

**Ácidos húmicos: A dinâmica de mineralização durante biorremediação por
vermicompostagem de solos contaminados por diesel**

**Humic acids: The dynamics of mineralization during bioremediation by
vermicomposting of soils contaminated by diesel**

**Ácidos húmicos: La dinámica de mineralización durante biorremediación por
vermicompostaje de suelos contaminados por diesel**

Recebido: 24/05/2019 | Revisado: 27/05/2019 | Aceito: 31/05/2019 | Publicado: 02/06/2019

Jussara Aparecida de Oliveira Cotta

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6914-1176>

Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil

E-mail: japcotta@hotmail.com

Resumo

Esse estudo teve como primórdio investigar ácidos húmicos extraídos de solos contaminados por compostos derivados de petróleo e que passaram por biorremediação aplicando vermicompostagem. O desenvolvimento desta pesquisa visa responder as seguintes questões: Durante a biorremediação houve a mineralização do substrato? Os ácidos húmicos extraídos dos solos mostraram acentuadas diferenças na composição química após 90 dias do processo de biorremediação? A justificativa da pesquisa está no fato de, até o momento, ter poucos estudos a cerca da caracterização química de ácidos húmicos extraídos de solos que passaram por biorremediação utilizando vermicompostagem. Na dinâmica de biorremediação de solos contaminados usando espécies *Eisenia foetida* há a passagem da matéria orgânica dita ativa para a sua forma estabilizada, produzindo assim as substâncias húmicas. Uma forma de acompanhar a dinâmica de degradação é estudando a variação do teor de matéria orgânica, carbono, nitrogênio, e outros. Para alcançar os objetivos empregaram-se várias técnicas analíticas para verificar as diferenças na composição química dos ácidos húmicos, dentre elas à espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível e a espectroscopia no IV. Ao término, pelos principais resultados, observam-se alterações qualitativas e quantitativas na composição dos ácidos húmicos. Os resultados mostram uma diminuição na razão C/N. Os grupos funcionais foram os mais sensíveis às mudanças causadas pelo processo, evidenciada pelo aumento na acidez total. Pelos espectros no infravermelho foi possível visualizar uma

clara diminuição na intensidade das bandas na região 3923-2850 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos alifáticos, evidenciando a dinâmica de humificação durante a biorremediação.

Palavras chave: solos contaminados; compostos de petróleo; humificação.

Abstract

This study had as a primordium to investigate humic acids extracted from soils contaminated by compounds derived from petroleum and that have undergone bioremediation applying vermicomposting. The development of this research aims to answer the following questions: During the bioremediation was the mineralization of the substrate? The humic acids extracted from the soils showed marked differences in the chemical composition after 90 days of the bioremediation process? The justification of the research is that, to date, there have been few studies about the chemical characterization of humic acids extracted from soils that have undergone bioremediation using vermicomposting. In the dynamics of bioremediation of contaminated soils using *Eisenia foetida* species there is the passage of the active organic matter to its stabilized form, thus producing the humic substances. One way of monitoring the dynamics of degradation is by studying the variation of organic matter, carbon, nitrogen, and others. In order to reach the objectives, several analytical techniques were used to verify the differences in the chemical composition of the humic acids, among them to the ultraviolet/visible absorption spectroscopy and the spectroscopy in the IV. At the end, the main results show qualitative and quantitative changes in the composition of humic acids. The results show a decrease in the C / N ratio. The functional groups were the most sensitive to the changes caused by the process, evidenced by the increase in total acidity. By the infrared spectra it was possible to visualize a clear decrease in the intensity of the bands in the region 3923-2850 cm^{-1} , corresponding to the aliphatic stretches, evidencing the dynamics of humification during bioremediation.

Keywords: Contaminated soils; petroleum compounds; humification.

Resumen

Este estudio tuvo como primordio investigar ácidos húmicos extraídos de suelos contaminados por compuestos derivados de petróleo y que pasaron por biorremediación aplicando vermicompostaje. El desarrollo de esta investigación pretende responder a las siguientes cuestiones: Durante la biorremediación hubo la mineralización del sustrato? ¿Los ácidos húmicos extraídos de los suelos mostraron acentuadas diferencias en la composición química después de 90 días del proceso de biorremediación? La justificación de la investigación está en el hecho de, hasta el momento, tener pocos estudios a cerca de la caracterización química de ácidos húmicos extraídos de suelos que pasaron por biorremediación utilizando vermicompostaje. En la dinámica de biorremediación de suelos contaminados usando especies *Eisenia foetida* hay el paso de la materia orgánica dicha activa a

su forma estabilizada, produciendo así las sustancias húmicas. Una forma de acompañar la dinámica de degradación es estudiar la variación del contenido de materia orgánica, carbono, nitrógeno, y otros. Para alcanzar los objetivos se emplearon varias técnicas analíticas para verificar las diferencias en la composición química de los ácidos húmicos, entre ellas a la espectroscopia de absorción en la región del ultravioleta y visible y la espectroscopia en el IV. Al término, por los principales resultados, se observan alteraciones cualitativas y cuantitativas en la composición de los ácidos húmicos. Los resultados muestran una disminución en la razón C / N. Los grupos funcionales fueron los más sensibles a los cambios causados por el proceso, evidenciada por el aumento en la acidez total. Por los espectros en el infrarrojo fue posible visualizar una clara disminución en la intensidad de las bandas en la región 3923-2850 cm^{-1} , correspondientes a los estiramientos alifáticos, evidenciando la dinámica de humificación durante la biorremediación.

Palabras clave: Suelos contaminados; compuestos de petróleo; humectación.

1. Introdução

Na dinâmica de biorremediação de solos contaminados usando espécies *Eisenia foetida* há a passagem da matéria orgânica dita ativa para a sua forma estabilizada, produzindo assim as substâncias húmicas. Sendo assim, durante a mineralização há uma diminuição da matéria orgânica ativa e um aumento do teor de ácidos húmicos. Uma forma de acompanhar a dinâmica de degradação é estudando a variação do teor de matéria orgânica, carbono, nitrogênio, e outros. Sabe-se que as substâncias húmicas têm poder aglomerante, unindo-se à fração mineral, gerando bons flocos no solo, que dão origem a estruturas estáveis na forma de grumos, de elevada porosidade e permeabilidade. Estas substâncias têm grande capacidade de retenção de água pelo solo, o que facilita a fixação da vegetação, dificultando a ação dos agentes erosivos. O húmus tem ainda propriedades coloidais, devido ao seu tamanho e carga. Influi no pH, produzindo compostos orgânicos que tendem a acidificar o solo.

