

ESTUDO DOS ÁCIDOS HÚMICO E FÚLVICO, EXTRAÍDOS DE SOLOS, POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Nilva Ré Poppi

UFMS - Departamento de Química - Cx.P. 649 - 79069 - Campo Grande - MS

José Talamoni (in memoriam)

USP - IFQSC - Cx.P. 369 - 13560 - São Carlos - SP

Recebido em 26/8/91; cópia revisada em 5/6/92

Humic and fulvic acids were extracted from soil (Ilha de Cananéia, São Paulo, Brasil) with 0,5 N NaOH solution, in the presence of nitrogen gas and then purified, lyophilised and methylated with an ether solution of diazomethane. They were characterized by chemical analyses and IR spectra. Pellets of KBr were prepared using quantitative analysis techniques and heated at 100°C for 4 hr under vacuum. The results obtained indicate that hydrogen bonded C-O groups absorb in the 1620 cm^{-1} region and that OH groups were not completely methylated with diazomethane.

Keywords: humic acid; fulvic acid; IR spectroscopy, soil.

INTRODUÇÃO

Há mais de 200 anos pesquisadores vêm estudando as substâncias húmicas (S.H.) e apresentando teorias a respeito da formação, característica e modelos de estruturas¹⁻¹⁰. As S.H. são classificadas em função de parâmetros específicos como solubilidade em diferentes pH e mostram as seguintes propriedades:

- as frações apresentam-se como misturas heterogêneas de moléculas polidispersas, que se situam em intervalos de pesos moleculares que podem variar de algumas centenas até milhões,^{5,8,11-13}
- são normalmente de cor escura e de caráter ácido;
- as S.H. extraídas de solos apresentam variações na composição elementar que são mostradas na Tabela I.

Tabela I - Variações encontradas na composição elementar da S.H.¹²

S.H.	Composição Elementar (% m/m)				
	C	H	O	N	S
ác. húmico	53,8-58,7	3,2-6,2	32,8-38,3	0,8-4,3	0,1-1,5
ác. fúlvico	40,7-50,6	3,8-7,0	39,7-49,8	0,9-3,3	0,1-3,6

Devido à natureza heterogênea e complexa das substâncias húmicas, apesar de esforços dos cientistas da área, pouco se sabe sobre a origem destes ácidos, síntese, estrutura química e suas funções no ambiente terrestre e aquático.

O trabalho aqui apresentado corresponde ao estudo de ácidos húmico e fúlvico e de seus derivados através da espectroscopia de infravermelho (I.V.) e análises químicas de grupos funcionais. As amostras foram extraídas de solo brasileiro (Ilha de Cananéia - Litoral Sul de São Paulo), até o presente momento pouco estudado. Realizou-se, durante o processo de preparação das pastilhas e nos espectros de I.V. obtidos, algumas medidas quantitativas com o intuito de obter-se maiores informações.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Equipamentos

pH - metro Micronal, B-375, com eletrodo de vidro combinado.

Espectrofotômetro de I.V. Perkin-Elmer, mod. 783.

2.2. Coleta e Preparação da Amostra para Extração

As amostras de solos foram coletadas em depósitos orgânicos de aproximadamente 1,20 m de profundidade, em sítios localizados a aproximadamente 1.200 m do embarcadouro pelo Mar Pequeno em direção ao Centro da Ilha. A Ilha de Cananéia situa-se a 48° de longitude Oeste e 25° de latitude Sul.

O solo foi caracterizado como jovem e de alto teor de matéria orgânica.

Após secagem ao ar, o solo foi desagregado em almofariz e passado em peneira de malha 60 AS. Amostras de aproximadamente 400 g foram tomadas. A seguir o solo foi reidratado e lavado com solução de HCl 0,5N, para extração de carbonatos e íons metálicos.

