



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbccs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Brasil

Barros Dobbss, Leonardo; Rumjaneck, Victor Marcos; Altoé Baldotto, Marihus; Velloso, Ary Carlos
Xavier; Pasqualoto Canellas, Luciano

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESPECTROSCÓPICA DE ÁCIDOS HÚMICOS E FÚLVICOS
ISOLADOS DA CAMADA SUPERFICIAL DE LATOSOLOS BRASILEIROS**

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 33, núm. 1, enero-febrero, 2009, pp. 51-63

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180214067006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESPECTROSCÓPICA DE ÁCIDOS HÚMICOS E FÚLVICOS ISOLADOS DA CAMADA SUPERFICIAL DE LATOSOLOS BRASILEIROS⁽¹⁾

Leonardo Barros Dobbss⁽²⁾, Victor Marcos Rumjaneck⁽³⁾, Marihus Altoé Baldotto⁽⁴⁾, Ary Carlos Xavier Velloso⁽⁵⁾ & Luciano Pasqualoto Canellas⁽⁶⁾

RESUMO

A determinação de características estruturais das substâncias húmicas (SH) é essencial para o entendimento do comportamento da química de superfície dos solos altamente intemperizados. Ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) obtidos no horizonte superficial de sete Latossolos de diferentes regiões do Brasil foram caracterizados mediante a análise da composição elementar, da acidez total e carboxílica, da capacidade de oxidação e por métodos espectroscópicos. As substâncias húmicas apresentaram elevado grau de oxidação, acidez e massa molecular relativamente baixas, caracterizando a matéria orgânica alcalina solúvel como bastante reativa. Os AF apresentaram menor teor de C e maior de O do que os AH. Foram observados valores elevados da relação entre absorvância em 465 e 665 nm (E_4/E_6) e a massa molar média foi estimada em 1.106 e 618 g mol⁻¹ para AH e AF, respectivamente. A menor massa molar estimada para os AF foi compatível com sua menor complexidade química revelada pelos espectros de IV-TF, que apresentaram menor número de bandas de absorção bem definidas. A ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) mostrou a presença de H mais hidrofóbico nos AH e de H ligado a átomos de O em maior quantidade nos AF, compatível com sua maior acidez e, portanto, solubilidade em qualquer valor de pH. Apesar da mesma funcionalidade química encontrada tanto nos AH como nos AF, a análise estatística

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Recebido para publicação em julho de 2008 e aprovado em dezembro de 2008.

⁽²⁾ Doutorando do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal - Laboratório de Solos, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Av. Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: ldobbss@uenf.br

⁽³⁾ Professor Adjunto, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. BR 465, Km 7, CEP 23890-000 Seropédica (RJ). E-mail: rumjaneck@ufrj.br

⁽⁴⁾ Pós-Doutorando, Laboratório de Solos, UENF. E-mail: marihus@uenf.br

⁽⁵⁾ Professor Titular, Laboratório de Solos, UENF. E-mail : velloso@uenf.br

⁽⁶⁾ Professor Associado, Laboratório de Solos, UENF. E-mail: canellas@uenf.br

permitiu separar a maioria desses ácidos, indicando a presença de frações humificadas de natureza química individual.

Termos de indexação: matéria orgânica, espectroscopia, substâncias húmicas, solos tropicais.

SUMMARY: *CHEMICAL AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF HUMIC AND FULVIC ACIDS ISOLATED FROM THE SURFACE LAYER OF BRAZILIAN OXISOLS*

The determination of structural characteristics of humic substances (HS) is essential to understand the behavior of surface chemistry of highly weathered soils. Humic acids (HA) and fulvic acids (FA) isolated from the surface horizon of seven Oxisols of different locations of Brazil were characterized by analyses of elemental composition, total and carboxylic acidity, oxidation capacity and spectroscopic techniques. The oxidation degree of the humic substances was high, while acidity and molecular weight were relatively low, indicating a very reactive alkaline soluble organic matter. Compared with HA, the C content of FA was lower and oxygen content higher. The E_4/E_6 ratio values were high and the molar mass was estimated at 1.106 and 618 g mol⁻¹ for HA and FA, respectively. The lower molar mass observed for FA was consistent with the lower chemical complexity detected by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), showing fewer well-defined spectral bands. The results of ¹H-nuclear magnetic resonance (H-NMR) spectroscopy indicated more hydrophobic H in HA and a high amount of H bonded with O in FA, consistent with the higher acidity and solubility at any pH value. Despite the similar chemical functionality found, both HA and FA, most humic substances could be distinguished by the principal component analysis, indicating distinct chemical attributes of the humic fractions.

Index terms: organic matter, spectroscopy, humic substances, tropical soils.

INTRODUÇÃO

O teor de matéria orgânica influencia o comportamento do solo, principalmente dos altamente intemperizados (Fontes et al., 2001). Os Latossolos constituem a principal classe desse tipo de solo no Brasil (Resende et al., 1997). São solos profundos, geralmente ácidos, com CTC baixa e dependente do pH e do comportamento das cargas da fração orgânica (Mendonça et al., 2006).

Apesar do progresso acelerado no estudo da química das substâncias húmicas (SH), há muitas indefinições e pouco consenso sobre o assunto. As SH têm sido descritas genericamente como macromoléculas orgânicas heterogêneas, de coloração escura, resultado do produto do metabolismo de microrganismos (Aiken et al., 1985). Piccolo (2002) aplicou o conceito da química das supramoléculas para SH e, por meio de uma série de evidências cromatográficas (Piccolo et al., 1996) e espectroscópicas (Simpson, 2002; Piccolo & Spiteller, 2003), postulou uma nova concepção para a estrutura das SH. Moléculas orgânicas diversas, mas relativamente pequenas, formam agregados unidos entre si por ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas fracas, formando um arranjo supramolecular. Esse arranjo apresenta massa molecular só aparentemente elevada, mas que pode ser constante e indefinidamente alterada de acordo

com as variações nas condições do meio de reação. Nessa perspectiva, Piccolo (2002) redefiniu AF como produto da associação de moléculas pequenas e hidrofílicas com uma quantidade de grupos funcionais acídicos suficiente para manter os agregados dispersos a qualquer valor de pH. Os ácidos húmicos (AH), por sua vez, foram definidos como associações nas quais predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimilênicas, ácidos graxos, esteróides) estabilizados em pH neutro por forças hidrofóbicas dispersivas. A conformação dos AH cresce progressivamente de tamanho quando as forças oriundas das ligações hidrogênio são progressivamente aumentadas até um valor baixo de pH na qual flokulam (Piccolo, 2002). De acordo com Sutton & Sposito (2005), a nova concepção estrutural deve ganhar em precisão e acurácia com o desenvolvimento de ferramentas de automação e modelagem química.