Devido à importância das substâncias húmicas para a dinâmica natural do solo surge o interesse e o objetivo desse estudo que é investigar os ácidos húmicos extraídos dos solos contaminados com diesel e que passaram por biorremediação aplicando vermicompostagem, com o intuito de monitorar a dinâmica de mineralização durante a degradação. Os ácidos húmicos foram extraídos dos solos e caracterizados qualitativamente e quantitativamente no início e após 90 dias, através de análise elementar, espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível e no infravermelho.

A seguir, será descrita as principais fundamentações a cerca das substâncias húmicas, e suas diferentes frações obtidas por extração com base nas suas solubilidades em meio

aquoso. E será visto, ainda, as principais técnicas analíticas para verificar as diferenças na composição de ácidos húmicos.

2. Substâncias Húmicas

Na matéria orgânica encontram-se dois tipos de substâncias: a denominada matéria orgânica ativa, que ainda não se decompõe e a matéria orgânica inativa ou estabilizada, não mais sujeita a decomposições intensas. Durante o processo de decomposição, ou seja, de mineralização da matéria orgânica pelo processo da vermicompostagem, haverá liberação de elementos químicos, como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, os quais deixam a forma orgânica, dita imobilizada, para passarem à forma assimilável de nutrientes para as plantas. Alguns componentes da matéria orgânica são utilizados pelos microorganismos e ou minhocas para formação de seus tecidos, outros são volatilizados e outros são transformados biologicamente em substância escura, uniforme com consistência amanteigada e aspecto de massa amorfa, rica de partículas coloidais, proporcionando a esse novo material formado propriedades físicas e químicas inteiramente diferentes das da matéria-prima original. A essa substância dá-se a denominação de húmus. O húmus é praticamente insolúvel em água, embora boa parte possa entrar em suspensão coloidal, e é solúvel em álcalis (Kiehl, 1985).

As substâncias húmicas não apresentam características químicas e físicas bem definidas, ou seja, apresentam estruturas complexas, constituídas de estruturas poliméricas amorfas em vários graus de polidispersão, caráter ácido, predominantemente aromático, hidrofílicas, natureza polieletrólítica e massa molecular entre algumas centenas até milhares. Assim as substâncias húmicas, que se constituem de ácido húmico, ácido fúlvico e humina, pertence a um grupo heterogêneo de compostos originários da degradação química e biológica de resíduos de plantas e da atividade metabólica de microrganismos (Kononova, 1966 e Stevenson, 1994), e são consideradas macromoléculas amorfas que podem existir como partículas tridimensionais ou como envoltório de partículas minerais (Atiyeh, Lee, Edwards, Arancon & Metzger, 2002). Atualmente, a definição mais aceita é de que substâncias húmicas são biopolímeros, possuindo alto poder de interagir com íons metálicos e moléculas orgânicas de baixa massa molecular (Messias, 2004). Suas propriedades físico-químicas estão relacionadas à conservação do solo, complexação, transporte e biodisponibilidade de metais, interação com pesticidas (Kononova, 1966; Mitchell, 1997).

Em termos de composição química, as substâncias húmicas apresentam anéis aromáticos substituídos, os quais são geralmente grupos carboxílicos, hidroxílicos e

carbonílicos. Em termos de propriedades físicas, as substâncias húmicas são materiais de cargas variáveis, nos quais os grupos carboxílicos e fenólicos dissociam-se gradualmente quando do aumento de pH. Isto leva à formação de cargas negativas que criam sítios trocadores de cátions.

As principais características dos ácidos húmicos são a sua habilidade em interagir com argilas minerais e compostos orgânicos, e de formar complexos solúveis e insolúveis em água, com íons e óxidos hidratados de metais. A presença de cargas elétricas na estrutura macromolecular dos ácidos húmicos desenvolve características polieletrólíticas que permitem formar ligações de hidrogênio com as águas de hidratação dos cátions metálicos, bem como interações eletrostáticas mais fracas como forças de Van Der Waals (Sposito & Weber, 1986). As propriedades polieletrólíticas das substâncias húmicas têm um importante papel no ambiente pela sua influência na especiação de íons metálicos e devido ao fato de se ligarem com poluentes orgânicos muitas vezes contribuindo para degradá-los.

As substâncias húmicas são usualmente fracionadas com base nas suas solubilidades em meio aquoso. As frações obtidas por esse meio incluem: ácidos fúlvicos: fração solúvel em meios alcalino e ácido; ácidos húmicos: fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido ($\text{pH} < 2$); humina: fração insolúvel em qualquer condição de pH. Cada uma dessas frações é apresentada como uma mistura heterogênea e complexa, geralmente com estruturas irregulares e com uma grande variedade de massas moleculares. A solubilização dos ácidos húmicos em meio alcalino se deve à conversão dos grupos ácidos (principalmente carboxílicos e fenólicos) em íons. A repulsão eletrostática entre os íons formados e as argilas (também carregadas negativamente) e a repulsão intramolecular, que leva a uma conformação menos “enovelada” dos ácidos húmicos, facilita sua hidratação. Ressalta-se, porém, que sais (humatos) de cátions polivalentes não são solúveis (Messias, 2004).

A conformação estrutural das substâncias húmicas depende principalmente de aspectos como pH, concentração iônica do meio e grau de complexação dos grupamentos. O percentual de material húmico extraído varia consideravelmente de um tipo de matriz para outro e, em geral, é maior quando se aumenta o pH do extrator e a temperatura de extração. De acordo com Stevenson (1994), o método de extração ideal seria aquele que permitisse o isolamento dos ácidos húmicos inalterados, livres de contaminantes e representativos de toda a amplitude de massas moleculares, e que fosse aplicável a qualquer tipo de matriz.

Messias (2004) utilizou-se de várias técnicas analíticas para verificar as diferenças na composição de ácidos húmicos extraídos de turfa e vermicomposto. Os primeiros experimentos para determinação da composição elementar das substâncias húmicas foram

feitos por Sprengel e Berzelius entre os anos de 1826 e 1845 (Stevenson, 1994). Segundo eles, as substâncias húmicas eram constituídas essencialmente de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, sendo C e O os elementos mais abundantes. Os métodos para determinação desses elementos são muito variados, dentre eles os métodos químicos, por exemplo, nitrogênio pelo método Kjeldahl (Cotta, Landgraf, & Rezende, 2007), e por analisadores elementares automáticos (Skoog, Holler & Timothy, 2002).