2.3. Extração, Fracionamento e Purificação

As substâncias húmicas foram extraídas como solução de hidróxido de sódio 0,5N em atmosfera de nitrogênio. O fracionamento e a purificação dos ácidos húmicos e fúlvicos foram efetuados conforme procedimento mostrado na Figura 1.

2.4 - Análise de Grupos Funcionais

A acidez total que é a soma dos grupos COOH e OH fenólicos, presentes nos ácidos húmico e fúlvico, foi determinada pelo método do hidróxido de bário¹⁴. A acidez referente ao grupo carboxílico foi determinada pelo método do acetato de cálcio¹⁴, com algumas modificações introduzidas por Holtzclaw e Sposito¹⁵.

O teor de grupo carbonila foi determinado pelo método da oximação¹⁶.

Aplicou-se o método de Gran¹⁷ na curva de titulação, em todas as determinações, para encontrar o volume no ponto de equivalência.

O grupo metoxila foi determinado pelo método de Ziesel¹⁸, já modificado e adaptado para a escala semi-micro¹⁹. Determinou-se inicialmente o conteúdo de grupo metoxila nos ácidos húmico e fúlvico, que foram posteriormente metilados e o grupo metoxila novamente quantificado. A diferença entre os valores de -OCH₃ presente no material original e material metilado foi mais um método utilizado para determinar a acidez total das substâncias húmicas.

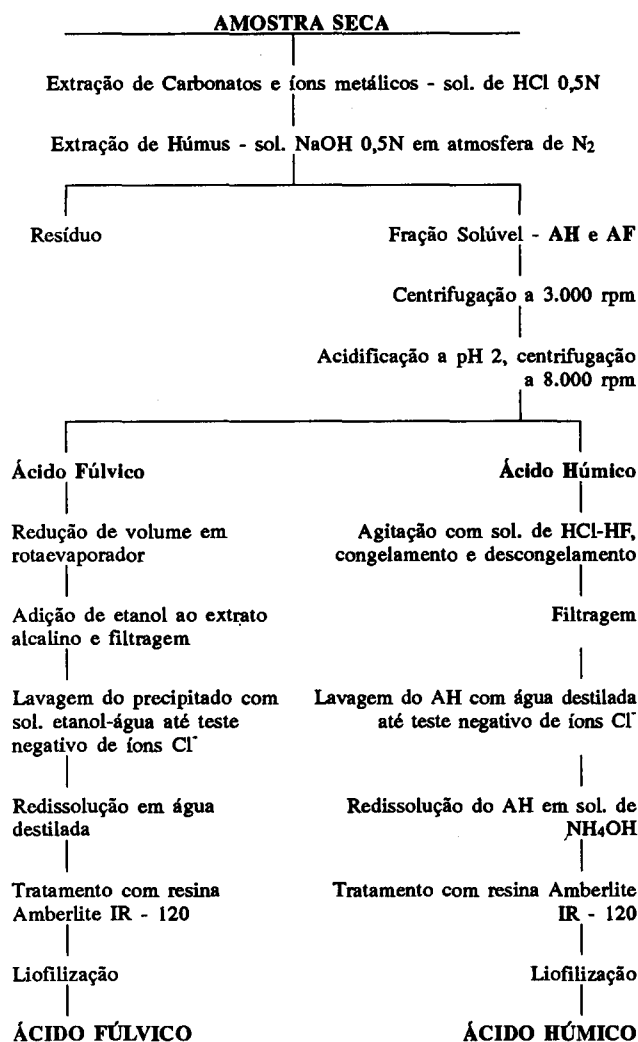


Figura 1. Esquema completo: extração, fracionamento e purificação dos ácidos húmico e fúlvico

2.5. Metilação

Aproximadamente 100 mg dos ácidos húmico e fúlvico foram dissolvidos em metanol e metilados exaustivamente, através da adição lenta de diazometano recém produzido pelo diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluenossulfonamida). O solvente foi evaporado em banho maria a 40°C. Os ácidos metilados foram secos em dessecador a pressão reduzida com pentóxido de fósforo.

