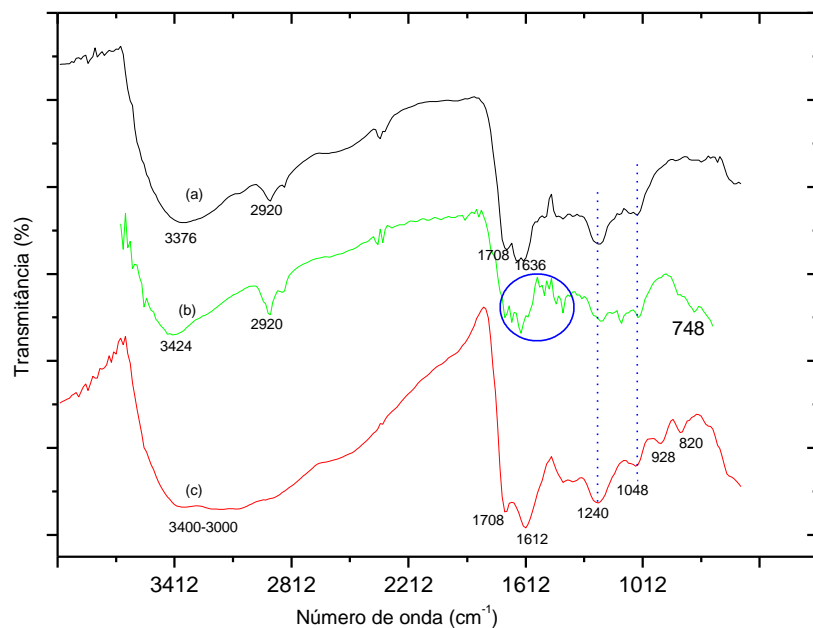


Figura 27 – Espectros de AHs extraídos por misturas otimizadas de: (a) solo arenoso, (b) vermicomposto e (c) solo orgânico.

A região marcada com um círculo (Figura 27), referente ao AH da amostra de vermicomposto, contém as bandas em 1.720, 1.684, 1.636, 1.516, 1.456 e 1.420  $\text{cm}^{-1}$ , cujas atribuições se encontram no Quadro 6, com algumas variações, devido a deslocamentos.

Pode-se observar, inicialmente, que os espectros (a) e (c) referentes a AHs das amostras dos solos arenoso e orgânico, respectivamente, tem características muito semelhantes. As bandas em 928 e 820  $\text{cm}^{-1}$  aparecem apenas no espectro (c) solo orgânico, observadas no estudo de extratores puros, especificamente no espectro do AH extraído por  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , Figura 21(c); resultado esse coerente, visto que 80% da mistura otimizada é constituída de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ .

O espectro (a) de AH extraído da amostra de solo arenoso (Figura 27) tem características muito semelhantes aos espectros obtidos nos AHs extraídos por reagentes puros (Figura 17). Isso permite maior liberdade de escolha da mistura otimizada, visto que o produto da extração é praticamente o mesmo.

O espectro (b) de AH extraído de vermicomposto (Figura 27) também tem características muito semelhantes ao espectro obtido em AHs extraídos pelos reagentes puros (Figura 18), ou seja, a mistura utilizada de 70% de KOH e 30% de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  extrai AH de mesmas características, em termos de grupos funcionais (composição química qualitativa), que os reagentes KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  puros. A diferença apresentada na intensidade do pico em  $748\text{ cm}^{-1}$ , forte no espectro do AH extraído pelo reagente puro KOH (Figura 18) e fraca no espectro do AH extraído pela mistura otimizada, que contém 70% de KOH, é devida à concentração do extrato de AH .

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os estudos da extração com a concentração dos reagentes evidenciaram que é necessária menor concentração de NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) para atingir a extração máxima; quando se utiliza KOH, essa concentração deve ser de cerca de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , principalmente nas amostras de solos.

Em relação ao tempo de equilíbrio, um tempo maior (20 horas) foi necessário para que o sistema contendo a amostra de vermicomposto atingisse o equilíbrio; já nas amostras de solos, esse tempo foi de, aproximadamente, seis horas. Portanto, para extração de AH em amostras de vermicomposto, deve-se usar maior tempo de contato com o extrator.

As análises espectroscópicas nas regiões do visível e infravermelho indicaram que substâncias ligeiramente diferentes são extraídas quando se utilizam extratores diferentes para uma mesma amostra ou para amostras diferentes. Quando se utiliza o mesmo extrator em diferentes amostras, as substâncias extraídas com KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  apresentam algumas diferenças, principalmente aquelas extraídas com KOH. Nesse caso, o NaOH extrai substâncias mais similares.