As espectroscopias de UV-VIS e fluorescência, infravermelho (IV) e ressonância nuclear magnética (RMN) são bastante úteis na caracterização das SH. A espectroscopia na região de UV-VIS é usada, principalmente, para determinar a relação E_4/E_6 (razão entre a absorbância em 465 nm e 665 nm, segundo Kononova, 1982). Os valores da relação E_4/E_6 apresentaram relação inversa com o progresso das reações de transformação das SH (Kononova, 1982), distribuição de massa molecular (Chen et al.,

1977) e quantidade de C-aromático (Saab & Martin-Neto, 2007). É possível também estimar a massa molar média pela absorvidade na região entre 250 e 280 nm pela presença de uma absorção de pequena intensidade ($\epsilon_{280} = 204 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) devido à forte proibição quanto-mecânica. Essa absorção é fortemente afetada pela presença de grupos funcionais polares, como carbonilas, carboxilas e ésteres, que aumentam o ϵ em relação à absorvidade de anéis não substituídos, sendo possível relacionar linearmente a massa molar com a ϵ_{280} (Ching et al., 1994; Peuravarouri & Pihlaja, 2004). A espectroscopia de fluorescência vem sendo utilizada com sucesso para estabelecer grau de humificação das SH determinado pelo incremento de estruturas conjugadas com ressonância de elétrons, tais como anéis aromáticos e radicais livres do tipo semiquinonas (Martin-Neto et al., 1998; Milori et al., 2002). Grupos doadores de elétrons substitutos de compostos aromáticos, como carbonilas, hidroxilas, grupos amino, aumentam a intensidade de emissão de fluorescência para comprimentos de onda maiores (Senesi et al., 1991). Os radicais livres do tipo semiquinonas (RLS) participam das reações de transferência de elétrons (Struyk & Sposito, 2001) e sua concentração geralmente é medida pela ressonância de elétrons (EPR). Baldotto (2006) verificou uma correlação estreita e significativa entre a concentração de RLS e a capacidade de oxidação (Cox) das SH medida por iodimetria, apresentando um procedimento acessível para estimativa da capacidade de transferência de elétrons das SH.

Na região de IV é possível acessar a funcionalidade das SH, especialmente de grupos oxigenados, proteínas, polissacarídeos e proporção de grupos aromáticos/alifáticos e hidrofílicos/hidrofóbicos (Canellas et al., 2004). É possível também identificar uma “assinatura química” das SH a partir da análise da região entre 1.400 e 900 cm^{-1} conhecida como impressão digital (Colthup et al., 1964). A RMN é uma técnica versátil e bastante útil na análise estrutural de materiais complexos (Rumjaneck, 2005) e foi responsável, por exemplo, pela indicação inequívoca do comportamento supramolecular das SH (Simpson, 2002).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os AH e AF obtidos do horizonte superficial de sete diferentes Latossolos, por meio de métodos químicos e espectroscópicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e isolamento das substâncias húmicas

Foram coletadas amostras do horizonte superficial de sete perfis diferentes de Latossolos previamente descritos em diferentes regiões do Brasil: Latossolo Amarelo eutrófico (LAe), Campos dos Goytacazes, RJ; Latossolo Bruno distroférreo (LBdf), Vacaria, RS;

Latossolo Vermelho perférreico (LVj), Nova Lima, MG; Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (LVAd), Nova Friburgo, RJ; Latossolo Vermelho acriférreico (LVwf), Santo Angelo, RS; Latossolo Vermelho-Amarelo distroférreico (LVAdf), Mendes, RJ; Latossolo Vermelho distrófico (LVd), Brasília, DF. Os solos foram previamente estudados nas reuniões de correlação e classificação de solos (Embrapa, 1980, 1999) e nos trabalhos de Rodrigues & Klant (1978), Anjos (1985) e Barreto (1986).

A extração da matéria húmica proveniente dos Latossolos estudados foi realizada com NaOH 0,1 mol L^{-1} , na razão solo:solvente de 1:10 (v:v) em atmosfera inerte de N_2 . A extração foi repetida até a obtenção de um extrato com absorbância igual a zero em 250 e 465 nm. A separação dos AH foi conseguida com o abaixamento do pH da solução até 1,0 com HCl 6 mol L^{-1} . A redissolução e precipitação foi repetida por três vezes. Em seguida, foram adicionados 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl (preparada com 5 mL de HCl concentrado e 5 mL de HF concentrado e, o volume da solução completado para 1 L com água deionizada), agitando-se a amostra durante 8 h. Os AH foram lavados com água deionizada até teste negativo para cloretos com AgNO_3 . Em seguida, os AH foram dializados contra água em membranas de “cut-off” de 14 kDa e secos por liofilização. O sobrenadante produzido com a acidificação do meio alcalino foi colocado numa coluna preenchida com resina XAD-8 (36 g mL^{-1} de solução). A coluna foi lavada com dois volumes de água destilada e os AF, retidos na coluna, foram eluídos com uma solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} . Em seguida, a solução alcalina com AF foi eluída numa coluna preenchida com resina trocadora de cátions Amberlite IAR 120 H^+ e dializada contra água em membranas com poros de 700 Da e secos por liofilização.

Caracterização das substâncias húmicas solúveis

A composição elementar foi realizada em analisador automático Perkin Elmer 2.400, com amostras de 4 mg de AH e de AF em duplicata: o teor de O foi determinado por diferença, descontados os teores de cinzas e de umidade obtidos com a análise termogravimétrica (dados não mostrados); a acidez total, pelo método do $\text{Ba}(\text{OH})_2$ com titulação do excesso de base com HCl; a acidez carboxílica, pelo tratamento com $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ e a determinação do Ac liberado foi realizada com NaOH, e a fenólica, por diferença, p.ex., acidez total – carboxílica, de acordo com método de Schnitzer & Gupta (1965).

A titulação redox das amostras de AH e AF foi realizada sob atmosfera de Ar, numa suspensão aquosa em temperatura ambiente (25 °C), controlada por fluxo contínuo em banho MQBTC 99-20®, por meio da oxidação com I_2 . O ponto de equivalência da curva de titulação foi ajustado para E_H (mV) em função da quantidade crescente de redutor no sistema (μL de I_2). O ponto de inflexão da curva foi arbitrado como o

calculado pela segunda derivada da equação ajustada com ajuda do software Origin® e que, aplicado à formula $[\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}] = (2 \text{ mol}_c/\text{mol}_c \text{ I}) \times (\text{molalidade solução I}_2 \times \text{densidade solução I}_2)/\text{massa AH ou AF}$, forneceu o número de moles de carga transferidos por unidade de massa de AH e AF ($\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$), definido como a capacidade de oxidação (Cox) de cada AH e AF (Baldotto, 2006).

A espectroscopia na região do infravermelho das SH solúveis foi realizada na faixa de 500 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas com 1 mg de SH solúveis em 100 mg de KBr, num aparelho Perkin Elmer 1420.

A intensidade de fluorescência foi obtida em solução aquosa de AH e AF na concentração de 50 mg L^{-1} equilibrada a 25°C e $\text{pH} = 8$. Utilizou-se um espectrofotômetro Hitachi F-4500, e as condições experimentais utilizadas foram as mesmas indicadas por Milori et al. (2002).

A massa molar média das SH foi estimada a partir da absorvidade molar em 280 nm (ϵ_{280}) de acordo com o procedimento de Ching et al. (1994). Pela equação $\text{MM} = 3,99 \epsilon_{280} + 450$, foram obtidas correlações elevadas com a distribuição média da massa molecular das SH por cromatografia, por exclusão de tamanho ou por sedimentometria por ultracentrifugação, e com o grau de aromaticidade obtido por RMN (Ching et al., 1994).