2.6. Espectroscopia na região de Infra Vermelho (I.V.)

Os espectros de I.V. das S.H. foram obtidos de pastilhas preparadas com cerca de 200 mg de KBr, pulverizado e seco a 110°C, e 0,5mg do material húmico seco a 60°C por 4h.

As pastilhas de KBr dos ácidos extraídos do solo sítio-2 superfície, foram preparadas conforme condições ideais para evitar a interferência da umidade do ar sem provocar mudanças na estrutura da S.H., descritas por Stevenson e Goh²⁰. Com a finalidade de obter dados quantitativos desses espectros de I.V., procedeu-se conforme descrito a seguir, tomando-se alguns cuidados sugeridos por Pierre e Rouxhet²¹.

Soluções sólidas com KBr e amostra previamente pulverizadas e secas foram preparadas, de concentração $2,50 \times 10^{-3}$ g de soluto/g de solução. Para tal pesou-se $5,00 \times 10^{-3}$ g da substância húmica para 1,99500 g de KBr, que foram pulve-

rizados em gral de ágata. Para obter pastilhas de mesma espessura tomou-se $2,0000 \times 10^{-1}$ g de cada mistura e submeteu-se a pressão de 10 t/cm², durante 5 minutos, em pastilhador de 14 mm de diâmetro. As pastilhas foram secas em pistolas a 100°C por 4h.

Os espectros de I.V. foram fotocopiados 10 vezes, e as bandas de absorções recortadas e pesadas. As áreas das bandas foram calculadas com o valor médio das massas obtidas, em função da massa do papel de uma figura de área conhecida.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espectros de I.V. obtidos para as amostras dos ácidos húmicos e fúlvicos são respectivamente mostrados nas figuras 2 e 3.

A tabela II apresenta algumas bandas características dos espectros de I.V. e as respectivas atribuições a estas bandas citadas na literatura²².

Tabela II. Principais regiões de bandas de absorção encontradas nos espectros de I.V. dos ácidos húmicos e fúlvicos^{22,23}.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
3450 - 3200	estiramento OH ligado por ponte de hidrogênio de fenóis, estiramento N-H, contribuição OH alcoólico
2940 - 2840	estiramento assimétrico C-H de alifáticos
1725 - 1700	estiramento C=O de grupos carboxílicos e derivados, cetonas
~ 1650	estiramento C=O de amidas (amida I)
1630 - 1600	estiramento C=C de anel aromático, estiramento C=O de cetonas conjugadas (-CO-CH ₂ -CO) ou (-CO-C=C-OH), estiramento assimétrico de íons COO ⁻ .
~ 1530	deformação angular N-H de amidas (amida II).
1400 - 1380	deformação angular OH e estiramento C-O de fenóis, deformação angular C-H de grupos CH ₂ , CH ₃ e estiramento simétrico de íon COO ⁻
1280 - 1200	estiramento C-O

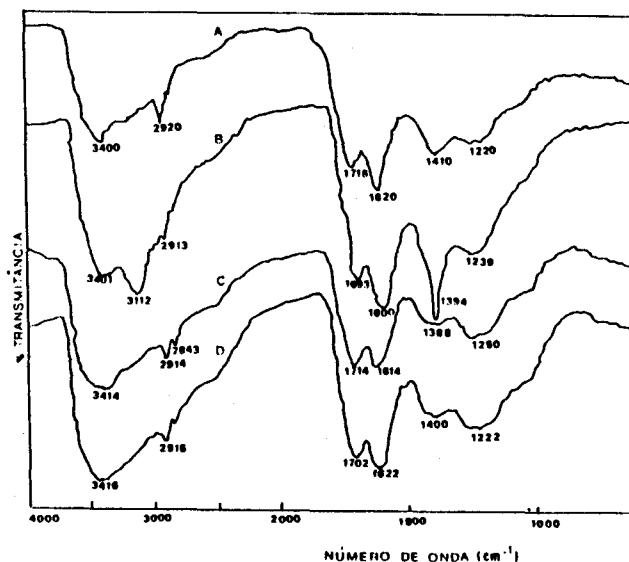


Figura 2. Espectros de I.V. dos ácidos húmicos extraídos do solo. Figura: (A) AH - Sítio 2 (sup), (B) AH - Sítio 2(1,0m) (C) AH - Sítio 5 (sup), (D) AH - Sítio 5 (1,2m).

