

# SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

## USO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO NA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE LATOSSOLO VERMELHO-ESCURO SOB EFEITO DA CALAGEM<sup>(1)</sup>

C. A. SILVA<sup>(2)</sup>, S. J. ANDERSON<sup>(3)</sup> & L. R. G. GUILHERME<sup>(4)</sup>

### RESUMO

Este estudo avaliou o peso molecular estimado (PM) e as proporções de frações ácidos húmicos (FAH) e frações ácidos fúlvicos (FAF) presentes em substâncias húmicas (SH), extraídas com NaOH 0,1 M e resina trocadora de íons, originárias de Latossolo Vermelho-Escuro sob floresta e cultivado com laranja, em áreas com e sem calagem, por meio da cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência (CETAE). Na calibração do PM com o tempo de retenção de diferentes compostos na coluna cromatográfica, utilizaram-se moléculas de sulfonato de poliestireno de sódio (SPS) e acetona. A análise das substâncias húmicas revelou que as FAFs e FAHs dos materiais de solo apresentaram tempo de eluição e, portanto, pesos moleculares muito similares àqueles determinados para os ácidos padrões. Os cromatogramas obtidos mostraram que o uso e o manejo do solo não introduziram mudanças no PM e na relação FAF:FAH das substâncias húmicas. Por outro lado, o método de extração influenciou, de forma marcante, as proporções de FAH e FAF, com mais FAH nos materiais extraídos com a resina trocadora de íons e maiores proporções de FAF nas substâncias húmicas extraídas com NaOH. As proporções de FAF e FAH obtidas por meio do método proposto pela SISH estiveram muito próximas àquelas determinadas com a CETAE, no material húmico extraído com a resina Chelex, demonstrando o potencial desta técnica na determinação do PM e das proporções de FAH e FAF em substâncias húmicas originárias de solos.

**Termos de indexação:** ácido húmico, ácido fúlvico, método de extração de substâncias húmicas, Latossolo.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor ao Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal de Lavras. Recebido para publicação em setembro de 1999 e aprovado em maio de 2000.

<sup>(2)</sup> Engenheiro-Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Solos. Rua Jardim Botânico, 1024, CEP 22460-000 Rio de Janeiro (RJ).

<sup>(3)</sup> Professora da California State University at Monterey. 93955, Seaside, CA (USA).

<sup>(4)</sup> Professor Adjunto do Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras - UFLA. Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista do CNPq.

**SUMMARY:** *USE OF SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY IN THE CHARACTERIZATION OF HUMIC SUBSTANCES FROM AN OXISOL UNDER LIMING EFFECT*

*This study evaluated the molecular weight (mw) as well as the proportions of humic and fulvic acid fractions in humic substances (H5) extracted with 0.1 M NaOH and a chelating (Chelex 100 chelating ion exchange resins) (Na form), via High-Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC). Samples of a Dusky Red Latosol were collected from three areas: under orange-cultivated forest with and without liming. Standards of sodium polystyrene sulfonate and acetone were used to calibrate the molecular weight and retention time ratio. All chromatograms of both NaOH- and resin-extracted humic substances contained two peaks: one peak eluted at the same time as the reference HA<sub>s</sub> (mw = 27700 daltons) and the other at the same time as the reference aquatic FA<sub>s</sub> (mw = 1330 daltons). The chromatograms showed no difference in the distribution of soil humic substances from the different agricultural systems studied. However, the relative proportions of humic and fulvic acid fractions differed between NaOH extracted and resin-extracted humic substances, with more humic acid fractions in the resin-humic material and greater proportions of fulvic acid fractions in the NaOH-humic extracts. The proportions of humic and fulvic acid fractions obtained by using the method proposed by SISH were close to those determined by HPSEC in the Chelex 100 ion exchange resin-humic substances, showing a potential use of this separation technique to the analyses of molecular weight and proportions of humic and fulvic acid fractions from soil humic substances.*

*Index terms: humic acid, fulvic acid, humic substances extraction method, Latosol.*

## INTRODUÇÃO

Na maioria dos solos, as substâncias húmicas representam os componentes majoritários mais estáveis da matéria orgânica. Esse grupo de substâncias engloba uma mistura complexa de moléculas com larga variação de peso molecular, que representam, em virtude da presença maciça de grupamentos carboxílicos e fenólicos, a principal matriz de cargas nos solos (Schnitzer, 1991). A adequada caracterização das substâncias húmicas presentes nos diferentes sistemas agrícolas brasileiros favorece a melhor compreensão do papel exercido pela matéria orgânica na fertilidade dos solos, mais especificamente na eficiência do uso de nutrientes, no fenômeno de troca iônica e na correção de acidez de superfície e de subsuperfície.

As substâncias húmicas (humina; frações ácidos húmicos, FAH; frações ácidos fúlvicos, FAF) são constituídas por um grupo de compostos oriundos de reações de síntese secundárias que apresentam coloração amarela a escura, alto peso molecular e que se distinguem de acordo com os seus graus de solubilidade em solventes alcalinos e ácidos (Stevenson, 1994; Camargo et al., 1999). As frações ácidos húmicos são compostas por moléculas de coloração escura, extraídas em meio alcalino e insolúveis em meio ácido e com peso molecular típico da ordem de 10.000 a 100.000 daltons; as frações ácidos fúlvicos apresentam PM na faixa de 500 a 2.000 daltons e são constituídas por ácidos fúlvicos, açúcares simples, polissacarídeos e aminoácidos, que

se mantêm em solução após a remoção das FAHs por acidificação (pH ± 2,0) de extrato húmico (Stevenson, 1994; McBride, 1994).