A determinação de acidez em ácidos húmicos é um importante passo na sua caracterização, pois indica o número de grupos ácidos (carboxílicos e fenólicos) presentes na estrutura. O método mais utilizado baseia-se em titulação potenciométrica indireta, com hidróxido de bário (para acidez total) e acetato de cálcio (para acidez carboxílica) (Schnitzer & Gupta, 1965; Schnitzer & Khan, 1972) e é o mais utilizado para substâncias húmicas (Landgraf, Silva & Rezende, 1998; Poppi & Talamoni, 1992).

Através da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível, é possível calcular a razão E4/E6. Essa razão é um primeiro indicativo da proporção de grupos aromáticos. Quanto maior a aromaticidade, menor a razão E4/E6 (Messias, 2004).

Estudos de espectroscopia no IV sobre o ácido húmico de vermicomposto proveniente de esterco bovino mostraram acentuadas diferenças na composição desse material quando comparado com o ácido húmico de turfa ou solo (Landgraf, Alves, Silva & Rezende, 1999). A espectroscopia no IV permite obter informações sobre a natureza, a reatividade e o arranjo estrutural dos grupos funcionais (principalmente funções oxigenadas) presentes nas substâncias húmicas, avaliar os efeitos provocados por modificação química, tais como metilação e acetilação, estabelecer a presença ou a ausência de impurezas inorgânicas (metais, argilo-minerais) e analisar interações entre as substâncias e compostos orgânicos ou metais. As possíveis atribuições das principais bandas de absorção usualmente observadas nos espectros no IV dos ácidos húmicos são reportadas por Messias (2004): 3400 – 3300 cm^{-1} : estiramento de O–H; 3077 – 3030 cm^{-1} : estiramento de C–H de aromáticos e olefinas (pode estar encoberto pela banda de estiramento de O–H); 2940 – 2840 cm^{-1} : estiramento simétrico e assimétrico de C–H alifático; 2750 – 2400 cm^{-1} : estiramento de O–H de grupos carboxílicos; 1725 – 1720 cm^{-1} : estiramento de C=O de ácidos carboxílicos; 1660 – 1630 cm^{-1} : estiramento de C=O de amidas e quinonas e de cetonas conjugadas com ligação de hidrogênio; 1650 – 1580 cm^{-1} : estiramento simétrico de C=O de íons carboxilatos; 1630 – 1600 cm^{-1} : estiramento de C=C aromático; 1590 – 1520 cm^{-1} : deformação de N–H de amidas e estiramento C=N; 1500 – 1400 cm^{-1} : estiramento de C=C aromático; 1400 – 1380 cm^{-1} : estiramento de C–O fenólico, deformação de O–H carboxílico, deformação de C–H alifático e

estiramento assimétrico de C=O de carboxilatos; 1280 – 1200 cm^{-1} : estiramento de C–O de éteres, ésteres e fenóis e deformação de O–H carboxílico; 1170 – 1000 cm^{-1} : estiramento de C–O de estruturas polissacarídicas; 1050 – 950 cm^{-1} : estiramento de C–O de estruturas polissacarídicas e estiramento de Si–O (impurezas do tipo silicato); 950 – 670 cm^{-1} : deformação no plano e fora do plano de C–H aromático.

Stevenson (1994) classificou os espectros de substâncias húmicas em 3 tipos. Os espectros de tipo I são caracterizados por bandas de absorção fortes e evidentes em 3400, 2900, 1720, 1600 e 1200 cm^{-1} . A absorção na região de 1600 cm^{-1} possui intensidade semelhante à absorção em 1200 cm^{-1} . Os espectros do tipo III apresentam as mesmas absorções características dos espectros do tipo I, com a diferença de uma absorção em 2900 cm^{-1} mais intensa e com o aparecimento de uma absorção forte em 1540 cm^{-1} . Os espectros do tipo II são característicos de moléculas húmicas de menor massa molecular (ácidos fúlvicos) e apresentam, além dessas absorções, uma absorção muito intensa em 1720 cm^{-1} .

3. Metodologia

Acerca do enfoque, esta pesquisa pode ser compreendida como de cunho quantitativo, pois gráficos e tabelas foram gerados durante a execução da investigação. A pesquisa quantitativa se centra na objetividade. Influenciada pelo positivismo, considera que a realidade só pode ser compreendida com base na análise de dados brutos, recolhidos com o auxílio de instrumentos padronizados e neutros. A pesquisa quantitativa recorre à linguagem matemática para descrever as causas de um fenômeno, as relações entre variáveis, etc. Quanto aos procedimentos técnicos, a pesquisa pode ser classificada como experimental, uma vez que para alcançar os objetivos, análises químicas foram essenciais. De modo geral, o experimento representa o melhor exemplo de pesquisa científica. Essencialmente, o delineamento experimental consiste em determinar uma matriz de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz na matriz. Os principais autores que serviram como suporte para esta pesquisa são Dores-Silva, Cotta, Landgraf e Rezende (2019), Dores-Silva, Cotta, Landgraf e Rezende (2018), Messias (2004), Domeizel, Khalil e Prudent (2004), Cegarra, García e Roig (2002), Atiyeh, Edwards, Subler e Metzger (2001), Landgraf, Alves, Silva e Rezende (1999), Sanchez-Monederoe Prudent, Domeizel, Massiani e Thomas (1995), Kayhanian e Tchobanoglous (1993), Hervas, Mazuelos, Senesi e Saiz-Jimenez (1989). A coleta de dados foram realizadas a partir de observações experimentais.

A técnica de observação geralmente é utilizada como uma parte importante no desenvolvimento da pesquisa e é organizada para registrar as informações obtidas durante a sua execução. A vantagem de usar a técnica é que os fatos são percebidos diretamente, sem qualquer intermediação. A desvantagem é que a presença do pesquisador pode alterar as atividades normais executadas pelas pessoas que estão sendo observadas. A observação pode ser simples, participante e pode ser aplicada em um período de tempo. (Pereira, Shitsuka, Parreira & Shitsuka, 2018).

Os trabalhos dos autores Messias (2004), Atiyeh, *et al.* (2001), Kayhanian e Tchobanoglous (1993) dão suporte a análise dos resultados.