Os espectros de RMN ^1H (^1H : 300 MHz) foram obtidos num aparelho Varian com probe de 5 mm. As amostras foram dissolvidas em $0,7 \text{ mL}$ de $\text{NaOD/D}_2\text{O}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e o espectro foi obtido com a saturação do sinal de água. A varredura do espectro foi de 4.800 Hz, e foram obtidos 64 scans por espectro com tempo de aquisição de 3,6 s e *delay* de 0,5 s.

Análise Estatística

Foi empregada a técnica multivariada de componentes principais, cuja finalidade exploratória possibilita a verificação da maior ou menor sensibilidade das variáveis em questão (grau de humificação x AH e AF) no que se diz respeito à separação dos Latossolos estudados. Em tal técnica, a primeira componente é descrita de forma que os pontos resultem na maior variabilidade possível entre todas as coordenadas lineares; e a segunda deve ter o máximo de variância igual ou menor que a primeira, sendo ortogonal a esta. Esta nova configuração de pontos é obtida pela determinação de autovetores a partir da matriz de variância (Gnanadesikan, 1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das substâncias húmicas solúveis

As características das SH dependem dos fatores de formação do solo e são intensamente modificadas

pela atividade antropogênica. O processo de latossolização é comum à classe de solo eleita para este estudo, e os perfis utilizados foram previamente indicados como perfis modais (Barreto, 1986). Procurou-se diversidade entre os Latossolos (Quadro 1) para a caracterização das SH.

A composição elementar, livre de umidade e cinzas, e as relações atômicas dos AH e AF são mostradas no quadro 1. Os resultados da acidez, relação E_4/E_6 , fluorescência, capacidade de oxidação e estimativa da massa molar média (MM) são mostrados no quadro 2. De modo geral, pode-se observar que o teor de C nas SH isoladas dos diferentes Latossolos é baixo e o de O é elevado em relação à média de outros AH e AF descritos na literatura (Rice & MaCarthy, 1991).

O teor de C nos AH variou de 432 a 563 g kg^{-1} e nos AF de 261 a 612 g kg^{-1} . Já o teor de O variou de 505 a 667 g kg^{-1} nos AH e numa faixa maior, entre 519 e 877 g kg^{-1} nos AF. O teor médio mais elevado de C nos AH é menor de O é compatível com o maior grau de humificação dos AH em relação aos AF (Stevenson, 1994). O teor de N encontrado foi elevado, entre 47 e 69 g kg^{-1} nos AH e entre 50 e 100 g kg^{-1} nos

Quadro 1. Composição elementar livre de umidade e cinzas e relações atômicas de ácidos húmicos e fúlvicos isolados de sete Latossolos brasileiros

Latossolos ⁽¹⁾	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C
g kg^{-1}							
Ácidos Húmicos							
LAe	562,5	64,0	52,5	558,7	12,5	1,4	0,7
LBdf	542,0	64,1	58,9	524,1	10,7	1,4	0,7
LVj	503,1	51,1	49,9	627,5	11,8	1,2	0,9
LVAd	432,0	56,6	57,8	667,2	8,7	1,6	1,2
LVwf	468,0	60,9	46,6	603,7	11,7	1,6	1,0
LVAdf	504,8	61,1	68,5	504,6	8,6	1,5	0,7
LVd	536,5	62,7	52,9	542,7	11,8	1,0	0,8
Média	507,0	60,1	55,3	575,5	10,8	1,4	0,9
DP	45,3	4,7	7,2	59,1	1,6	0,1	0,2
Ácidos Fúlvicos							
LAe	545,1	67,7	87,6	519,1	7,3	1,5	0,7
LBdf	303,0	55,4	64,4	843,0	5,5	2,2	2,1
LVj	301,7	64,3	99,7	867,6	3,5	2,6	2,2
LVAd	611,6	73,8	95,7	689,4	7,5	1,5	0,8
LVwf	261,2	46,1	50,0	877,2	6,1	2,1	2,5
LVAdf	342,8	46,5	63,3	797,4	6,3	1,6	1,7
LVd	515,1	70,8	91,9	655,5	6,5	1,7	1,0
Média	411,5	60,7	79,0	749,9	6,1	1,9	1,6
DP	141,3	11,4	19,4	133,4	1,3	0,4	0,7

⁽¹⁾ LAe: Latossolo Amarelo eutrófico; LBdf: Latossolo Bruno distroférrico; LVj: Latossolo Vermelho perférlico; LVAd: Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico; LVwf: Latossolo Vermelho acriférlico; LVAdf: Latossolo Vermelho-Amarelo distroférrico; LVd: Latossolo Vermelho distrófico. ⁽²⁾ DP: desvio-padrão.

Quadro 2. Acidez total, carboxílica e fenólica (obtida por diferença), relação E_4/E_6 , intensidade de fluorescência, capacidade de oxidação e massa molar média de ácidos húmicos e fúlvicos isolados de sete Latossolos brasileiros

Latossolos	COOH	OH fenólico	Acidez total	E_4/E_6	IF ⁽¹⁾	Cox ⁽²⁾ pH ₅	Cox pH ₇	MMr ⁽³⁾
cmol kg ⁻¹								
Ácidos Húmicos								
LAe	264,4	1.301,0	1.565,4	7,2	107,3	1,0	1,5	990
LBdf	197,4	1.230,0	1.427,4	6,9	158,5	1,1	1,9	1.100
LVj	70,8	1.909,8	1.980,4	6,7	80,7	1,9	2,9	990
LVAd	184,6	1.210,8	1.395,4	4,0	149,6	1,5	2,7	1.227
LVwf	69,4	1.495,0	1.564,4	6,5	81,7	1,3	2,4	1.227
LVAdf	354,5	942,0	1.296,5	5,4	115,1	2,3	3,5	1.163
LVd	223,6	1.513,6	1.737,1	8,9	113,6	1,1	1,7	1.045
Média	194,9	1.371,7	1.566,7	6,5	115,2	1,5	2,4	1.106
DP	102,0	305,6	231,7	1,5	30,1	0,5	0,7	102,6
Ácidos Fúlvicos								
LAe	168,3	1.754,4	1.922,6	9,5	28,1	0,5	1,0	524
LBdf	245,5	2.061,3	2.306,8	13,2	15,5	0,9	1,6	887
LVj	357,1	2.193,8	2.551,0	11,8	36,0	0,5	1,5	507
LVAd	314,3	1.654,4	1.968,7	9,3	30,6	0,8	2,1	794
LVwf	267,9	1.598,4	1.866,3	10,8	40,4	1,3	2,5	534
LVAdf	163,6	1.813,6	1.977,2	9,3	42,0	1,0	2,2	557
LVd	229,2	1.109,4	1.338,6	10,0	19,5	1,0	1,5	524
Média	249,4	1.740,8	1.990,2	10,5	30,3	0,9	1,8	618
DP	71,4	351,2	378,6	1,5	10,1	0,3	0,5	155,0

COOH: acidez carboxílica; OH fenólico: acidez fenólica; DP: desvio-padrão.