Considerando o importante papel exercido pelas FAHs e FAFs em propriedades químicas, físicas e biológicas de solo, torna-se crucial a determinação das proporções dessas duas classes de moléculas em diferentes ambientes. O método mais usado para separar as FAHs de FAFs é aquele baseado na solubilidade desses compostos em meio ácido, muito embora este procedimento sofra críticas por causar alterações na composição da matéria orgânica do solo (Stevenson, 1994). Existem, contudo, outros métodos de fracionamento descritos em literatura (Schnitzer & Khan, 1978; Stevenson, 1994), a saber: método cromatográfico, que emprega o uso de colunas empacotadas com gel "Sephadex" e carvão ativado, ultrafiltração e técnicas de fracionamento por métodos eletroforéticos e pelo uso de solventes orgânicos. Mais recentemente, a cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência (CETAE) tem sido empregada, com sucesso, no fracionamento de substâncias húmicas em diferentes sistemas de cultivo e em diferentes matrizes (Chin & Gschwend, 1991; Shaw et al., 1994; Novotny et al., 1999).

A CETAE tem-se caracterizado pela rapidez e confiabilidade na aferição do peso molecular e proporções de ácidos húmicos e fúlvicos em matrizes de solo e água. O uso dessa técnica baseia-se no princípio de migração diferenciada do material húmico na coluna cromatográfica. Moléculas de maior peso molecular exibem menor interação com

a matriz silicosa que empacota a coluna cromatográfica, sendo excluídas no menor tempo possível. Moléculas de menor peso molecular têm maior tempo de retenção por exibir caminhamento mais sinuoso, em virtude do maior aprofundamento na estrutura do material que empacota a coluna. Compostos de tamanho molecular intermediário exibem velocidades de migração médias àquelas das classes de compostos anteriormente citadas (Meyer, 1993).

A CETAE apresenta a vantagem de requerer pequenas quantidades de material a ser analisado e propicia ainda medições diretas, as quais resultam em avaliações de propriedades das substâncias húmicas mais próximas daquelas verificadas *in situ*. A principal vantagem do uso da CETAE relaciona-se com a eliminação de etapas laboriosas no fracionamento de AH e AF em matrizes de solos em meio ácido e alcalino, como as propostas por Schnitzer (1982), além de diminuir erros operacionais ou de manipulação.

Considerando que variações de pH, força iônica e concentração do material húmico podem acarretar mudanças em tamanho e forma das frações húmicas (Chin & Gschwend, 1991) e que essas mudanças podem resultar em interpretações errôneas das propriedades das substâncias húmicas (SH), o uso da resina Chelex tem sido recomendado na extração dessas moléculas (Gerzabek & Ullah, 1989). Em comparação com soluções alcalinas de NaOH, a resina Chelex caracteriza-se como sendo um extrator, que produz extratos húmicos menos oxidados e mais puros, porém apresenta a desvantagem de extrair menores quantidades de matéria orgânica, em períodos de extração normalmente usados nas extrações com NaOH. O custo elevado tem sido outro fator a impossibilitar o uso mais freqüente da resina como extrator de substâncias húmicas. Deve-se destacar, porém, que o uso da resina pode resultar na extração de material húmico em solução de menor força iônica, com baixa concentração de eletrólitos, decorrente da elevada afinidade da resina Chelex por ferro, cobre e outros elementos (Chelex, 1985).

Na maioria dos agroecossistemas brasileiros, a calagem constitui prática vital para o aumento do rendimento das culturas. Um dos efeitos da calagem é o aumento da atividade biológica do solo (Kreutzer, 1995), freqüentemente relacionado com a elevação do pH e com a maior disponibilidade de nutrientes no solo (Mendonça & Rowell, 1994). Como consequência, há um acréscimo na taxa de decomposição da matéria orgânica nativa e da adicionada ao solo, havendo considerável liberação de íons e de moléculas orgânicas para a solução do solo (Marchner & Wilczynski, 1991; Mendonça & Rowell, 1994; Kreutzer, 1995). A neutralização do alumínio em solos corrigidos demonstra que parte do Ca aplicado com a calagem desloca o Al fraco e fortemente ligado à matéria orgânica. Segundo Mendonça & Rowell (1994), esse deslocamento do

Al pelo Ca pode acarretar grande desestabilização das ligações entre grupamentos de carbono e esses elementos, tornando a matéria orgânica mais suscetível ao ataque microbiano, na medida em que o Al forma complexos mais estáveis com moléculas orgânicas do que o cálcio.