3.1 Descrição experimental

Os experimentos para a biorremediação de solos contaminados com diesel aplicando vermicompostagem foram realizados conforme descrito por Dores-Silva *et al.* (2019) e Dores-Silva *et al.* (2018). O solo foi dopado com diesel e homogeneizado, com objetivo de alcançar um teor de 2% v/v diesel ao solo. Os tratamentos foram montados em caixas com dimensões de 0,70 m x 0,70 m x 0,70 m. A vermicompostagem foi realizada em diferentes porcentagens de esterco bovino, onde (I) corresponde ao tratamento com 0% de esterco bovino e 100% de solo (sem minhoca - controle); (II) 25% de esterco bovino e 75% de solo; (III) 50% de esterco bovino e 50% de solo; (IV) 60% de esterco bovino e 40% de solo; (V) 75% de esterco bovino e 25% de solo e (VI) 100% de esterco bovino e 0% de solo (controle de reprodução). Três caixas foram usadas para cada um dos seis tratamentos. Quatrocentos vermes das espécies de *Eisenia fetida* foram adicionados a cada caixa (exceto aqueles em tratamento I). O local em que o solo utilizado no estudo foi coletado e a localização da estação experimental foi à estância Santa Isabel, município de São Carlos, estado de São Paulo, na rodovia SP215, Km 140. As características físicas e químicas do solo estudado foram previamente descritas por Dores-Silva *et al.* (2018). As minhocas jovens das espécies *Eisenia fetida* foram adquiridas na estação experimental e tinham uma massa média de 0,200 g.

3.2 Extração e purificação do ácido húmico

A extração do ácido húmicos foi realizada nas amostras do tempo 0 h (1º dia) e após o 90º dia de biorremediação. Os tratamentos (I, II, III, IV e V) foram realizados em triplicata, e

5 amostras independentes foram coletadas para cada experimento individual. Para a análise de dados numéricos utilizou-se técnica estatística calculando a média e desvio padrão.

Os ácidos húmicos foram extraídos e purificados de acordo com a metodologia convencional estabelecida pela Sociedade Internacional para Substâncias Húmicas, baseada em solubilidade em solução alcalina de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e precipitação em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. A quantidade extraída de ácido húmico (%) foi calculada segundo a expressão: %AH = 100*p₁/p, onde: %AH = quantidade extraída de ácido húmico; p= massa (em g) de amostra ao natural; p₁= massa (em g) da amostra extraída. Os valores da quantidade extraída de ácido húmico foram corrigido para base seca e sem cinzas (valor corrigido = valor original x 100 ÷ (100 – teor de umidade – teor de cinzas). O teor de cinzas corresponde à quantidade de matéria inorgânica, especialmente sílica e metais, presentes no ácido húmico. Esse valor reflete na eficiência da extração e purificação. Valores altos de cinzas podem comprometer a interpretação da análise elementar. O teor de cinzas foi calculado seguindo a equação: $C = 100 m/m_0$, em que: C = teor de cinzas (em %); m = massa (em miligramas) da amostra após calcinação; m₀ = massa (em miligramas) da amostra total.

3.3 Análises Elementares

As análises Elementares (CHNS) foram realizadas em um analisador elementar Carbo Erba Instruments EA 1110 CHNS-O, em que foram utilizados os seguintes padrões: L-cistina, sulfanilamida, DL-metionina e BBOT (2,5-bis-(5-*tert*-butil-benzoxazol-2-il)-triofeno). Os valores de C, H, N e S (porcentagem em massa) foram corrigidos para base sem cinzas (valor corrigido = valor original x 100 ÷ (100 - teor de cinzas)). O teor de oxigênio foi determinado por diferença a 100% a partir dos valores de C, H, N e S corrigidos. Os parâmetros H/C, O/C, C/N e (O + N)/C foram determinados pelas razões atômicas, ou seja, dividindo-se previamente as porcentagens em massa dos elementos por suas respectivas massas atômicas.

3.4 Acidez total

Uma amostra de 100 mg juntamente com 10 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de hidróxido de bário (Ba(OH)₂) foram submetidos à agitação por 24 horas a temperatura ambiente (passou-se um fluxo de nitrogênio antes da agitação). Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum, sendo coletados 5 mL do filtrado, que foi titulado

potenciometricamente com uma solução padrão de HCl 0,05 mol L⁻¹. O ponto de equivalência foi determinado em pH 8,4. A acidez total foi calculada pela equação:

$$A_T = \frac{(V_{branco} - V) \cdot C_a}{m_{AH}} \cdot \frac{V_{base}}{V_{aliquota}}$$

em que: A_T = acidez total (em mmol_c g⁻¹); V_{branco} = volume de HCl usado na titulação do branco; V = volume de HCl usado na titulação da amostra; C_a = concentração da solução de HCl; m_{AH} = massa de ácido húmico; V_{base} = volume total de Ba(OH)₂ utilizado (10 mL); $V_{aliquota}$ = volume da alíquota utilizado na titulação (5 mL).

3.5 Acidez carboxílica

Uma amostra de 50 mg juntamente com 20 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de acetato de cálcio (Ca(CH₃COO)₂) foram então submetidos à agitação por 24 horas à temperatura ambiente (passou-se um fluxo de nitrogênio antes da agitação). Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum, sendo coletados 10 mL do filtrado, que foi titulado potenciometricamente com uma solução padrão de NaOH 0,05 mol L⁻¹. O ponto de equivalência foi determinado em pH 9,8. A acidez total foi calculada pela equação.

$$A_C = \frac{(V - V_{branco}) \cdot C_b}{m_{AH}} \cdot \frac{V_{acetato}}{V_{aliquota}}$$

em que: A_C = acidez carboxílica (em mmol_c g⁻¹); V = volume de NaOH usado na titulação da amostra; V_{branco} = volume de NaOH usado na titulação do branco; C_b = concentração da solução de NaOH; m_{AH} = massa de ácido húmico; $V_{acetato}$ = volume total de acetato de cálcio utilizado (20 mL); $V_{aliquota}$ = volume da alíquota utilizado na titulação (10 mL).

A determinação da acidez fenólica foi feita por diferença entre a acidez total e a acidez carboxílica.

3.6 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta/Visível

Cerca de 5,0 mg de ácido húmico purificado foram dissolvidos em 50,0 mL de uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,025 mol L⁻¹, com pH 8,4. As medidas de absorvância da solução foram obtidas a partir do espectro na região do visível, utilizando um espectrofotômetro de UV-Visível modelo V-630 da marca Jasco. Com os valores de absorvância nos comprimentos de onda 465 e 665 nm, calculou-se a razão E_4/E_6 .