⁽¹⁾ Intensidade total de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a) obtida pelo espectro de emissão de uma solução de AH e AF (20 mg L⁻¹ de C) com excitação fixa em 456 nm. ⁽²⁾ Cox: Capacidade de oxidação. ⁽³⁾ MMr: massa molar média obtida pela equação $y = 3,99\epsilon + 490$ no qual ϵ é a absorvidade molar em 280 nm com concentração em moles de 20 mg L⁻¹ de C_{AH} ou C_{AF}.

AF, indicando que as SH servem como uma importante fonte de compostos nitrogenados armazenados nos diferentes Latossolos. Curtin & Wen (1999) verificaram que as frações solúveis de matéria orgânica foram significativamente correlacionadas com o N-mineralizável do solo, e Jacquin & Vong (1989) identificaram os AF como a principal fração alcalina solúvel responsável pela estabilização de N adicionado na forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

O teor elevado de N e baixo de C nos AH e AF confere às SH uma baixa relação C/N. Trabalhos anteriores como os de Kumada (1965) e Stevenson (1994) concebiam a humificação como um processo de aumento de condensação química (união de moléculas com eliminação de água) das unidades estruturais mediados geralmente por grupos nitrogenados. Portanto, a incorporação ou os teores elevados de N foram considerados como um atributo de materiais bastante humificados. Neste trabalho, verificou-se um teor elevado tanto de N como de O, além de teores baixos de C indicando um processo bastante particular de estabilização de material húmico com possível presença de substâncias húmicas de baixa massa

molecular na fração solúvel. Os AH dos Latossolos apresentaram uma relação C/N média de 11 e os AF apresentam valores ainda menores (próximos de 6). Valores excepcionalmente baixos da relação C/N foram encontrados nos AF isolados do LVj 3,5 aproximadamente, que pode ser associado mais à involução química das SH do que estabilização pela atividade biológica. É possível que a mineralização predominada por óxidos de ferro impeça a evolução das SH, gerando baixo acúmulo de C e complexação de formas de N em reações com OH fenólicos. A relação O/C é 0,7 vez maior nos AF do que nos AH, confirmando a maior acidez desses compostos, o que permite sua solubilidade em qualquer valor de pH do meio.

Foi encontrada maior acidez total nos AF que apresentam, em média, 1.990 cmol_c kg⁻¹ com valores oscilando entre 2.551 e 1.339 cmol_c kg⁻¹ entre os Latossolos. Os AH apresentam média elevada de acidez total (1.567 cmol_c kg⁻¹) com valores oscilando entre 1.980 e 1.296 cmol_c kg⁻¹. A acidez total dos AF foi 1,27 vez maior do que a dos AH, um indicativo da maior hidrofilicidade dos AF. A acidez total das SH é alta e está de acordo com o grau elevado de oxidação e.

portanto, com o elevado teor de O. Essa elevada reatividade indica uma participação significativa das SH no desenvolvimento de cargas nos Latossolos. A acidez fenólica foi responsável por quase dois terços do H⁺ na acidez total das SH. Como o pKa aparente desses grupamentos é bem mais elevado do que o dos grupos CO₂H, na faixa de pH normalmente encontrada para os Latossolos, a carga líquida negativa é praticamente devida à dissociação de CO₂H que aparece em menor proporção na acidez total.

Os AH isolados do LVj e do LVwf apresentaram valores mais baixos de acidez carboxílica (70,75 e 69,44 cmol_c kg⁻¹, respectivamente) em relação aos AH isolados dos demais Latossolos. Os teores de hematita e goethita, no primeiro solo, e de Al³⁺, no segundo, aumentam a possibilidade de formação de complexos estáveis com Fe e Al. Mendonça & Rowell (1996) mostraram o bloqueio dos grupamentos funcionais oxigenados pela formação de complexos. Esse bloqueio pode diminuir a evolução química das SH promovendo acúmulo de AF ou de AH com baixo grau de humificação.

Os valores da relação E₄/E₆ variaram numa faixa muito ampla, com valor médio de 6,5 para AH e 10,5 para os AF. Os valores de E₄/E₆ para os AH variaram de 4,0 para o AH isolado do LVAd e 8,9 para AH isolado de LVd. Já o maior valor de E₄/E₆ dos AF foi encontrado no AF isolado do LBdf e os menores nos LVAd e LVAdf (9,3 para ambos). Essa relação foi utilizada para caracterizar as SH em vários tipos de ambientes por Kononova (1982). Foi observado anteriormente por cromatografia que os valores dessa relação decresciam com o aumento da complexidade e heterogeneidade das amostras de SH, indicando que esse atributo poderia ser utilizado para estimar o grau de humificação (Kononova, 1982).

Os valores da relação em solos naturalmente férteis, de clima temperado, são menores do que 5 para AH e entre 6 e 8,5 para AF (Stevenson, 1994), valores bem abaixo da faixa observada para as SH dos Latossolos estudados. É possível então indicar menor grau relativo de complexidade química das SH dos Latossolos em relação aos solos de regiões de clima temperado. Chen et al. (1977) verificaram que a relação E₄/E₆ é governada, principalmente, pela massa molecular, uma vez que o fenômeno do espalhamento da luz no comprimento de onda do visível é fortemente influenciado pela massa molecular tanto quanto a presença de cromóforos. Esses autores observaram uma correlação inversa e significativa entre E₄/E₆ e a massa molecular média determinada por cromatografia de exclusão ou por ultracentrifugação. Sendo assim, é possível propor que os agregados húmicos compostos pelos AH apresentam tamanho relativamente maior do que os formados pelos AF e que esses são bem menores do que os observados para SH de clima temperado.

Adicionalmente, foi realizada, neste estudo, a estimativa da massa molar média das SH solúveis.

utilizando-se a equação de Ching et al. (1994) validada pelo estudo de Peuravarouri & Pihlaja (2004). Os valores absolutos da massa molar média obtidas dessa forma podem ser usados para uma comparação relativa entre as substâncias obtidas com mesmo procedimento experimental. Foram encontrados valores entre 990 e 1.227 g mol⁻¹ de C_{AH} e de 507 e 887 g mol⁻¹ de C_{AF}, respectivamente, ou seja, um incremento médio de 63 % no tamanho do agregado húmico em relação ao agregado fúlvico. Essa distribuição média da massa molar relativamente pequena para as SH dos Latossolos é compatível com os valores elevados de acidez total, carboxílica e fenólica, da relação E₄/E₆ e com o baixo teor de C e elevado de O encontrados anteriormente.