De fato, com a calagem, há um aumento nos teores de carbono solúvel em solos florestais corrigidos (Kreutzer, 1995), havendo uma predominância de C-ácidos fúlvicos nos lixiviados coletados (Marchner & Wilczynski, 1991). No estudo de Marchner & Wilczynski (1991), verificou-se que essa maior lixiviação de carbono do sistema solo-planta, em áreas com calagem, foi devida à maior conversão de C-ácido húmico em C-ácido fúlvico. Segundo esses autores, houve uma diminuição nos teores de substâncias húmicas na camada superficial (0-10 cm) do solo estudado e um aumento na concentração dessas moléculas em profundidade, principalmente de C-ácido fúlvico. Resultados semelhantes foram obtidos por Roth et al. (1992), que observaram menores teores de C-ácidos fúlvicos na camada de aração de solo brasileiro que sofreu calagem. Todavia, dados obtidos por Marchner & Wilczynski (1991) contrastam com os resultados apresentados por Mendonça & Rowell (1994), que não encontraram diferença na concentração de C-substâncias húmicas em diferentes profundidades de Latossolo oriundo de cerrado, em área sem cultivo, e em solo que recebeu calcário e foi cultivado por até 14 anos com soja e arroz.

O presente estudo teve como objetivos não só avaliar a capacidade da CETAE, quando comparada ao método de fracionamento proposto pela SISH, em determinar as proporções, mas também estimar os pesos moleculares de AH e AF em substâncias húmicas extraídas com NaOH e resina trocadora de íons, oriundas de amostras de solo sob floresta e cultivado, sob efeito ou não da calagem.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Solo

Procedeu-se à coleta de material de solo de textura muito argilosa e com a mineralogia da fração argila dominada por caulinita e gibbsita, na camada de 0-10 cm, no ano de 1995, no Campo Experimental de Citricultura do IAC, em Cordeirópolis (SP), na unidade Latossolo Vermelho-Escuro (LE), sob floresta (Fl) e sob cultivo, nos últimos 13 anos, de laranja valência, em parcela calcariada (Calc) e na testemunha (Test, cultivo sem correção da acidez do solo), nas três repetições de experimento de campo.

A caracterização química e a textura das amostras de solo coletadas encontram-se no quadro 1. Informações referentes ao histórico das áreas amostradas, à disposição das parcelas experimentais em campo e

**Quadro 1. Principais propriedades químicas e textura das amostras de solo sob estudo**

Tratamento <sup>(1)</sup>	pH H <sub>2</sub> O	P	CTC (pH 7,0)	Ca	m	V	Argila	Silte	Areia
		mg kg <sup>-1</sup>	— cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> —		— % —		— g kg <sup>-1</sup> —		
Floresta	3,9	2	17,1	0,8	71	7	680	140	180
Calc (com calcário)	6,6	43	10,3	5,9	1	80	680	120	200
Test (sem calcário)	4,2	21	11,4	0,8	60	12	690	110	200

<sup>(1)</sup> Calc: área cultivada com a aplicação de calcário (18 t ha<sup>-1</sup>); Test: área cultivada sem a aplicação de calcário.

ao delineamento estatístico utilizado no experimento estudado são descritas em Silva et al. (1999). No que se refere à análise estatística dos dados levantados, quando os fatores analisados foram significativos pelo teste de F, a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5%, para cada caso, usando-se o “software” Sanest (Zonta & Machado, 1980). Os dados referentes ao PM de substâncias húmicas, bem como as proporções de FAH:FAF, obtidas pelos dois métodos de extração e pelas técnicas de fracionamento de SH usadas neste estudo, são valores médios obtidos de três repetições, acompanhados de respectivo desvio-padrão.

### Extração de substâncias húmicas

Utilizaram-se dois procedimentos analíticos na extração das substâncias húmicas (ácidos húmicos e fração fúlvica) dos materiais de solos. Numa fase inicial, procedeu-se à extração do material húmico por meio da agitação por 24 h de 10 g de solo e 100 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, em ambiente de N<sub>2</sub> (Schnitzer, 1982). Procedeu-se também à extração das substâncias húmicas com a resina Chelex (Chelex 100, 100-200 mesh, co-polímeros de estireno di-vinil benzeno, Bio Rad), na seguinte relação solo:resina:água - 10 g:25 g:50 mL (Danneberg, 1973). A extração das SH com a resina ocorreu em ambiente de N<sub>2</sub>, estendendo-se por um período de três dias, com coleta do material húmico a cada 24 h. Desse modo, após cada intervalo de 24 h, o material húmico era separado do solo e resina, restabelecendo-se, logo após cada operação de coleta de material húmico, a relação solo:resina:água (10:25:50) via adição de água destilada, fazendo-se, a seguir, nova agitação. A separação do sobrenadante alcalino do material de solo foi efetuada, em ambos os processos de extração, pela centrifugação das amostras a 11.400 xg, durante 30 min.

Após o término da etapa de centrifugação, o extrato alcalino de ambos os extratores foi dialisado por 12 dias (Peso molecular de exclusão, PME = 500), liofilizado e armazenado em dessecador, até ser utilizado no estudo de cromatografia. Numa fase anterior à diálise, avaliaram-se também os valores de pH das soluções que continham os materiais húmicos. No caso da resina, o valor do pH de extração

situou-se em torno de 9,6, sendo o pH das soluções de substâncias húmicas extraídas com NaOH próximo de 12,6. Na avaliação da composição química dos extratos húmicos de resina chelex e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Quadro 2), foram determinados os teores de Na e K (fotometria de chama), Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Co, Ni, Cu e Cd (espectrometria de emissão atômica por plasma), em laboratório do Centro Nacional de Pesquisa de Solos - Embrapa Solos.