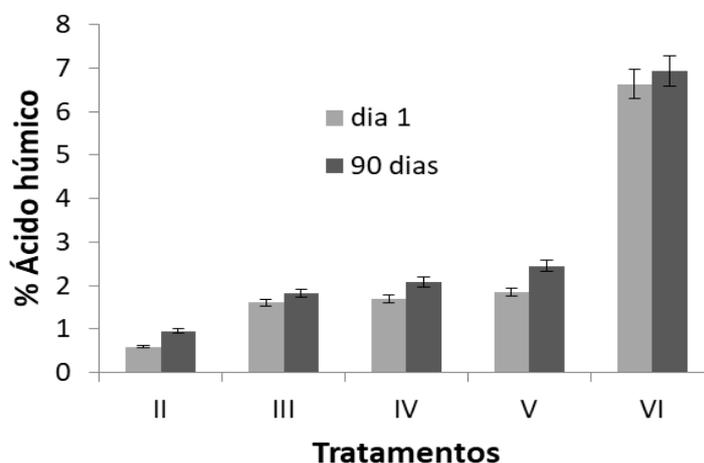
3.7 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)

Os ácidos húmicos foram analisados em um espectrofotômetro com transformada de Fourier da marca Bomem MB-102. Efetuaram-se, para cada análise, 32 varreduras de 4000 a 300 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

4. Resultados e discussão

A figura 1 mostra os teores de ácidos húmicos extraídos dos solos contaminados com diesel que passaram por biorremediação aplicando vermicompostagem.

Figura 1: Teor de ácido húmico (%).



Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Os teores de ácidos húmicos aumentaram em todos os tratamentos, indicando a estabilização da matéria orgânica, com maior conteúdo de carbono na forma humificada. A ação das minhocas alteram qualitativa e quantitativamente a composição das substâncias húmicas e dos materiais orgânicos. A ação conjunta dos microorganismos e das minhocas inicia uma rápida decomposição do material orgânico, a qual aumenta com o tempo, este resultado se deve à intensa digestão da matéria orgânica pelas espécies.

Além da degradação dos poluentes (HPAs) durante a biorremediação aplicando vermicompostagem, segundo Dores-Silva et al. (2019), obtém-se, também, um solo mais rico em nutrientes. As minhocas ingerem e digerem os resíduos orgânicos, dejetando excrementos com forma especial, constituído de agregados de terra e matéria orgânica digerida. O material dejetado encontra-se em estado mais avançado de decomposição e humificação, sendo de

assimilação mais fácil pelas raízes das plantas. Os dejetos são pobres em argila e ricas em matéria orgânica, e elevada porcentagem de umidade. Há também uma produção acelerada de ácido húmicos graças à digestão e à semi-decomposição provocada pelas minhocas. Os resultados do teor de cinzas dos ácidos húmicos estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1: Teor de cinzas (%)

Tratamentos	1º dia	90º dia
II	1,86 ± 0,09	0,62 ± 0,03
III	2,54 ± 0,13	2,44 ± 0,12
IV	3,09 ± 0,15	1,29 ± 0,06
V	2,34 ± 0,12	0,00 ± 0,00
VI	0,86 ± 0,04	0,00 ± 0,00

Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Os teores de cinzas dos ácidos húmicos ficaram abaixo de 5%, o que pode ser considerado satisfatório para as análises subseqüentes. Os valores de porcentagem em massa de C, H, N, S e O, e as razões atômicas H/C, O/C, C/N e (O + N)/C dos ácidos húmicos extraídos dos tratamentos II, III, IV, V e IV estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2: Teor (em massa) de C, H, N, S e O, e as razões atômicas H/C, O/C, C/N e (O + N)/C dos ácidos húmicos

		Tratamentos				
		II	III	IV	V	VI
dia 1	C (%)	60,12 ± 3,00	55,10 ± 2,76	55,06 ± 2,75	54,51 ± 2,73	52,53 ± 2,63
	H (%)	8,05 ± 0,40	7,02 ± 0,35	6,69 ± 0,33	6,25 ± 0,31	6,42 ± 0,32
	N (%)	2,82 ± 0,14	2,82 ± 0,14	2,97 ± 0,15	2,91 ± 0,15	2,87 ± 0,16
	S (%)	2,58 ± 0,13	3,33 ± 0,17	2,41 ± 0,12	2,79 ± 0,14	3,18 ± 0,16
	O (%)	26,43 ± 1,32	31,74 ± 1,59	32,87 ± 1,64	33,54 ± 1,68	35,00 ± 1,75
	H/C	1,61 ± 0,08	1,53 ± 0,08	1,46 ± 0,07	1,38 ± 0,07	1,47 ± 0,07
	C/N	24,87 ± 1,24	22,78 ± 1,14	21,60 ± 1,08	21,88 ± 1,09	21,38 ± 1,07
	O/C	0,33 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,50 ± 0,03
	(O + N)/C	0,48 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,71 ± 0,04
90 dia	C (%)	54,64 ± 2,73	53,86 ± 2,69	51,74 ± 2,59	52,16 ± 2,61	51,46 ± 2,57
	H (%)	7,34 ± 0,37	6,51 ± 0,33	6,65 ± 0,33	6,15 ± 0,31	6,28 ± 0,31
	N (%)	3,33 ± 0,17	3,29 ± 0,13	3,22 ± 0,17	3,39 ± 0,12	3,24 ± 0,16
	S (%)	3,31 ± 0,17	2,52 ± 0,13	3,34 ± 0,17	2,39 ± 0,12	3,15 ± 0,16
	O (%)	31,38 ± 1,57	33,82 ± 1,69	35,05 ± 1,75	35,91 ± 1,79	35,88 ± 1,79
	H/C	1,61 ± 0,08	1,45 ± 0,07	1,54 ± 0,08	1,41 ± 0,07	1,46 ± 0,07
	C/N	19,15 ± 0,96	19,12 ± 0,96	18,76 ± 0,94	17,96 ± 0,90	18,54 ± 0,93
	O/C	0,43 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,03
	(O + N)/C	0,63 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,73 ± 0,04	0,74 ± 0,04	0,75 ± 0,04

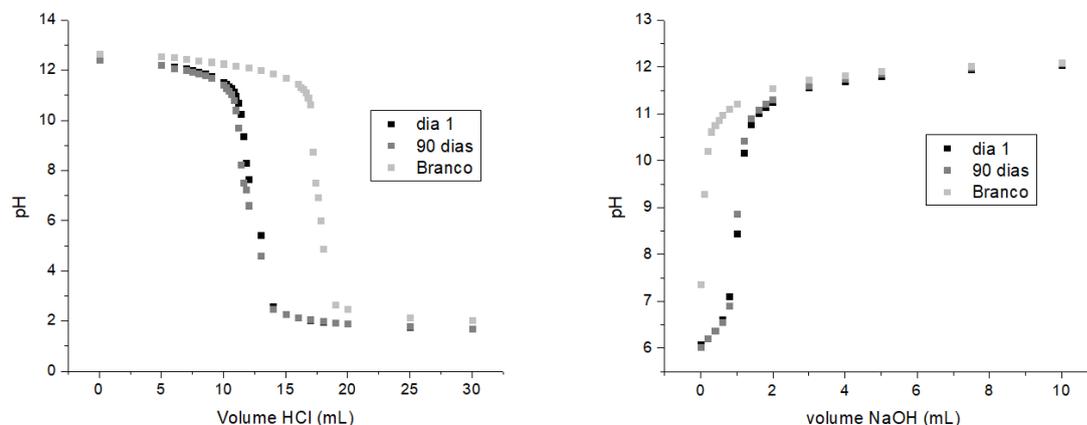
Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Pequenas mudanças na composição elementar foram encontrados nos ácidos húmicos após o processo de biorremediação aplicando vermicompostagem, apontando para um aumento dos teores de oxigênio e nitrogênio.