Foi possível otimizar as metodologias de extração de ácidos húmicos, utilizando-se planejamentos experimentais para mistura.

O método estatístico, em que todas as variáveis podem assumir valores diferentes ao mesmo tempo, permitiu estimar os efeitos de interação entre os extratores, indicando aumento na quantidade extraída quando se utilizam misturas destes.

O resultado obtido neste estudo permitiu, ainda, recomendar as seguintes misturas extratoras que aumentam a quantidade extraída, desde que seja seguido o mesmo procedimento utilizado neste trabalho:

1. Para amostras de solos contendo pouca matéria orgânica e alta porcentagem de areia, qualquer mistura contida na região do simplex, delimitada por 55%-25% em  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 60%-15% em KOH e 45%-4% em NaOH.
2. Quando se utilizam amostras de solos contendo alta porcentagem de matéria orgânica e argila, pode-se usar qualquer mistura contida na região, que foi aproximada para um triângulo, cujos vértices são 0%, 0% e 100%; 5%, 0% e 95%; e 0%, 55% e 45% de NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , respectivamente.
3. Para extração de ácidos húmicos em amostras de vermicomposto, todas as misturas contidas na região triangular do simplex, cujos vértices são 0%, 100% e 0%; 50%, 50% e 0%; e 20%, 55% e 25% de NaOH, KOH e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , respectivamente, extraem mais ácidos húmicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKEN, G. R. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances. In: AIKEN, G.R. (Eds.). **Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry isolation and characterization**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p.688-692.
- AMALFITANO, C., QUEZADA, R.A., WILSON, M.A., HANNA, J.V. Chemical composition of humic acid: a comparison with precursor 'light fraction' litter from different vegetations using spectroscopic techniques. **Soil Science**, v.159, n.6, p.391-401, 1995.
- BAES, A.U., BLOOM, P.R. Fulvic acid ultraviolet-visible spectra: Influence of solvent and pH. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.54, p.1248-1254, 1990.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1995. 299p.
- BEDROCK, C.N., CHESHIRE, M.V., CHUDEK, J.A., FRASER, A.R., GOODMAN, B.A., SHAND, C.A. Effect of pH on precipitation of humic acid from peat and mineral soils on the distribution of phosphorus forms in Humic and Fulvic acid fraction. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.**, v.26, n.9-10, p.1411-1425, 1995.
- BERTON, R.S. Reciclagem de resíduos urbanos na agricultura: composto de lixo. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, 1997, São Carlos. **Trabalho...** São Carlos: 1997. p.112-116.

- BUSINELLI, M., PERUCCI, P., PATUMI, M., GIUSQUIANI, P.L. Chemical composition and enzymic activity of some worm casts. **Plant and Soil**, v.80, p.417-422, 1984.
- CAMPANELLA, L., TOMASSETTI, M., PICCOLO, A. Thermogravimetric and IR analysis of different extracts of humic substances. **Thermochemica Acta**, v.170, p.67-80, 1990.
- CARDOSO, L.R., FOLONI, J.M., ALBUQUERQUE, M.A. Adsorção e mineralização de atrazina em húmus produzido por vermicompostagem. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, 1997, São Carlos. **Trabalho...** São Carlos: 1997. p.116-164.
- CARTER, R.J., HOXEY, A., VERHEYEN, T.V. Complexation capacity of sediment humic acids as a function of extraction technique. **The Science of the Total Environment**, v.125, p.25-31, 1992.
- CHEN, Y., SENESI, N., SCHNITZER, M. Information provide on humic substances by  $E_4/E_6$  ratios. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.41, p.352-358, 1977.
- CIAVATTA, C., GOVI, M., SITTI, L., GESSA, C. Capillary electrophoresis of humic acid fractions. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.**, v.26, n.19-20, p.3305-3313, 1995.
- CORNELL, J.A. Experiments with mixtures: a review. **Technometrics**, v.15, n.3, p.437-455, 1973.
- CORNELL, J.A. **Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data**. New york: John Wiley & Sons, 1990. 632p.
- DEIANA, S., GESSA, C., MANUNZA, B., RAUSA R., SEEBER, R. Analytical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from sewage sludge, manure, and worm compost. **Soil Science.**, v.150, n.1, p.419-424, 1990.
- DICK, D.P., BURBA, P., HERZOG, H. Influence of extractant and soil type on molecular characteristics of humic substances from two brazilian soils. **J. Braz. Chem.**, v.10, n.2, p.140-145, 1999.
- EIRAS, S.P., ZAMORA, P.G.P., REIS, E.L. Estudo do efeito de misturas de solventes na determinação espectrofotométrica por absorção atômica. **Química Nova**, v.17, n.5, p.369, 1994.
- FELBECK, G.T. Structural hypotheses of soil humic acids. **Soil Science**, v.111, n.1, p. 42-48, 1971.