As figuras 1 e 2 apresentam os espectros de IV-TF dos AH e AF isolados dos Latossolos estudados, respectivamente. Os espectros apresentaram perfil típico de ácidos orgânicos fracos e polipróticos (Colthup et al., 1964). De modo geral, os espectros de AH apresentam nove bandas de absorção bem definidas e comum a todos: uma banda de absorção intensa, forte e larga com centro em 3.380 cm⁻¹ (variando de 3.346 a 3.396 cm⁻¹) devido ao estiramento de ligações O-H de vários grupos hidroxilados, mas principalmente ácidos carboxílicos capazes de fazer ligações hidrogênio que alteram a frequência de estiramento provocando o alargamento da banda de absorção; uma aguda e bem definida banda de absorção centrada em 2.929 cm⁻¹ devido ao estiramento simétrico de ligações C-H, principalmente de grupos metil (CH₃); banda de absorção forte e larga com centro em 1.716 cm⁻¹ (variando entre 1.722 cm⁻¹ e 1.712 cm⁻¹), atribuída genericamente à presença de carbonilas (C=O) em cetonas e aldeídos; uma banda de absorção intensa e alargada em 1.634 cm⁻¹ (1.625 e 1.635 cm⁻¹) atribuída à presença de uma série de estiramento simétricos de ligações C=O de grupos COO⁻; banda de Amida II e quinonas; banda de absorção centrada em 1.533 cm⁻¹, devido a estiramentos C-C de anéis aromáticos (indicador da presença de ligninas) e sistemas N=C conjugados; uma banda de absorção em 1.447 cm⁻¹ atribuída à deformação de ligações C-H de grupos metil e metilenos; uma banda de absorção bem definida centrada em 1.249 cm⁻¹ atribuída à presença de deformação de O-H em grupos carboxílicos e ligações éster (C-O) e ainda à presença de fenóis; uma banda de absorção centrada em 1.126 cm⁻¹ e 1.035 cm⁻¹ devida a estiramentos C-O de polissacarídeos nos AH. Por fim, as bandas de absorção entre 800 e 900 cm⁻¹ atribuídas a vibrações de ligações C-H de grupos aromáticos e de impurezas inorgânicas e organometálicas.

As principais diferenças entre os AH residem na intensidade da banda de absorção atribuída a CH₃ (mais intensa nos AH LBdf, LAe e LVAdf, com aparecimento de uma absorção adicional em 2.840 cm⁻¹ atribuída a C-H de metilenos) e no alargamento da banda de absorção em 1.634 cm⁻¹ nos AH isolados do LBdf e LVAd. A análise da região de impressão digital

(entre 1.400-900 cm^{-1}) revela uma similaridade muito grande na funcionalidade dos espectros de IV, mas que, no entanto, não são exatamente idênticos, indicando uma gênese distinta para cada AH nos sete Latossolos estudados.

Os espectros de IV dos AF são compatíveis com a maior homogeneidade estrutural desse conjunto de agregados húmicos, apresentando-se de forma mais simplificada, com absorções mais agudas e com sensíveis diferenças entre os tipos de AF. É comum a

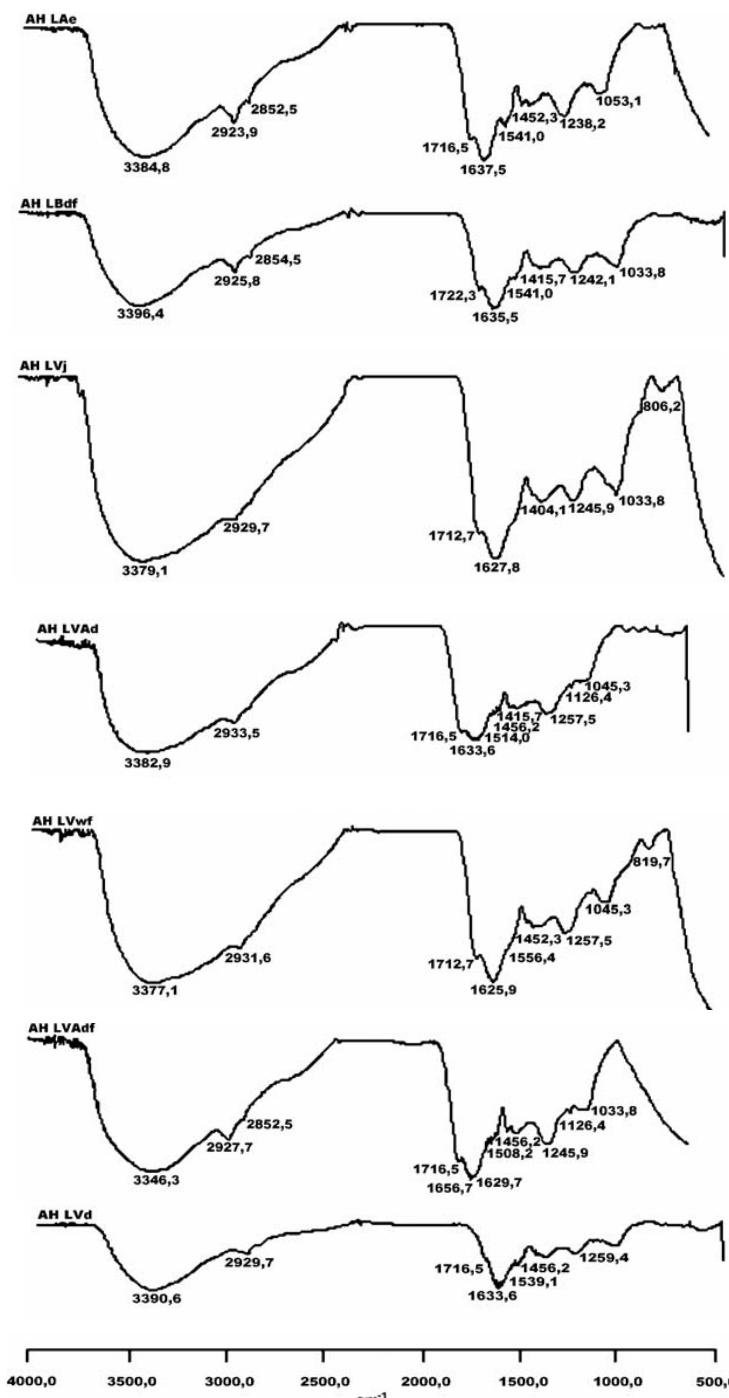


Figura 1. Espectros na região de infravermelho obtidos com transformada de Fourier de ácidos húmicos (AH) isolados do horizonte superficial dos sete Latossolos brasileiros.