As razões atômicas (H/C, O/C, C/N) têm sido preferencialmente utilizadas para estabelecer o grau de condensação, as transformações diagenéticas, bem como as condições ambientais sob as quais as substâncias húmicas foram formadas. Segundo as Tabelas 3, a razão C/N dos ácidos húmicos variou de 17,96 a 19,15. Segundo Kayhanian e Tchobanoglous (1993), a relação C/N do húmus estabilizado, deve estar entre 15 a 20, mostrando que as razões C/N dos tratamentos estão dentro desses limites. A razão C/N indica o grau de incorporação de nitrogênio na estrutura húmica e é considerada um dos mais simples métodos para se avaliar a capacidade de assimilação pelas plantas do nitrogênio. Observa-se também um decréscimo nas razões C/N após o 90º dia. De acordo com Atiyeh et al. (2001), a acelerada humificação do vermicomposto reflete em um decréscimo da C/N e o aumento de nutrientes minerais (P, K e Na), e está relacionada com a mineralização da matéria orgânica pelas minhocas. A razão H/C é freqüentemente associada ao grau de condensação ou de aromaticidade, e este, por sua vez, ao grau de humificação, sendo que maiores valores de H/C indicam maior quantidade de grupos alifáticos, típicos de materiais menos humificados. As razões O/C indicam o teor de grupos oxigenados presentes na molécula (Messias, 2004). Então, as razões H/C e C/N tendem a diminuir e a razão O/C a aumentar com a biorremediação. Neste estudo, em específicos, não se chegou a nenhuma conclusão evidente quanto às razões H/C, devido ao tempo de formação do ácido húmico ocorrer em curto espaço de tempo.

A Figura 2 mostra as curvas titulométricas para as determinações da acidez total e da acidez carboxílica do ácido húmico extraído do tratamento IV.

Figura 2: Curvas titulométricas de ácidos húmicos dissolvidos em solução de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ com HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez total) e dissolvidos em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ com NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (acidez carboxílica) referentes aos tratamento IV



Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

A Tabela 3 apresenta a acidez total, carboxílica e fenólica dos ácidos húmicos dos tratamentos.

Tabela 3: Acidez total, carboxílica e fenólica dos ácidos húmicos (valores em $\text{mmol}_c \text{ g}^{-1}$).

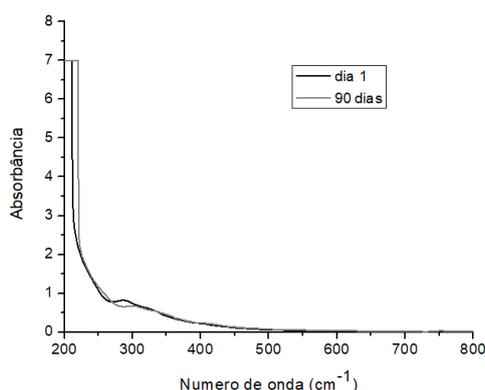
Tratamentos	Acidez total		Acidez carboxílica		Acidez fenólica	
	dia 1	90 dia	dia 1	90 dia	dia 1	90 dia
II	$5,35 \pm 0,27$	$4,39 \pm 0,22$	$0,90 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,05$	$4,44 \pm 0,22$	$3,49 \pm 0,17$
III	$5,17 \pm 0,26$	$5,89 \pm 0,29$	$0,84 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,05$	$4,33 \pm 0,19$	$4,94 \pm 0,25$
IV	$5,49 \pm 0,27$	$6,00 \pm 0,30$	$1,08 \pm 0,05$	$1,09 \pm 0,05$	$4,41 \pm 0,21$	$4,91 \pm 0,21$
V	$6,08 \pm 0,30$	$6,07 \pm 0,28$	$1,06 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,06$	$5,02 \pm 0,25$	$4,91 \pm 0,24$
VI	$6,72 \pm 0,34$	$6,23 \pm 0,31$	$1,09 \pm 0,05$	$1,24 \pm 0,07$	$5,64 \pm 0,28$	$4,99 \pm 0,25$

Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Os ácidos húmicos apresentaram um aumento na acidez total, comparando-se o 1º dia e 90º dia, com exceção ao tratamento II e VI. Durante o processo de estabilização, tem-se uma diminuição dos grupos alifáticos na estrutura da matéria orgânica e a formação de anéis aromáticos substituídos, os quais são geralmente grupos carboxílicos, hidroxílicos e carbonílicos, assim há uma maior tendência ao aumento desses grupos durante a biorremediação.

A Figura 3 apresenta os espectros de absorvância na região do UV/visível de ácidos húmicos extraídos do tratamento IV após o 90º dia de biorremediação.

Figura 3: Espectros de absorvância no UV/visível dos ácidos húmicos extraídos do tratamento IV.



Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Todos os espectros apresentaram um ombro próximo a 280 nm, característico de grupos cromóforos, como estruturas insaturadas e/ou aromáticas (Domeizel, *et al.*, 2004; Prudent *et al.*, 1995; Sanchez-Monedero *et al.*, 2002)

Os valores da razão E_4/E_6 (razão entre as absorvâncias a 465 e a 665 nm) dos ácidos húmicos extraídos dos tratamentos da biorremediação são apresentados na Tabela 4, e estão de acordo com os valores citados na literatura (Hervas *et al.*, 1989; Landgraf *et al.*, 1999).