- GIUSQUIANI, P.L., GIGLIOTTI, G., BUSINELLI, D., MACCHIONI, A. Spectroscopic comparison between humic and fulvic acids from urban waste compost and soil. In: SENESI, N., MIANO, T.M. (Eds.). **Humic substances in the global environment and implications on human health**. New York: Elsevier Science, 1994. p.1303-1310.
- GIUSQUIANI, P.L., PATUMI, M., BUSINELLI, M. Chemical composition of fresh and composted urban waste. **Plant and Soil**, v.116, p.278-282, 1989.
- GRIFFITH, S. M., SCHNITZER, M. Analytical characteristics of humic and fulvic acids extracted from tropical volcanic soils. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.39, p.861-867, 1975.
- HARVEY, D.T., BYERLY, S., BOWMAN, A., TOMLIN, J. Optimization of HPLC and GC separations using response surfaces. **Journal of Chemical Education**, v.68, n.2, p. 162-169, 1991.
- HAYES, M. H. B., MacCARTHY, P., MALCOLM, R. L. The search for structure: setting the scene. In: HAYES, M. H. B. (Ed.). **Humic substances II: in search of structure**. Chichester: John Wiley, 1989. p.761-764.
- KONONOVA, M.M. **Soil organic matter**. Oxford: Pergamon Press, 1966. 544p.
- KUMADA, K. Elementary composition and absorption spectra of humic and fulvic acids. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.31, n.3, p.437-448, 1985.
- KUMADA, K. Studies on the colour of humic acids. Part 1: on the concepts of humic substances and humification. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.11, n.4, p.11-16, 1965.
- KUWASTSUKA, S., TSUTSUKI, K., KUMADA, K. Chemical studies on soil humic acids. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.24, n.3, p.337-347, 1978.
- LIDE, D. R. **CRC hand book of chemistry and physics**. 75.ed. London: CRC Press, 1994. 281p.
- LOBARTINI, J.C., ORIOLI, G.A., TAN, K.H. Characteristics of soil humic acid fractions separated by ultrafiltration. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.**, v.28, n.9-10, p.787-796, 1997.
- MacCARTHY, P., MALCOLM, R.L., CLAPP, C.E., BLOOM, P.R. An introduction to soil humic substances. In: MacCARTHY, P. (Ed.). **Humic substances in soil crop sciences: selected readings**. Madison: SSSA, 1990. p.1-12.

- MANUNZA, B., GESSA, C., DEIANA, S., RAUSA, R. A normal distribution model for the titration curves of humic acids. **Journal of Soil Science**, v.43, p.127-131, 1992.
- MEHLICH, A. Photometric determination of humic matter in soils, a proposed method. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.15, n.12, p.1417-1422, 1984.
- MELO, W.J., MELO, G.M.P., BERTIPAGLIA, L.M.A., MELO, V.P. Reciclagem de resíduos orgânicos: oportunidade comercial com conservação ambiental. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, 1997, São Carlos. **Trabalho...** São Carlos: 1997. p.106-111.
- ORIOLI, G.A., CURVETTO, N.R. Evaluation of extractants for soil humic substances. **Plant and Soil**, v.55, p.353-361, 1980.
- PICCOLO, A. Characteristics of soil humic extracts obtained by some organic and inorganic solvents and purified by HCl-HF treatment. **Soil Science**, v.146, n.6, p. 419-426, 1988.
- PICCOLO, A., CAMPANELLA, L., PETRÔNIO, B.M. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of soil humic substances extracted by different mechanisms. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.54, p.750-756, 1990.
- POPPI, N.R., TALAMONI, J. Estudos dos ácidos húmicos e fúlvico extraídos de solos por espectroscopia de Infravermelho. **Química Nova**, v.15, n.4, p.281-285, 1992.
- PRESTON, C.M., SCHNITZER, M. Effects of chemical modifications e extratants on carbon-13 NMR spectra of humic materials. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.48, p.305-311, 1984.
- QIU, H., WALTERS, F. H. The use of a 3-factor statistical mixture design and a 2-factor chromatographic response function to the RP-HPLC separation of several free  $\alpha$ -amino acids. **Analytical Letters**, v.26, n.8, p.1799-1818, 1993.
- REIS, C., ANDRADE, J.C. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel. **Química Nova**, v.19, n.3, p.313-319, 1996.
- REIS, C., ANDRADE, J.C., BRUNS, R.E., MORAN, R. C. P. Application of the split-plot experimental design for the optimization of a catalytic procedure for the determination of Cr(VI). **Analytica Chimica Acta**, v.369, p.269-279, 1998.
- RICE, J.A., MacCARTHY, P. Comments on the literature of the humic fraction of humus. **Soil Science**, v.43, p. 65-70, 1988.