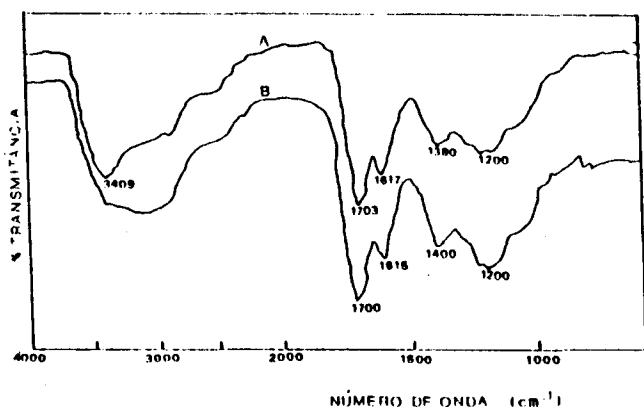


Figura 3. Espectros de I.V. dos ácidos fúlvicos extraídos do solo. Figura: (A) AF Sítio-2 (sup.), (B) AF Sítio - 2 (I,Om)

Os espectros de I.V. apresentavam bandas largas, com as regiões de absorção de cada grupo funcional indefinidas, comuns nos espectros de I.V. das S.H., que pode ser atribuído à extensiva superposição de absorções individuais.

Na figura 4 apresentamos os espectros de I.V. dos ácidos húmico e fúlvico metilados com diazometano.

Os ácidos húmico e fúlvico metilados apresentaram 19,6% e 20,94% respectivamente de grupos metoxilas.

A banda larga de absorção na região de 3300-3400 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação OH, ligado por ponte de hidrogênio²². O espectro do material metilado, cuja pastilha foi seca a 100°C por 4 h, mostrou absorção residual na região de 3400 cm^{-1} , Figuras 4 e 5. Esta pode ser causada por estiramento da ligação N-H e/ou O-H de álcoois e outros, resistentes à metilação.

As bandas de absorções na região de 2900 cm^{-1} mostradas nos espectros de I.V. das Figuras 2 e 5 são atribuídas a ligação C-H de hidrocarbonetos alifáticos, sendo mais intensa em algumas amostras. Esta absorção como a que ocorre na região de 1400 a 1380 cm^{-1} aumenta no material metilado, Figuras 4 e 5, devido a introdução de grupos CH_3 .

A absorção devida à ligação C-H de anel aromático, geralmente ocorre em frequências acima de 3000 cm^{-1} ; a ausência de banda nesta região pode ser causada pela alta substituição dos anéis aromáticos, ou pelo mascaramento através da banda larga resultante do estiramento da ligação OH²². A alta substituição dos anéis parece ser a explicação mais razoável, uma vez que, os espectros de I.V. não apresentaram bandas de absorções abaixo de 900 cm^{-1} também características de anéis aromáticos.

A pronunciada banda de absorção em torno de 1700 cm^{-1} observada nos espectros de I.V. dos ácidos húmicos e fúlvicos, Figuras 2 e 3, pode ser atribuída ao estiramento da ligação C=O de grupos carboxílicos e de cetonas²⁴. Stevenson²² observou que a banda diminui consideravelmente quando a substância húmica é convertida em sal, evidenciando que a maior parte da absorção nesta região é causada pelos estiramentos da ligação C=O de grupo COOH, e que cetonas ou aldeídos podem ser os responsáveis pela absorção residual.