Tabela 4: Valores de E_4/E_6

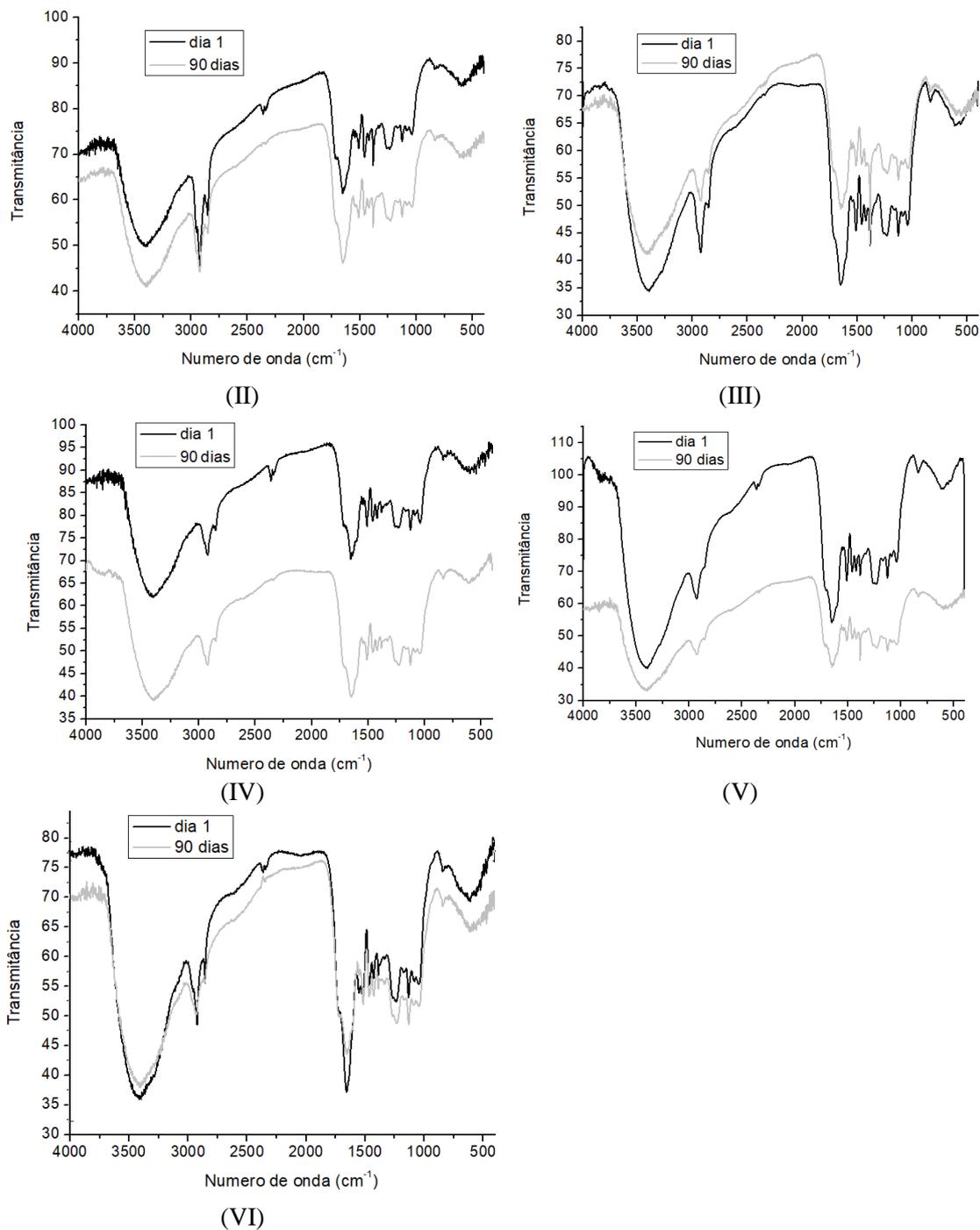
Tratamentos	dia 1	90 dia
II	$2,35 \pm 0,12$	$3,65 \pm 0,18$
III	$4,88 \pm 0,24$	$3,86 \pm 0,19$
IV	$5,32 \pm 0,27$	$4,18 \pm 0,21$
V	$5,30 \pm 0,26$	$5,41 \pm 0,27$
VI	$5,05 \pm 0,25$	$2,82 \pm 0,14$

Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Como já mencionado, quanto maior a aromaticidade, menor a razão E_4/E_6 . Entretanto, deve-se levar em conta que essa relação deve ser interpretada com cuidado, pois a comparação entre amostras bem distintas pode não ser conclusiva. Portanto, não chegou-se a nenhuma conclusão, pois o tempo de formação de um ácido húmico, que neste caso é de 90 dias, é muito pequeno para refletir em uma mudança acentuada na razão E_4/E_6 .

A Figura 4 mostra os espectros no infravermelho (modo transmitância) dos ácidos húmicos extraídos dos tratamentos II, III, IV, V e VI, respectivamente.

Figura 4: Espectros no infravermelho dos ácidos húmicos



Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Observa-se nos espectros uma larga banda centrada em 3410 cm⁻¹ associada ao estiramento OH de fenóis e álcoois, além de água, presente como impureza; picos em 2923 e 2850 cm⁻¹, devido a estiramentos simétrico e assimétrico, respectivamente, de C–H alifático; picos em 1630 cm⁻¹, atribuídos a estiramento C=O dos grupos carboxilatos (COO⁻) e picos menos visível em 1720 cm⁻¹ referente a estiramento C=O dos grupos carboxílicos (COOH); ao pico em 1630 cm⁻¹ está sobreposto estiramento C=C de aromático; picos em 1510, 1461 e

1422 cm^{-1} associados a estiramento C=C aromático; pico em 1238 cm^{-1} , de estiramento C–O e deformação O–H de grupos carboxílicos.

Os espectros de todos os tratamentos apresentaram maiores intensidades relativas em bandas atribuídas a estiramento C–H alifático para o 1º dia em relação às do 90º dia. A maior intensidade das bandas em 2923 e 2850 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos alifáticos, são típicos de materiais menos humificados.

Bandas próximas de 1610 cm^{-1} são geralmente atribuídas a estiramentos C=C de aromáticos; entretanto, ligações duplas não aromáticas e quinonas podem absorver nessa região. A ligação C=O de ácidos carboxílicos absorve em 1720 cm^{-1} . Por sua vez, o íon carboxilato (COO^-), resultado da desprotonação de grupos carboxílicos, absorve na região entre 1690 e 1660 cm^{-1} .

A relação entre as absorbâncias em 2927 e em 1050 cm^{-1} (relação entre grupos apolares e polares) fornece o índice de hidrofobicidade e relação entre as absorbâncias em 1660 e em 2929 cm^{-1} corresponde ao índice de aromaticidade, na qual são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Índice de hidrofobicidade e índice de aromaticidade

Tratamentos	Índice de hidrofobicidade		Índice de aromaticidade	
	dia 1	90 dia	dia 1	90 dia
II	0,62 ± 0,03	0,76 ± 0,04	1,33 ± 0,07	1,04 ± 0,05
III	0,89 ± 0,04	0,89 ± 0,04	0,87 ± 0,04	0,99 ± 0,05
IV	0,90 ± 0,04	0,95 ± 0,05	1,00 ± 0,06	0,87 ± 0,04
V	0,83 ± 0,04	0,93 ± 0,05	0,94 ± 0,05	0,93 ± 0,05
VI	0,91 ± 0,05	0,97 ± 0,05	0,73 ± 0,04	0,87 ± 0,04

Fonte: Pesquisa aplicada, 2018

Os índices de hidrofobicidade aumentaram, indicando uma maior resistência à degradação microbiana ao longo da biorremediação. Já para o índice de aromaticidade não obteve-se nenhuma conclusão, pois o tempo de formação de um ácido húmico, que neste caso é de 90 dias, é muito pequeno para refletir em uma mudança acentuada.