### Análise cromatográfica de substâncias húmicas

O sistema cromatográfico usado foi constituído de uma bomba injetora Waters, um injetor de amostras Beckman com 'loop' de 20 µL, um detector de absorvância Waters e um integrador HP, modelo 3390A. A coluna cromatográfica (Waters protein Pak-125, 7,8 x 30 cm) escolhida tem como características a baixa hidrofobicidade e a pequena capacidade trocadora de íons, possibilitando a detecção de moléculas com uma ampla faixa de peso molecular (100 a 80.000 daltons). A matriz silicosa que empacota a coluna é composta por esferas porosas de diâmetro conhecido.

Utilizou-se, como fase móvel, solução tamponada (pH = 6,83) 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, mais NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, muito embora outras fases móveis tenham sido testadas. Na confecção da curva de calibração relacionando peso molecular (PM) e volume de retenção (VR), foram usadas moléculas de sulfonato de poliestireno de sódio (SPS), com os seguintes pesos moleculares: 1.800, 4.600, 18.000 e 35.000 daltons. Analisou-se, também, a acetona (102 daltons) a 1% (v/v), com a finalidade de adicioná-la à curva já mencionada. Para fins de comparação, foram analisadas, cromatograficamente, moléculas de ácido húmico (AH<sub>p</sub>, ref. IR102H) e ácido fúlvico (AF<sub>p</sub>, ref. IR101F) padrões, adquiridos junto à Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (SISH).

Na análise das frações húmicas via uso da CETAE, 15 mg de SH dialisada e liofilizada foram dissolvidos em 50 mL de solução-tampão de composição idêntica àquela usada como fase móvel.



**Quadro 2. Caracterização química de extratos húmicos originários de Latossolo cultivado e sob floresta**

Tratamento <sup>(1)</sup>	Na	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd
----- µg 100 mL de extrato <sup>-1</sup> 10 g solo <sup>-1</sup> -----											
<b>Extrator: NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup></b>											
Floresta	170.750	392	109	101	84	28.150	2	12	34	9	2
Calc (com calcário)	181.840	690	711	79	20	7.240	0	4	141	6	0
Test (sem calcário)	176.710	411	73	52	43	19.190	1	8	109	9	1
<b>Extrator: resina chelex</b>											
Floresta	48.100	216	168	63	40	22.900	1	34	33	152	0
Calc (com calcário)	53.540	278	87	31	15	6.440	0	6	11	43	0
Test (sem calcário)	39.440	231	26	9	10	5.250	0	4	9	36	0

<sup>(1)</sup> Calc: área cultivada com a aplicação de calcário (18 t ha<sup>-1</sup>); Test: área cultivada sem a aplicação de calcário.

Todas as soluções húmicas analisadas foram filtradas em membranas com diâmetro de 0,45 µm, numa etapa anterior à injeção na coluna cromatográfica. A absorbância dos materiais húmicos eluídos foi monitorada a 280 nm. Todas as análises cromatográficas foram feitas em triplicata.

Para fins de comparação, as substâncias húmicas, extraídas com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, durante 24 h, de acordo com Schnitzer (1982), foram também fracionadas em ácidos fúlvicos (FAF) e ácidos húmicos (FAH), pelo método proposto pela SISH, descrito por Schnitzer (1982), sendo as FAFs e FAHs quantificadas por meio do teor de carbono neles presentes. Para obter as FAFs e as FAHs, após 24 h de agitação, adicionou-se 1,5 g de sulfato de sódio anidro à solução que continha 100 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 10 g de solo, centrifugou-se esse material a 3.100 xg (15 min), e procedeu-se à acidificação do sobrenadante (HCl 2,0 mol L<sup>-1</sup>), com vistas em abaixar o pH do meio a 2,0. A seguir, procedeu-se à filtragem do extrato acidificado, sendo a FAH precipitada nos filtros (Whatman, 42), lixiviado com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, numa etapa subsequente à eluição do extrato acidificado com as FAFs. Numa fase anterior à determinação dos teores de carbono nas FAFs e na FAH, procedeu-se à secagem do material húmico em estufa de circulação forçada a 50-60°C. O teor de carbono das FAFs e da FAH foi medido em analisador automático do tipo CHNS/O (Perkin Elmer, modelo 2400 SERIES II), após a remoção dos sólidos suspensos na solução pelo tratamento com HF-HCl e liofilização do material húmico.