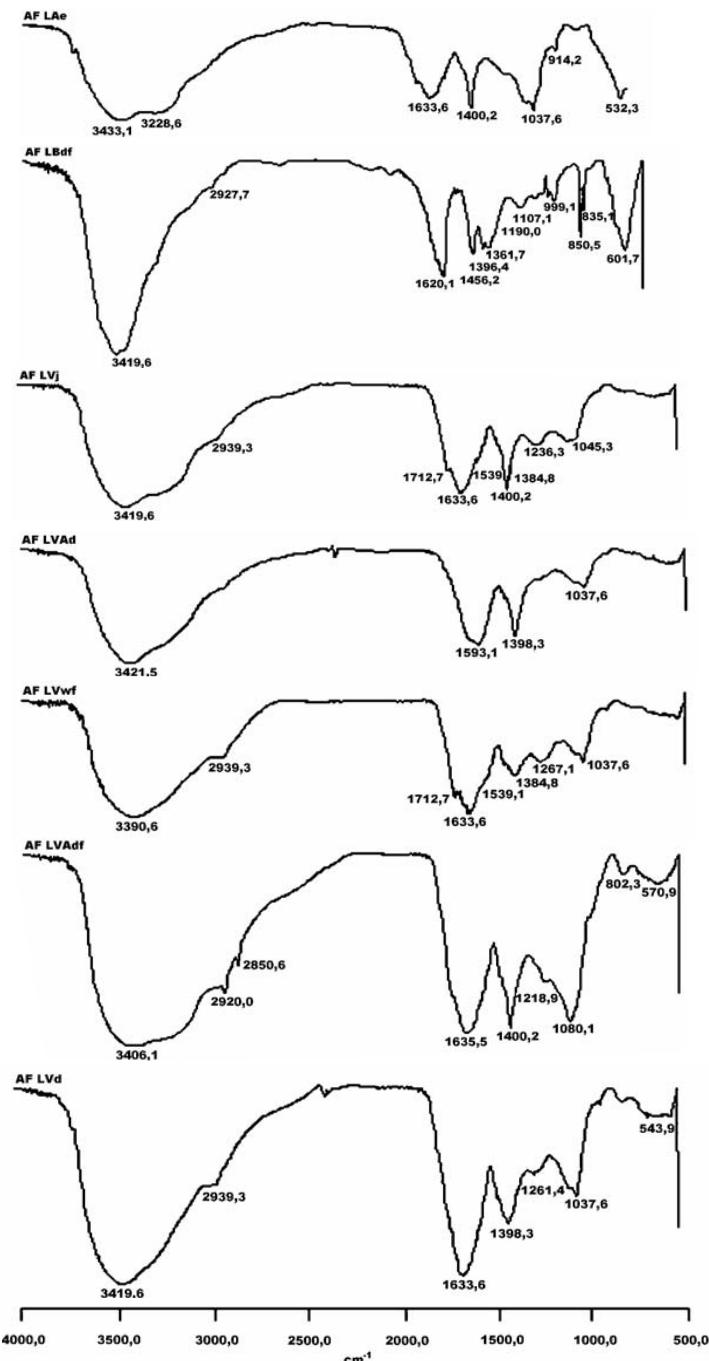


Figura 2. Espectros na região de infravermelho obtidos com transformada de Fourier de ácidos fulvicos (AF) isolados do horizonte superficial dos sete Latossolos brasileiros.

todos os AF a banda de absorção centrada em 3.419 cm⁻¹, atribuída a estiramentos O-H, mais alargada nos AF isolados do LVAdf, LVj e LAe, que apresentaram um ombro adicional em 3.228 cm⁻¹. Essa banda de absorção centrada em 3.400 cm⁻¹ é bem mais estreita no AF isolado do LBdf, indicando baixo grau de

associação dessas SH. Os AF isolados do LVj, LVwf e LVd apresentaram ombro de absorção em 2.940 cm⁻¹ atribuído a estiramento C-H de metilas.

A intensidade de emissão de fluorescência com excitação fixa em 465 nm (IF₄₆₅) foi maior nos AH comparada aos AF. Entre os diferentes AH, os isolados

do LBdf e do LVAd tiveram quase o dobro da IF₄₆₅ do que os AH isolados do LVj e do LVwf. Os AH isolados do LVd, LVAdf e LAe apresentam IF₄₆₅ intermediária entre os extremos citados. Os AF isolados de LBdf e LVd apresentam uma intensidade muito baixa de emissão de fluorescência, enquanto os AF isolados de LVwf e LVAdf apresentam uma intensidade relativamente maior. A IF₄₆₅ pode ser usada com objetivo de discriminar as SH (Senesi et al., 1991) e estabelecer uma ordem relativa ao grau de humificação entre os AH e AF estudados. Milori et al. (2002) obtiveram correlações significativas entre a IF₄₆₅ e a concentração de radicais do tipo semiquinonas e com o grau de aromaticidade obtido por RMN ¹³C em AH de diferentes fontes. O interesse dessa correlação, de acordo com Milori et al. (2002), vem da possibilidade de interpretação da teoria da humificação no sentido de identificar um aumento do grau de maturidade das SH com a estabilização de estruturas conjugadas com ressonância de elétrons, tais como anéis aromáticos e radicais livres do tipo semiquinona que aumentam de concentração com a evolução química das SH (Zech et al., 1997). Dessa forma, SH mais humificadas devem apresentar, relativamente, maior intensidade de emissão de fluorescência com excitação no azul (Senesi et al., 1991). Segundo o índice IF₄₆₅, o grau de humificação dos AH apresenta a ordem: LBdf = LVAd > LVd = LVAdf > LAe > LVwf = LVj, e a dos AF a seguinte: LVAdf = LVwf > LVj > LVAd = LAe > LVd > LBdf.

A capacidade de oxidação das SH determinada a pH 7 (Cox₇) está associada à presença de elétrons disponíveis para reações de oxirredução, importantes na complexação de íons, principalmente Fe (Struyk & Sposito, 2001). A capacidade de transferir um mol_c para uma unidade de massa de um agente oxidante forte (capacidade de oxidação, Cox) pode avaliar indiretamente o grau de humificação das SH, uma vez que a quantidade de elétrons está relacionada à presença de radicais livres do tipo semiquinona (Baldotto, 2006). A Cox definiu assim o poder redutor das SH, que foi compatível com o seu grau de evolução química (Baldotto et al., 2005). A Cox em pH 7 variou de 1,51 a 3,48 mol_c kg⁻¹ para AH e 1,04 a 2,45 mol_c kg⁻¹ para os AF.

Os espectros de RMN ¹H de AH e AF isolados dos Latossolos são apresentados na figura 3 e resultado da integração das principais regiões de deslocamento químico (δ_H) dos respectivos espectros, mostrados no quadro 3. Os espectros foram divididos em três regiões principais de δ_H . A primeira região entre 0,2 e 3,0 Hz MHz⁻¹ é geralmente assinalada como a de H alifáticos, enquanto o final dessa faixa do espectro, entre 2,0 e 2,8 Hz MHz⁻¹, pode ser atribuído a H ligados a átomos eletronegativos (O e N). O δ_H entre 0,9 e 1,3 Hz MHz⁻¹ pode ser atribuído à existência de H em grupos metilas de cadeias alifáticas ramificadas ou grupos metilas em posição terminal em longas cadeias metilénicas. A segunda região é compreendida pelos δ_H entre 3 e 4,5 Hz MHz⁻¹ e atribuída a H ligados

a C α ligados a O e no caso de SH genericamente atribuídos à presença de polissacarídeos. A terceira região, entre 6 e 8,5 Hz MHz⁻¹, é em virtude da presença de H em anéis aromáticos. Os AH apresentam um conteúdo bem mais elevado de H em cadeias alifáticas hidrofóbicas do tipo metila e metileno com δ_H entre 0 e 2 Hz MHz⁻¹ do que os AF. Além disso, os AH apresentam em média um teor de H na região de compostos aromáticos de 17 %, enquanto nos AF esse valor é de 11 %. Os AF apresentaram menor quantidade de H em grupos metilas (CH₃) e metilenos (CH₂) do que os AH e, além disso, a quantidade relativa de CH₂ foi maior do que a de CH₃ nos espectros dos AF.