- ROCHA, J.C., ROSA, A.H., FURLAN, M. An alternative methodology for the extraction of humic substances from organic soils. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.9, n.1, p.51-56, 1998.
- ROSA, A.H., ROCHA, J.C., FURLAN, M., ZARA, L.F., SANTOS, A. Oxidação das substâncias húmicas de turfa durante o processo de extração alcalina. Estudo espectroscópico na região do infravermelho e do visível. **Anais Assoc. Bras. Quím.**, v.47, n.1, p.25-28, 1998.
- SANTISTEBAN, A.J., SOUZA, S.M., LANDGRAF, M.D., REZENDE, M.O.O. Estudo das características físico-químicas do ácido húmico de vermicomposto e do vermicomposto. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, 1997, São Carlos. **Trabalho...** São Carlos: 1997. p.129.
- SCHEFFÉ, H. Experiments with mixtures. **Journal Royal Stat. Soc.**, v.B20, p.344-360, 1958.
- SCHEFFÉ, H. The simplex centroid design for experiments with mixtures. **Journal Royal Stat. Soc.**, v.B25, p.235, 1963.
- SCHNITZER, M., PRESTON, C.M. Supercritical gas extraction of a soil with solvents of increasing polarities. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.51, p.639-646, 1987.
- SCHNITZER, M., SCHUPPLI, P. The extraction of organic matter from selected soils and particle size fractions with 0,5M NaOH and 0,1M Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> solutions. **Can. J. Soil Sci.**, v.69, p.253-262, 1989.
- SCHNITZER, M. Binding of humic substances by mineral colloids In: HUANG, P.M., SCHNITZER, M. (Eds.). **Interactions of soil minerals with natural organics and microbes**. Madison: SSSA, 1986. p.77-102.
- SCHNITZER, M. Organic matter characterization. In: PAGE, A.L. (Ed.) **Methods of soil analysis**. Part 2. Madison: SSSA, 1982. p.581-594. (Agronomy, 9).
- SCHNITZER, M., WRIGHT, J.R., DESJARDINS, G. A comparison of the effectiveness of various extractants for organic matter from two horizons of a podzol profile. **Can. J. Soil Sci.**, v.38, p.49-53, 1958.
- SCIACOVELLI, O., SENESI, N., SOLINAS, V., TESTINI, C. Spectroscopic studies on soil organic fractions I. IR and NMR spectra. **Soil Biol. Biochem.**, v.9, p.287-293, 1977.
- SHELTON, J.T., KHURI, A.I., CORNELL, J.A. Selecting check points for testing lack of fit in response surface models. **Technometrics**, v. 25, n.4, p.357-365, 1983.

- SHINOZUKA, N., NIHEY, Y. Size of humic substances in aqueous solution studied by light scattering. In: SENESI, N., MIANO, T.M. **Humic substances in the global environment and implications on human health**. New York: Elsevier Science, 1994. p.889-894.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1979. 299p.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J. **Fundamentals of analytical chemistry**. 6 ed. Whashington: United States of America, 1991. 892p.
- SNEE, R.D. Experimenting with mixtures. **Chemtech**, v.9, p.702-710, 1979.
- STEVENSON, F.J. **Humus chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1994. 496p.
- STEVENSON, F.L., SCHNITZER, M. Transmission electron microscopy of extracted fulvic and humic acids. **Soil Science**, v.133, n.3, p.179-185, 1982.
- SWIFT, R.S., POSNER, A.M. Autoxidation of humic acid under alkaline conditions. **Journal of Soil Science**, v.23, n.4, p.381-393, 1972.
- TAN, K.H. **Environmental soil science**. New York: Marcel Dekker, 1994. 301p.
- TAN, K. H. **Principles of soil chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1993. 362p.
- THENG, B.K.G., WAKE, J.R.H., POSNER, A.M. The humic acids extracted by various reagents from a soil. **Journal of Soil Science**, v.18, n.2, p.252-268, 1967.
- TOWN, M.T., POWELL K.J. Limitations of resins for the isolation of the non-colloidal humic fraction in soil extracts and aquatic samples. **Analytica Chimica Acta**, v.271, p.195-202, 1993.
- YOSHIDA, M., SAKAGAMI, K., HAMADA, R., KUROBE, T. Studies on the properties of organic matter in buried humic horizon derived from volcanic ash. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.24, n.2, p.277-287, 1978.
- ZALBA, P., GASPARONI, J.C., PEINEMANN, N. A rapid method for estimating the carbon concentration of fulvic acids. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.**, v.27, n.1-2, p.1-5, 1996.