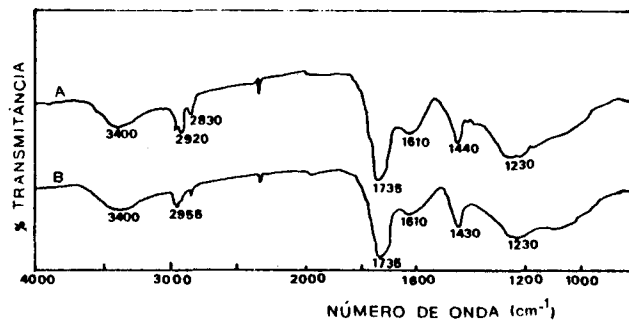


Figura 4. Espectros de I.V. dos ácidos metilados obtidos por pastilhas de KBr secas a 100°C por 4h. Figura: (A) AH-sítio 2 (sup), (B) AF-sítio 2 (sup)

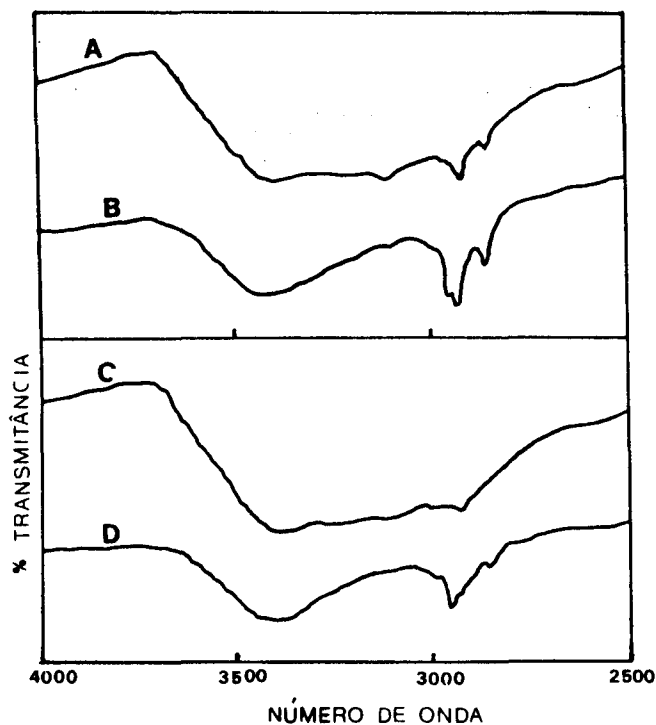


Figura 5. Região do espectro de I.V. que foi obtido por pastilha de KBr seca a 100°C por 4h. Figura A - ácido húmico, B - ácido húmico metilado, C - ácido fúlvico, D - ácido fúlvico metilado.

A presença das funções cetona e aldeído, nas substâncias húmicas, foi confirmada pela determinação quantitativa do grupo carbonila pelo método da oximação, valores mostrados na Tabela III.

A banda de absorção referente ao estiramento C=O no espectro de I.V., se deslocou de 1705 cm^{-1} para 1720 cm^{-1} no material metilado, pois C=O de ésteres absorvem geralmente em regiões mais alta do que os ácidos. As bandas de absorção referentes ao estiramento C=O do ácido, bem como, do éster

Tabela III. Análise dos grupos funcionais contendo oxigênio nos ácidos húmico e fúlvico

Amostra	Acidez total det. com Ba(OH) ₂	Acidez total det. através do grupo OCH ₃	CO ₂ H	OH ácido	C=O	OCH ₃	OCH ₃ após a metilação
AH-sítio 2 (sup)	7,40	6,05	3,60	3,80	1,95	1,12x10 ⁻¹	6,16
FA-sítio 2 (sup)	8,45	6,70	3,89	4,56	1,85	4,88x10 ⁻²	6,75

Tabela IV. Análises elementares e razões atômicas para os ácidos húmicos e fúlvicos.