5. Considerações finais

Fica, assim, evidente a contribuição desse manuscrito para o entendimento da dinâmica de mineralização durante a biorremediação de solos contaminados com diesel usando *Eisenia foetida* ao caracterizar qualitativamente e quantitativamente os ácidos húmicos desses solos. Durante o processo de biorremediação há a passagem da matéria orgânica dita ativa para a sua forma estabilizada.

O objetivo do estudo foi alcançado, mostrando que um aumento do teor de ácido húmico foi evidenciado em todos os tratamentos. Apenas pequenas mudanças na composição elementar foram encontradas nos ácidos húmicos após o processo de biorremediação aplicando vermicompostagem apontando para uma estrutura mais aromática com maiores proporções de oxigênio e nitrogênio. Percebe-se uma diminuição significativa da razão C/N.

Os grupos funcionais foram os mais sensíveis às mudanças causadas pelo processo de vermicompostagem mostrando um aumento acentuado na acidez total e nos grupos fenólicos, carbonílicos e carboxílicos. Os espectros de infravermelho mostraram uma clara diminuição na intensidade das bandas na região 3923-2850 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos alifáticos, indicando a humificação durante a biorremediação.

Para trabalhos futuros pretende-se não só extrair e caracterizar ácidos húmicos no início e após 90 dias, mas sim em intervalos menores durante a biorremediação, a fim de acompanhar a dinâmica de mineralização ao longo do processo, e aumentar, também, o tempo de biorremediação para verificar mudanças mais acentuadas nas características químicas do ácido húmico.

6. Referências

Atiyeh, R.M., Edwards, C.A., Subler, S. & Metzger, J.D. (2001). Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth. *Bioresource Technology*, 78(1):11-20. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00172-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00172-3)

Atiyeh, R.M., Lee, S., Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Metzger, J.D. (2002). The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, 84(1):7-14. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00017-2)

Cotta, J. A. O., Landgraf, M.D., & Rezende, M.O.O. (2007). Validação do método para determinação de nitrogênio kjeldahl total. *Revista Analytica*, dezembro 2006/janeiro 2007, (26): 88-75.

Domeizel, M., Khalil, A., Prudent, P. (2004). UV spectroscopy: a tool for monitoring humification and for proposing an index of the maturity of compost. *Bioresource Technology*, 94(1): 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.026>

Dores-Silva, P.R., Cotta, J.A.O., Landgraf, M.D., Rezende, M.O.O. (2018). Soils impacted by PAHs: would the stabilized organic matter be a green tool for the immobilization of these noxious compounds? *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 53(5): 313-318. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1431461>.

Dores-Silva, P.R., Cotta, J.A.O., Landgraf, M.D., Rezende, M.O.O. (2019). The application of the vermicomposting process in the bioremediation of diesel contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. (No prelo) Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1611303>

Hervas, L., Mazuelos, C., Senesi, N., Saiz-Jimenez, C. (1989). Chemical and physico-chemical characterization of vermicomposts and their humic acid fractions. *Science Total Environmental*, 81(1): 543-550. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90162-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90162-9)

Kayhanian, M. & Tchobanoglous G. (1993). Innovative two-stage process for the recovery of energy and compost from the organic fraction of municipal solid waste (MSW), *Water Science and Technology*, 27(1):133-143.

Kiehl, E.J. (1985). *Fertilizantes orgânicos*. São Paulo: Editora agrônômica Ceres. 492p.

Kononova, M. M. (1966). *Soil organic matter: its nature, its role in soil formation and in soil fertility*. 2.ed. Oxford: Pergamon Press. 544p.

Landgraf, M.D., Silva, S.C., Rezende, M.O.O. (1998). Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid samples from peat and vermicompost. *Analytica Chimica Acta*, 368(1): 155-164. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00049-X)

Landgraf, M.D., Alves, M.R., Silva, S.C., Rezende, M.O.O. (1999). Caracterização de ácidos húmicos de vermicomposto de esterco bovino compostado durante 3 e 6 meses. *Química Nova*, 22(1): 483-486.

Messias, R.A. (2004). *Avaliação estrutural de ácidos húmicos de vermicomposto e turfa por diferentes técnicas de caracterização*. 134f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP.

Mitchell, A. (1997). Production of *Eisenia fetida* and vermicompost from feed-lot cattle manure. *Soil Biology Biochemistry*, 29(1): 763-6. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00022-3)

Pereira, A.S., Shitsuka, D.M., Parreira, F.J. & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Ed. UAB/NTE/UFSM. Santa Maria/RS. Disponível em: http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1

Poppi, N.R. & Talamoni, J. (1992). Estudo dos ácidos húmico e fúlvico, extraídos de solos, por espectroscopia de infravermelho. *Química Nova*, 15(1):281-285.

Prudent, P., Domeizel, M., Massiani, C., Thomas, O. (1995). Gel chromatography separation and U.V. spectroscopic characterization of humic-like substances in urban composts. *Science of The Total Environment*, 172(1): 229-235. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04817-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04817-0)

Sanchez-Monedero, M. A., Cegarra, J., García, D., Roig, A. (2002). Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting. *Biodegradation*, 13(1): 361–371. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04817-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04817-0)

Schnitzer, M. & Gupta, U.C. (1965). Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society*, 27(1): 274-277. [doi:10.2136/sssaj1965.03615995002900030016x](https://doi.org/10.2136/sssaj1965.03615995002900030016x)

Schnitzer, M. & Khan, S. U. (1972). *Humic substances in the environment*. New York: Marcel Dekker. p.127

Skoog, D. A., Holler, F. J., Timothy, A. N. (2002). *Princípios da análise instrumental*, 5. ed., Porto Alegre: Bookman. 836p.

Sposito, G. & Weber, J. H. (1986). Sorption of trace metals by humic materials in soils and natural waters. *Journal Critical Reviews in Environmental Control*, 16(2): 195-222. <https://doi.org/10.1080/10643388609381745>

Stevenson, F.J. (1994). *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. New York: John Wiley. 496p.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Jussara Aparecida de Oliveira Cotta – 100%