Outra diferença significativa com relação à distribuição de H nos AF em relação aos AH corresponde a maior quantidade de H na região de δ_H entre 3 e 4,5 Hz MHz⁻¹ que, corresponde genericamente à região de H-C-O, CH-C=O, e de olefinas (duplas ligações). Essa região correspondeu, em média, a 44 % dos H nos AF e a 33 % nos AH. Essa maior quantidade de H ligadas a O está de acordo com a maior acidez total dos AF. O grau de aromaticidade dos AH decresce na ordem: LAe = LVd > LVj > LBdf = LVwf = LVAdf > LVAd, e o de hidrofobicidade na ordem: LVwf > LBdf > LVAd >

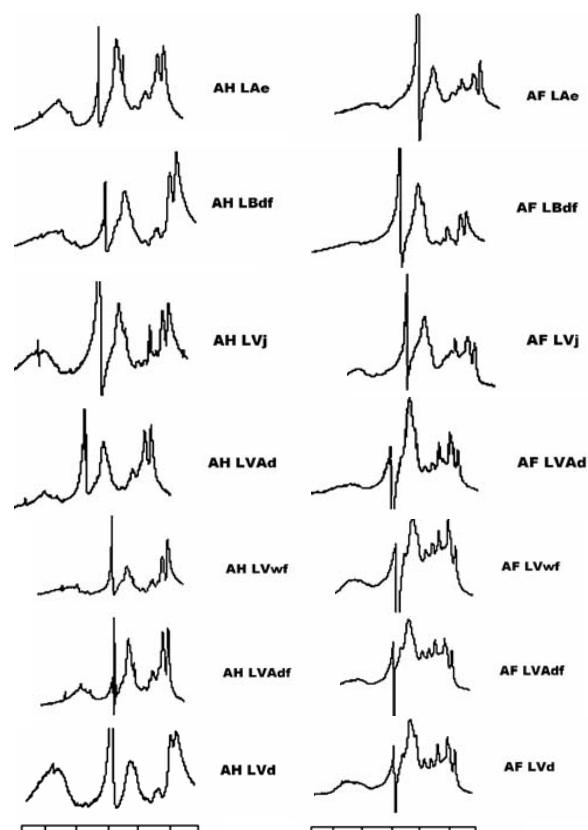


Figura 3. Espectros de RMN ¹H de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) do horizonte superficial dos sete Latossolos brasileiros

Quadro 3. Distribuição relativa dos deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio em Hz MHz⁻¹ obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) de sete Latossolos brasileiros estudados

Latossolos ⁽¹⁾	H alifático			H polissacarídeo			H aromático		
				HzMHz ⁻¹					
	0,2-3,0	3,0-4,5	6,0-8,5						
%									
Ácidos Húmicos									
LAe	45	34	21						
LBdf	54	30	16						
LVj	47	35	18						
LVAd	53	35	12						
LVwf	55	29	15						
LVAdf	47	39	14						
LVd	52	27	21						
Média	50	33	17						
DP	4,0	4,2	3,5						
Ácidos Fúlvicos									
LAe	53	30	16						
LBdf	42	46	12						
LVj	46	40	14						
LVAd	42	50	8						
LVwf	46	42	12						
LVAdf	49	47	5						
LVd	40	51	9						
Média	45	44	11						
DP	4,5	7,2	3,8						

⁽¹⁾ LAe: Latossolo Amarelo eutrófico; LBdf: Latossolo Bruno distroférreo; LVj: Latossolo Vermelho perférreo; LVAd: Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico; LVwf: Latossolo Vermelho acriférreo; LVAdf: Latossolo Vermelho-Amarelo distróférreo; LVd: Latossolo Vermelho distrófico. DP: desvio-padrão.

LVd > LVj = LVAdf > LAe. Já para os AF, o grau de aromaticidade decresce na seguinte ordem: LAe > LVj > LBdf = LVwf > LVd > LVAd > LVAdf, e o de hidrofobicidade na sequência a seguir: LAe > LVAdf > LVwf = LVj > LVAd = LBdf > LVd. A aplicação da RMN ¹H permitiu observar que os AH são mais hidrofóbicos, menos ácidos e com conteúdo maior de compostos aromáticos. Por outro lado, as principais absorções dos AF dizem respeito ao elevado conteúdo de grupamentos oxigenados -COOH, -OCH₃, -C=O e OH de fenóis, originados de polissacarídeos de origem vegetal como ligninas e celulose. Foi possível, portanto, estabelecer um processo de humificação seletivo para as SH dos Latossolos, ou seja, o processo de humificação é bastante similar ao observado anteriormente por Zech et al. (1997), que viram uma diminuição na intensidade da região dos espectros de RMN atribuída a polissacarídeos e aumento relativo da intensidade da região de grupos alifáticos e aromáticos. Esta seqüência é comum ao processo de latossolização dos horizontes superficiais.

Foi usada a técnica de estatística multivariada para discriminar as SH usando os atributos químicos como grupos de variáveis. Os resultados obtidos da simulação feita neste trabalho foram decompostos em autovalores/autovetores. Esses autovalores forneceram a variância dos componentes principais. Observou-se que 87 % da variância total foi representada pelos três primeiros componentes principais, podendo-se distinguir facilmente o grupo dos AH e dos AF (Figura 4). Os componentes principais, ao contrário das variáveis originais, não possuem significado físico, mas podem ser interpretados como uma combinação linear dessas variáveis originais. No caso mostrado na figura 4, por exemplo, as variáveis originais de maior peso

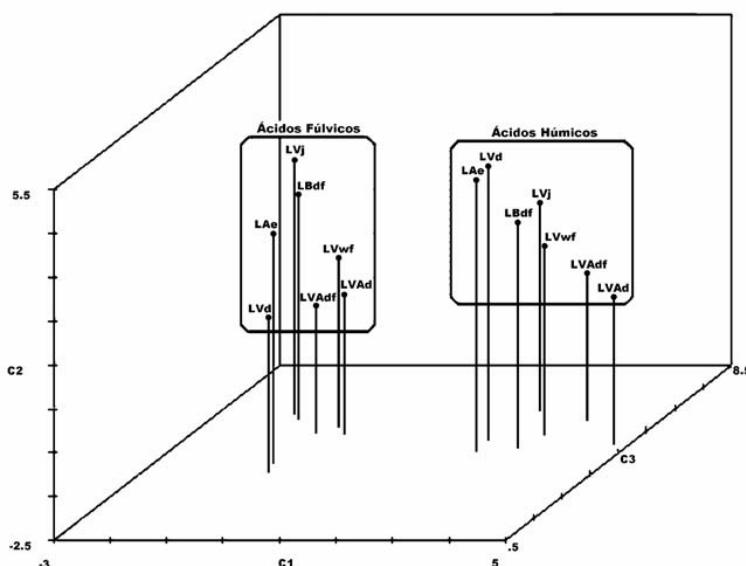


Figura 4. Análise de agrupamentos em componentes principais.

foram: relação E_4/E_6 > relação atômica C/H > relação atômica O/C.