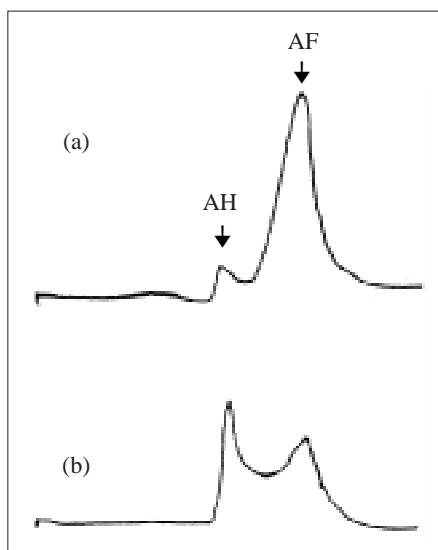
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao término das análises dos padrões de sulfonato de poliestireno de sódio (SPS), foi obtida uma curva

de calibração do tipo log-log linear, com os seguintes parâmetros:  $\text{Log}(\text{PM}_i) = [-7,9272 \times \text{Log}(\text{VR}_i)] + 10,807$  ( $r^2 = 0,9979$ ), sendo  $\text{PM}_i$  o peso molecular de uma fração orgânica qualquer em determinado volume de retenção ( $\text{VR}_i$ ). No cálculo do VR, multiplicou-se o volume eluído pelo tempo de eluição. Dessa forma, o parâmetro VR confunde-se com o tempo de eluição, pelo fato de se ter utilizado neste estudo a vazão de 1 mL/min. Na determinação dos pesos moleculares das frações húmicas estudadas, bem como dos  $\text{AH}_p$  e  $\text{AF}_p$ , utilizou-se esta curva-padrão.

Os  $\text{AH}_p$  e  $\text{AF}_p$  (SISH) apresentaram os seguintes tempos de eluição (Figura 1): 6,16 ( $\text{AH}_p$ ) e 9,25 min ( $\text{AF}_p$ ). Levando em consideração estes tempos e com base na curva de calibração obtida com os padrões SPS, obtiveram-se peso molecular de  $27.247 \pm 1.196$  daltons, para  $\text{AH}_p$ , e  $1291 \pm 30$ , para  $\text{AF}_p$ . O valor de PM determinado para o  $\text{AF}_p$  está de acordo com aqueles determinados por Chin & Gschwend (1991) e Miles & Brezonik (1983), encaixando-se na faixa de PM normalmente observada para essa classe de moléculas, 1.000-5.000 daltons (McBride, 1994). Os ácidos húmicos englobam moléculas de maior tamanho e com menor mobilidade que as de ácido fúlvico, apresentando PM variando de 10.000 a 100.000 daltons (McBride, 1994). As moléculas de  $\text{AH}_p$  analisadas apresentaram PM nesta faixa; contudo, o valor encontrado foi superior ao determinado por Chin & Gschwend (1991), quando da análise de ácido húmico sintético Aldrich (14.500 daltons).

Buscando averiguar a precisão da CETAE, procedeu-se a análise cromatográfica de diferentes proporções de  $\text{AF}_p$  e  $\text{AH}_p$  (Quadro 3). Os cromatogramas obtidos após a análise em separado dos padrões puros de SH evidenciaram para o  $\text{AF}_p$  a presença de pico único; no caso do  $\text{AH}_p$ , foram notados dois picos: um, associado a macromoléculas de



**Figura 1. Cromatogramas de misturas de substâncias húmicas padrões, nas seguintes proporções: (a) 8%(AH<sub>p</sub>):92%(AF<sub>p</sub>) e (b) 57%(AH<sub>p</sub>):43%(AF<sub>p</sub>).**

elevado tamanho molecular, e outro, associado a compostos de baixo peso molecular. As relações teóricas de AF<sub>p</sub>:AH<sub>p</sub> estiveram muito próximas daquelas analisadas cromatograficamente. Os teores de carbono na forma de AH<sub>p</sub> e AF<sub>p</sub> mostraram-se significativamente relacionados com os valores de área registrados via monitoramento desse elemento a 280 nm (Quadro 3). Os resultados alcançados demonstram ser a CETAE uma técnica adequada para avaliar diferentes proporções de AF e AH.

A eluição dos materiais húmicos oriundos de solos sob diferentes sistemas de manejo, decorrente de dois picos cromatográficos distintos, evidenciou a presença de duas classes de moléculas (Figura 2 e Quadro 4). Uma, composta por frações de maior peso molecular, similares em tamanho às frações orgânicas

eluídas como AH<sub>p</sub>, e outra, composta por moléculas muito semelhantes em PM àquelas eluídas como AF<sub>p</sub>. Dessa forma, os cromatogramas obtidos apresentaram distribuição do tipo bimodal, estando o primeiro pico diretamente relacionado com a presença de FAH e o segundo com a de FAF. Analisados separadamente, os dois picos apresentaram-se bastante largos, evidenciando a presença de uma mistura complexa de materiais húmicos contíguos, com pesos moleculares distintos e de difícil separação em sistemas cromatográficos. Em termos comparativos, as FAHs originárias dos materiais de solo apresentaram PM um pouco acima daquele utilizado como padrão, AH<sub>p</sub>. No caso das FAFs, os valores de PM para moléculas de solo e de aquífero (AF<sub>p</sub>) mostraram-se muito similares.

A análise cromatográfica das substâncias húmicas, oriundas da floresta e das áreas Calc e Test, revelou também que o uso e o manejo diferenciado do LE não introduziram mudanças no PM e nas proporções das FAFs e FAHs (Quadro 5 e Figura 3). Com relação às proporções das FAHs e FAFs listadas na figura 3, os dados obtidos indicam maior presença de carbono na forma de FAH na floresta, em relação às áreas sob cultivo. As mudanças introduzidas pelos métodos de extração de substâncias húmicas foram mais intensas, na medida em que estes influenciaram as proporções de FAH e FAF, com maiores teores de FAH no material extraído com a resina Chelex e maiores proporções de FAF no material húmico extraído com NaOH.