AMOSTRA	Análise elementar (% m/m)					Razão atômica		
	C	H	N	S	O*	C/H	C/O	C/N
AH-Sítio (sup.)	53,30	3,86	1,91	1,05	39,88	1,16	1,78	32,54
AH-Sítio 2(1,0m)	54,09	3,79	2,16	N.D.	39,96	1,20	1,80	29,20
AH-Sítio 5(sup.)	50,41	3,86	2,00	N.D.	43,73	1,10	1,44	29,39
AH-Sítio 5(1,2m)	50,62	3,82	3,96	N.D.	41,60	1,11	1,62	14,91
FA-Sítio 2(sup.)	45,20	3,48	2,13	1,07	48,12	1,09	1,25	24,75
FA-Sítio 2(1,0m)	44,93	3,40	2,11	N.D.	49,56	1,11	1,21	24,83
AH-Sítio 2(sup.)met	61,22	4,98	1,10	N.D.	32,70	1,03	2,49	64,90
FA-Sítio 2(sup.)met	51,81	4,42	1,92	N.D.	41,85	0,98	1,65	36,31

* Valores obtidos por diferença para 100%.

apresentam-se em regiões mais baixas que o normal, o que pode ser atribuído à conjugação do grupo com outras ligações duplas na molécula ou mesmo com anéis aromáticos.

A absorção na região de 1630 a 1600 cm^{-1} , nos espectros de I.V. de substâncias húmicas, é normalmente atribuída à vibração envolvendo o estiramento das ligações C=C de anel aromático^{22,24}. Entretanto, poderia ser atribuída a ligações duplas de alcenos conjugados e a ligações C=O de quinonas, que absorvem entre 1690 a 1635 cm^{-1} , mas podem deslocar para frequências menores quando ligados por pontes de hidrogênio²². Com a metilação dos grupos OH a banda referente a absorção do estiramento C=O de quinona deveria absorver na região de 1690 a 1635 cm^{-1} , devido a ausência de pontes de hidrogênio. No entanto, os espectros de I.V. dos ácidos metilados, Figura 4, não apresentaram bandas de absorção nesta região.

Os espectros de I.V. dos ácidos húmicos estudados foram classificados como do tipo I, não apresentaram bandas em torno de 1650 cm^{-1} (estiramento C=O de amidas) e em 1530 cm^{-1} (deformação N-H de amida), que são bandas características de espectros de I.V. do tipo III²². Pain e outros²³, observaram estas bandas nos espectros de I.V. de melaminas produzidas por fungos isolados de solos, e não as encontraram nos espectros de I.V. de ácidos húmicos extraídos de solos.

Os espectros de I.V. dos ácidos metilados apresentaram em relação aos espectros de I.V. do material original, um aumento da área da banda de absorção em 1720 cm^{-1} , acompanhada por um concomitante decréscimo da área da banda de absorção em 1620 cm^{-1} , conforme a Figura 6.

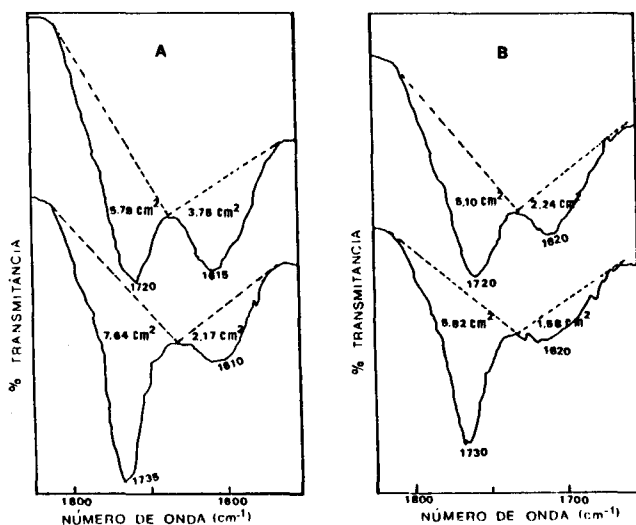


Figura 6. Alterações de áreas das bandas dos espectros de I.V. Figura: (A) ácido húmico e ácido húmico metilado, (B) ácido fúlvico e ácido fúlvico metilado.