Buscando explicar o comportamento diferenciado dos materiais húmicos extraídos com NaOH e resina na coluna cromatográfica, nota-se que a conformação estrutural das substâncias húmicas é extremamente influenciada pelo pH, pela força iônica da solução eluente e pela concentração de eletrólitos do material húmico eluído. Quando comparados, os valores de pH das soluções preparadas com a solução-tampão usada como fase móvel e os materiais húmicos liofilizados extraídos com NaOH e resina Chelex

**Quadro 3. Concentrações e proporções de C-ácido húmico-padrão (AH<sub>p</sub>) e C-ácido fúlvico-padrão (AF<sub>p</sub>) e valores de área obtidos por meio da quantificação do carbono a 280 nm**

AH <sub>p</sub>	AF <sub>p</sub>	Relação		Área	
		AH <sub>p</sub> :AF <sub>p</sub> <sup>(1)</sup>	AH <sub>p</sub> :AF <sub>p</sub> <sup>(2)</sup>	AH <sub>p</sub> <sup>(3)</sup>	AF <sub>p</sub> <sup>(4)</sup>
----- mg L <sup>-1</sup> -----					
12	144	8:92	8:92	956	12.480
24	108	18:82	15:85	2.053	11.862
30	90	25:75	20:80	2.146	8.738
36	72	33:67	28:72	3.097	7.898
48	36	57:43	41:59	4.698	6.831

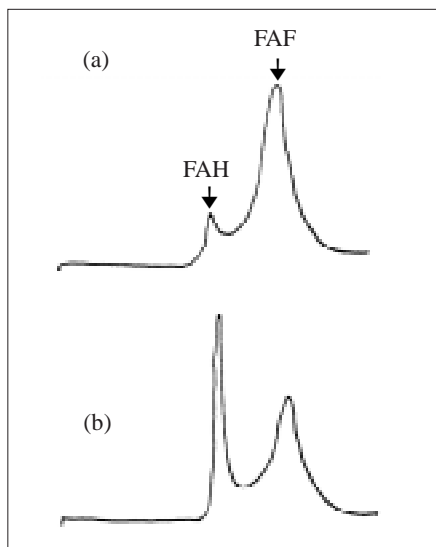
<sup>(1)</sup> Relações teóricas obtidas via uso de diferentes concentrações de AH<sub>p</sub> e AF<sub>p</sub>. <sup>(2)</sup> Relações obtidas via análise das diferentes proporções de AH<sub>p</sub> e AF<sub>p</sub> no sistema de CETAE. <sup>(3)</sup> AH<sub>p</sub>(mg L<sup>-1</sup> sol.) = 5,7286 + 0,00937 (área) r = 0,9788. <sup>(4)</sup> AF<sub>p</sub>(mg L<sup>-1</sup> sol.) = -55,6456 + 0,015232 (área) r = 0,9406.

mostraram-se muito similares, em torno de 6,85. Portanto muito próximos daquele registrado para a solução-tampão de NaCl utilizada na eluição das amostras. O parâmetro força iônica parece não ter acarretado maior presença de AF no material húmico extraído com NaOH, considerando ser o valor escolhido aquele recomendado na análise de materiais húmicos em sistemas cromatográficos (Chin & Gschwend, 1991). A melhor explicação para as mais altas relações de FAF:FAH nas SH extraídas com NaOH parece estar relacionada com a concentração de eletrólitos nos dois materiais húmicos (Resina e NaOH).

A análise dos dados apresentados no quadro 2, obtidos após a análise de material húmico não dialisado, permite algumas inferências nesse sentido, já que estes revelam ser o extrato húmico da resina mais puro do que aquele oriundo da extração com

NaOH. Danneberg (1973), avaliando extratores de substâncias húmicas de um Chernozém da Áustria, embora adotando parâmetros menos precisos (teor de cinzas) para teor de impurezas, obteve resultados semelhantes. Os teores de sódio no extrato húmico de resina foram, em média, quatro vezes inferiores àqueles medidos nas substâncias húmicas extraídas com NaOH. Os teores de potássio no material extraído com a resina representaram a metade do extraído com NaOH. De modo geral, houve também uma redução nos teores dos outros elementos listados no quadro 2, à exceção do zinco, que apresentou teores mais elevados no extrato húmico de resina, em comparação àquele do NaOH.

Em sistemas cromatográficos, a pureza do extrato de substâncias húmicas assume importância, já que a maior presença de cálcio nos materiais húmicos pode resultar em maior tempo de retenção das frações orgânicas eluídas (Murphy & Zachara, 1995). Esse fenômeno é explicado pelo fato de algumas frações orgânicas, na presença de certas espécies e de altas concentrações de eletrólitos, apresentarem contração molecular (Stevenson, 1994), o que aumenta o tempo de passagem dessas substâncias na coluna cromatográfica. Esses resultados permitem inferir que as FAHs extraídas com NaOH poderiam ter-se comportado na coluna cromatográfica como frações de peso molecular menor do que a faixa normalmente descrita para essa classe de substâncias. Desse modo, em decorrência da contração molecular, as FAHs estudadas poderiam comportar-se, em termos de PM, como as FAFs. Deve-se levar em conta, porém, o fato de o material húmico analisado ter passado pelo processo de diálise antes de ser eluído na coluna cromatográfica, o que, a princípio, resulta em menor concentração de eletrólitos no extrato de substâncias húmicas dos dois extratores utilizados. Outro ponto interessante é o de que a concentração do tampão (NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) utilizado na eluição do material húmico foi alta tanto para o material oriundo do extrator NaOH, quanto para a resina. Adicionalmente, a resina chelex, geralmente, extrai mais material de maior tamanho molecular (Schnitzer & Khan, 1978).



**Figura 2. Cromatogramas de substâncias húmicas originárias de Latossolo sob floresta e extraídas: (a) Com NaOH 0,1 M e (b) Com resina Chelex.**

**Quadro 4. Pesos moleculares estimados de FAH e FAF, obtidos via CETAE, sob influência do uso e manejo dos solos e do método de extração das substâncias húmicas**

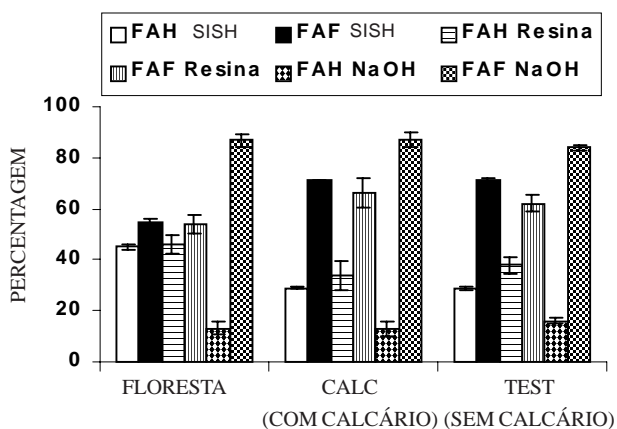
Tratamento	Resina		NaOH	
	FAH	FAF	FAH	FAF
	Dalton			
Floresta	31895 ± 1424 a <sup>(1)</sup>	1337 ± 20 a	29194 ± 1168 a	1413 ± 25 a
Calc (com calcário)	34232 ± 1862 a	1448 ± 75 a	31571 ± 2785 a	1368 ± 46 a
Test (sem calcário)	32487 ± 292 a	1314 ± 31 a	29736 ± 795 a	1372 ± 66 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

**Quadro 5. Teores de carbono em solo e em substâncias húmicas (Fracionamento convencional proposto pela SISH) de um Latossolo sob floresta e cultivado com citrus, em áreas com e sem calcário**

Tratamento	C total	SH <sup>(1)</sup>	g kg <sup>-1</sup>			SH/C total
			FAH	FAF	FAF	
Floresta	42,4 a <sup>(2)</sup>	19,11 a	8,58 ± 0,06 a	10,53 ± 0,46 a	0,45	
Calc (com calcário)	24,7 b	10,27 c	2,78 ± 0,04 c	7,49 ± 0,12 c	0,42	
Test (sem calcário)	22,1 b	12,47 b	3,61 ± 0,18 b	8,86 ± 0,13 b	0,56	

<sup>(1)</sup> SH representa a soma do carbono presente nas FAH, mais aquele que compõe a FAF. <sup>(2)</sup> Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.



**Figura 3. Proporções de frações ácidos húmicos (FAH) e frações ácidos fúlvicos (FAF) sob influência do uso e manejo do LE e de métodos de extração e fracionamento de substâncias húmicas (SH). Legenda: FAH e FAF SISH: proporções de FAH e FAF presentes em SH extraídas com NaOH e fracionadas pelo método proposto pela SISH; FAH e FAF Resina: proporções de FAH e FAF presentes em SH extraídas pela resina Chelex e fracionadas via CETAE; FAH e FAF NaOH: proporções de FAH e FAF presentes em SH extraídas com NaOH e fracionadas via CETAE.**

O fracionamento das substâncias húmicas pelo método proposto pela SISH (Schnitzer, 1982) revelou que grande parte do carbono nas áreas estudadas encontra-se presente na estrutura de frações ácidos húmicos e frações ácidos fúlvicos (Quadro 5 e Figura 3). A relação SH/C total evidenciou a presença de maiores teores de FAH e FAF na testemunha e menores teores de carbono na forma dessas frações na área com calagem. A redução intensiva nos teores de MO com o desmatamento e cultivo das áreas Calc e Test foi acompanhada por pequenas mudanças nas relações AH:FF, sendo o maior teor de carbono orgânico na forma de FAH observado na área sob

floresta. Dessa maneira, foi observada uma elevação nas proporções de C na forma de FAF nas áreas cultivadas, em relação à área sob floresta.

Independentemente da técnica analisada, foi observada uma dominância das FAFs na floresta e nas áreas cultivadas do LE. Tais dados concordam com os obtidos por Mendonça & Rowell (1994), em análise da dinâmica de frações orgânicas em solos sob cerrado e cultivados com soja. A maior predominância de FAF nas áreas cultivadas traduz a tendência de os processos naturalmente espontâneos ocorrerem sempre na direção de maior estabilidade energética com o seu meio.