Isto já foi observado por outros pesquisadores^{22,24} e várias explicações têm sido dadas, incluindo-se:

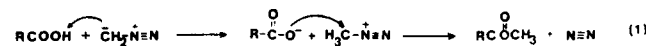
1. Alguns grupos C=O de ácidos carboxílicos ligados por pontes de hidrogênio poderiam estar absorvendo em 1620 cm^{-1} , com a metilação os ésteres formados passariam a absorver em frequência mais alta, 1720 cm^{-1} .
2. Faner e Morrison²⁵ sugerem que ocorre na verdade uma alteração no formato da banda de absorção em 1720 cm^{-1} , pois o estiramento C=O de ácidos carboxílicos devido aos vários graus de ligações por pontes de hidrogênio, apresentam banda absorção muito larga, enquanto os produtos esterificados absorvem numa faixa mais estreita, resultando em uma banda fina e intensa.
3. Eliminando-se a contribuição dos íons carboxilatos na absorção em 1620 cm^{-1} , pela metilação, os ésteres formados iriam absorver na região de 1720 cm^{-1} .

Acreditamos ser a primeira hipótese a mais provável, devido as observações feitas por Baes e Bloom²⁶, de que o estiramento C=O de compostos como os ácidos salicílicos e 2,4-dihidroxibenzoico absorvem em 1660 e 1650 cm^{-1} respectivamente, enquanto, o estiramento C=O do ácido 1,3-benzenodicarboxílico que não faz ponte de hidrogênio intramolecular, absorve em 1720 cm^{-1} . Se deslocamentos na frequência de absorção da ordem de 60 a 70 cm^{-1} ocorrem em relação à absorção da carboxila de compostos muito simples, parece-nos que seria possível que deslocamentos da ordem de 100 cm^{-1} possam ocorrer nas substâncias húmicas.

Com os resultados obtidos neste trabalho, para as áreas das bandas em 1720 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} , a Figura 6, rejeitamos a segunda explicação.

Quanto à terceira hipótese entendemos que o íon carboxilato não possa reagir com o diazometano, considerando que a reação de metilação envolve a transferência de um próton ácido para a base, ver reação 1.

Os valores mostrados na tabela III indicam que o ácido fúlvico possui um maior conteúdo de grupos OH fenólicos e



uma acidez total superior ao ácido húmico. Os valores obtidos para a acidez total pelo método do hidróxido de bário são superiores aos obtidos através do grupo metoxila. Considerando verdadeiros os valores da acidez total fornecidos pelo método do $\text{Ba}(\text{OH})_2$, a percentagem de grupos OH ácidos, que foram metilados, no ácido fúlvico foi ligeiramente inferior a do ácido húmico, 79 e 82% respectivamente. Segundo Baes e Bloom²⁶ há um maior número de grupos OH fenólicos, ligados por pontes de hidrogênio, no ácido fúlvico do que no ácido húmico. Estes dados mais o fato de que os espectros de I.V. dos ácidos metilados, Figuras 4 e 5, apresentam banda de absorção na região de 3400 cm^{-1} , evidenciam que os grupos

OH ligados por pontes de hidrogênio apresentam resistência à metilação com diazometano.

O ácido fúlvico apresentou de acordo com os valores da tabela IV cerca de 16% menos átomos de carbono, 10% menos átomos de hidrogênio e 18% mais átomos de oxigênio do que o ácido húmico. Estes resultados e os mostrados na tabela III evidenciam o menor peso molecular do ácido fúlvico em relação ao ácido húmico, e maior grau de substituição por grupos ácidos (OH, COOH).

REFERÊNCIAS

1. Stevenson, F.J.; "Extraction, Fractionation, and General Chemical Composition of Soil Organic Matter". In: *Humus Chemistry*, John Wiley & Sons (1982), New York, cap. 2, p. 36-47.
2. Stevenson, F.J.; "Biochemistry of the Formation of Humic Substances". In: *Humus Chemistry*, John Wiley (1982), New York, cap. 8, p. 195-219.
3. Flaig, W.; "The Chemistry of Humic Substances". In: *The use of isotopes in soil Organic Matter Studies*. Report of FAO/IAEA Technical Meeting (1966), New York. p. 103-127.
4. Hurst, H.M. & Burges, N.A.; "Lignin and Humic Acids". In: McLaren, A.D. & Peterson, G.H.; *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker (1967), New York. p. 260-286.
5. Kononova, M. M.; *Soil Organic Matter*. Pergamon Press (1966), Oxford.
6. Barton, D.H.R.; Schnitzer, M.; *Nature* (1963), **198**, 217.
7. Ogner, G.; Schnitzer, M.; *Can. J. Chem.* (1971), **49**, 1053.
8. Khan, S.U.; Schnitzer, M.; *Can. J. of Soil Science* (1971), **49**, 2302.
9. Schnitzer, M.; Khan, S.U., *Humic Substances in the Environment*, Marcel Decker (1972), New York, p. 327.
10. Ertel, J.R.; Hedges, J.I.; *Geochim. Cosmochim. Acta* (1984), **48**, 2065.
11. Stevenson, F.J.; "Colloidal Properties of Humic Substances." In: *Humus Chemistry*, John Wiley & Sons (1982), New York. Cap. 12, p. 285-307.
12. Cloudry, C.G.; "Structural Aspects, and Photophysical, Photochemical and Free Radical Characteristic". In: *Handbook of Environmental Chemistry*, O. Hutzinger, volume 1, part C.
13. Calderoni, G.; Schnitzer, M.; *Geochim. Cosmochim. Acta* (1984), **48**, 2045.
14. Schnitzer, M.; Gupta, U.C.; *Soil Sci. Soc. Proc.* (1965), 274.
15. Holtzclaw, K.M.; Sposito, G.; *Soil Sci. Soc. Am. J.*(1979) **43**, 318.
16. Fritz, J.S.; Yamamura, S.S.; Bradford, E.C.; *Anal. Chem.* (1959), **31**, 260.
17. Rossotti, F.J.C.; Rossotti, H.; *J. Chem. Educ.* (1965), **42**, 375.
18. Zeisel, S.; *Montsh* (1885), **6**, 989; (1886), **7**, 406.
19. Clark, E.P.; *J. Assoc. Offic. Agr. Chemistry* (1932), **15**, 136.
20. Stevenson. F.J.; Goh, K.M.; *Soil Science* (1974), **117**, 34.
21. Pirre, L.R.; Rouxhet, P.G.; *Fuel* (1976), **55**, 177.
22. Stevenson, F.J.; "Spectroscopic Approaches". In: *Humus Chemistry*, John Wiley & Sons (1982), New York. Cap. 11, p. 264-283.
23. Paim, S.; Linhares, L.F.; Mangrich, A.S.; Martin, J.P.; *Biol. Fertil. Soil* (1990), **10**, 72.
24. Schnitzer, M.; "Characterization of Humic Constituents by Spectroscopy". In: McLaren, A.D. & Skuyins; *J. Soil Biochemistry*, Marcel Dekker (1971), New York, Vol. 2. p. 60-95.
25. Farmer, V.C.; Morrison, R.I.; *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. A.* (1960), **1**, 85.
26. Baes, A.V.; Bloom, P.R.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* (1989), **53** 695.