É muito provável que as moléculas de FAH, em maior proporção na floresta, estejam sendo quebradas em frações mais reativas e de menor tamanho nas áreas cultivadas. De acordo com Mendonça & Rowell (1994), a maior prevalência dos AFs nos Latossolos brasileiros é explicada pela maior complexação dessas frações pelos óxidos de Fe e Al, o que resulta em maior preservação e proteção dessas moléculas ao ataque microbiano. A maior prevalência de ácidos fúlvicos nos solos ácidos pode resultar, a longo prazo, em perdas substanciais de MO via água percolada e em ambiente de solo menos favorável à atividade microbiana, com concomitante redução na fertilidade do solo (Schnitzer, 1991).

## CONCLUSÕES

1. Os resultados alcançados neste estudo demonstraram o potencial da cromatografia de exclusão por tamanho no fracionamento e determinação de peso molecular e proporção de frações ácidos fúlvicos e ácidos húmicos em solos.

2. Os métodos de extração de substâncias húmicas influenciaram, de forma marcante, as proporções de C-fração ácidos fúlvicos:C-fração ácidos húmicos, com mais C-FAH no material extraído com a resina Chelex e maiores proporções de C-FAF no material extraído com o NaOH.



3. O manejo e o uso diferenciado dos solos não introduziram mudanças substanciais no peso molecular e nas proporções de C-FAF e C-FAH: maior preservação dos C-FAH, na área sob floresta, e maiores teores de substâncias húmicas, em termos proporcionais ao C total, na área cultivada sem a correção da acidez do solo.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pesquisa cedida, e a Michigan State University, pelo custeio das despesas do projeto de pesquisa.

### LITERATURA CITADA

- CAMARGO, F.A.O.; SANTOS, G.A. & GUERRA, J.G.M. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.A. & CAMARGO, F.A.O., eds. Fundamentos da matéria orgânica do solo; ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, Genesis, 1999. p.27-39.
- CHELEX 100 and Chelex 20 chelating ion exchange resin: instruction manual. S.L., Bio-Rad, 1985. 15p.
- CHIN, YU-PING & GSCHWEND, P.M. The abundance, distribution, and configuration of porewater organic colloids in recent sediments. *Geochem. Cosmochem. Acta*, 55:1309-1317, 1991.
- DANNEBERG, O.H. Ueber die extraktion von Huminstoffen aus Schwarzerde. *Die. Bodenkultur*, 24:111-119, 1973.
- GERZABEK, M.H. & ULLAH, S.M. Humic substances in soils from Bangladesh, Namibia and Canada. *Inter. Agroph.*, 5:197-203, 1989.
- KREUTZER, K. Effects of forest liming on soil processes. *Plant Soil*, 168-169:447-470, 1995.
- MARSCHNER, B. & WILCZYNSKI, A.W. The effect of liming on quantity, and chemical composition of soil organic matter in a pine forest in Berlin, Germany. *Plant Soil*, 137:229-236, 1991.
- McBRIDE, M.B. *Environmental chemistry of soils*. New York, Oxford University Press, 1994. 406p.
- MENDONÇA, E.S. & ROWELL, D.L. Dinâmica do alumínio e de diferentes frações orgânicas de um Latossolo argiloso sob cerrado e soja. *R. Bras. Ci. Solo*, 18:295-303, 1994.
- MEYER, V.R. *Practical High-performance liquid chromatography*. West Sussex, John Wiley & Sons, 1993. 376p.
- MILES, C.J. & BREZONIK, P.L. High-performance size exclusion chromatography of aquatic humic substances. *J. Chromatogr.*, 259:499-503, 1983.
- MURPHY, E.M. & ZACHARA, J.M. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. *Geoderma*, 63:103-124, 1995.
- NOVOTNY, E.H.; BLUM, W.E.H. & GERZABEK, M.H. Soil management system effects on size fractionated humic substances. *Geoderma*, 92:87-109, 1999.
- ROTH, C.H.; WILCZYNSKI, W. & CASTRO FILHO, C. Effect of tillage and liming on organic matter composition in a Rhodic Ferralsol from southern Brasil. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.*, 155:175-179, 1992.
- SCHNITZER, M. & KHAN, S.U. *Soil organic matter*. Amsterdã, Elsevier, 1978. 319p.
- SCHNITZER, M. Organic matter characterization. 2.ed. In: PAGE, A.L., ed. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madison, ASA/SSSA, 1982. p.581-593.
- SCHNITZER, M. *Soil organic matter - The next 75 years*. *Soil Sci.*, 151:41-58, 1991.
- SHAW, P.J.; JONES, R.I. & HAAN, H. Separation of molecular size classes of aquatic humic substances using ultrafiltration and dialysis. *Environ. Technol.*, 15:765-774, 1994.
- SILVA, C.A.; ANDERSON, S.J. & VALE, F.R. Carbono, nitrogênio e enxofre em frações granulométricas de dois Latossolos submetidos à calagem e adubação fosfatada. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:593-602, 1999.
- STEVENSON, F.J. *Humus chemistry; genesis, composition, reactions*. New York, John Wiley & Sons, 1994. 496p.
- ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. *SANEST - Sistema de Análise Estatística*. São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1980. (Software)