A figura 5 apresenta os resultados da análise estatística gráfica utilizada com todos os atributos químicos analisados para discriminar ou agrupar os AH ou os AF, por meio da análise de componentes principais (ACP). Neste caso, a ACP foi usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso foram as mais importantes no ponto de vista estatístico.

Para os AH foi possível observar 89 % da variação nos primeiros três componentes. As variáveis de maior valor para discriminar os AH foram: aromaticidade por RMN > massa molar média > relação E_4/E_6 . Foi possível observar claramente que, apesar da similaridade funcional entre os AH, há uma nítida distinção entre os diferentes Latossolos, evidenciando uma identidade química particular para cada AH (Figura 5a). Já para os AF, observaram-se 86 % da variação nos três primeiros componentes, e as variáveis de maior poder de discriminação foram: o

índice de fluorescência (IF), a relação E_4/E_6 , e a relação atômica O/C, respectivamente. Assim como os AH, foi possível observar que os AF possuem uma clara similaridade funcional, porém também se distinguem pela ACP (Figura 4b).

CONCLUSÕES

1. As análises químicas e espectroscópicas dos AH e AF permitiram concluir que estes compostos possuem características estruturais diferenciadas.

2. Os AF apresentaram menor teor de C, maior de O e de grupos ácidos e menor número de bandas de absorção bem definidas na região do IV, além de mais baixas relação E_4/E_6 , massa molar média, intensidade de fluorescência com excitação fixa em 465 nm, capacidade de oxidação, grau de aromaticidade e hidrofobicidade do que os AH.

3. Os dados da composição elementar, acidez e atividade redox das substâncias húmicas foram confirmados pelas análises espectroscópicas, indicando que a gênese das SH pode ser agrupada utilizando-se atributos químicos como grupos de variáveis.

4. A ACP permitiu obter uma identidade química particular tanto para os AH quanto para os AF. Foi possível distinguir facilmente, pela análise de agrupamentos, o grupo dos AH e dos AF.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, processo número 4813/2004-9, concedido ao prof. Áry Carlos Xavier Velloso. Os autores agradecem à professora Maria Cristina Canela pela colaboração na determinação da capacidade de oxidação.

LITERATURA CITADA

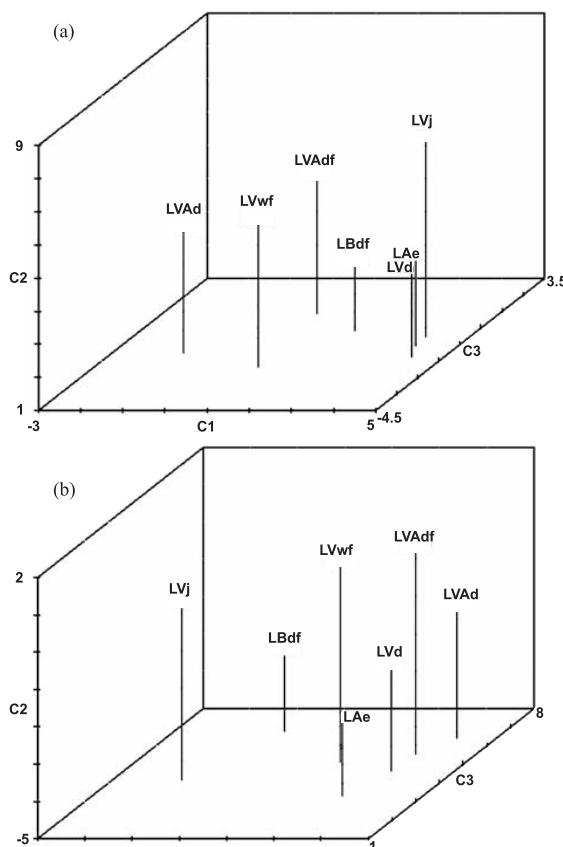


Figura 5. Dispersão (a) dos ácidos húmicos e (b) dos ácidos fúlvicos isolados dos Latossolos em relação aos seus escores, nos três primeiros componentes principais.

AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L. & MACCARTHY, P. Introductory remarks. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L. & MACCARTHY, P., eds. Humic substances in soil, sediment and waters. New York, John Wiley, 1985. p.1-12.

ANJOS, L.H.C. Caracterização, gênese, classificação e aptidão agrícola de uma seqüência de solos do Terciário na região de Campos, RJ. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1985. 110p. (Tese de Mestrado)

BALDOTTO, M.A.; CANELLAS, L.P.; CANELA, M.C. & VELLOSO, A.C.X. Propriedades redox das substâncias húmicas. In: CANELLAS, L.P. & SANTOS, G.A., eds. Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes, 2005. p.201-223.

- BALDOTTO, M.A. Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos. em produção vegetal. Campos dos Goytacazes, UENF, 2006. 100p. (Tese de Doutorado)
- BARRETO, W.O. Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: Capacidade da dupla camada elétrica. Itaguá, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1986. 294p. (Tese de Doutorado)
- CANELLAS, L.P.; ESPINDOLA, J.A.; REZENDE, C.E.; CAMARGO, P.B.; ZANDONADI, J.A.A.; RUMJANEK, V.M.; GUERRA, J.G.M.; TEIXEIRA, M.G. & BRAZ-FILHO, R. Organic matter quality in a soil cultivated with perennial herbaceous legumes. *Sci. Agric.*, 61:53-61, 2004.
- CHEM, Y., SENESI, N. & SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41:352-358, 1977.
- CHING, Y.P.; AIKEN, G. & O'LOUGHLIN, E. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 28:1853-1858, 1994.
- COLTHUP, N.B.; DALY, L.H. & WIBERLEY, S.E. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. New York, Academic Press, 1964. 510p.
- CURTIN, D. & WEN, G. Organic matter fractions contributing to soil nitrogen mineralization potential. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:410-415, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa do Solo. Levantamento e classificação de solos. Rio de Janeiro, Produção de Informação, 1980. (Boletim, 62)
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa do Solo. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro, Produção de Informação, 1999. 412p.
- FONTES, M.P.F., CAMARGO, O.A. & SPOSITO, G. Eletroquímica das partículas coloidais e sua relação com a mineralogia de solos altamente intemperizados. *Sci. Agric.*, 58:627-646, 2001.
- GNANADESIKAN, R. Methods for statistical data analysis of multivariate observations. New York, John Wiley & Sons, 1977. 299p.
- JACQUIN, F. & VONG, P.G. Incorporation of nitrogen fertilizer in the humified compounds of a typic Hapludalf. *Sci. Total Environ.*, 81/82:465-469, 1989.
- KONONOVA, M.M. Matéria orgánica del suelo: Su naturaleza, propiedades y métodos de investigación. Barcelona, Oikos-Tou, 1982. 365p.
- KUMADA K. Studies on the colour of humic acids. Part 1. On the concepts of humic substances and humification. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 11:11-16, 1965.
- MARTIN-NETO, L.; ROSELL, R. & SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. *Geoderma*, 81:305-311, 1998.
- MENDONÇA, E.S. & ROWELL, D.L. Mineral and organic fractions of two oxisols and their influence on effective cation-exchange capacity. *Sci. Soc. Am. J.*, 60:1888-1892, 1996.
- MENDONÇA, E.S.; ROWELL, D.L.; MARTINS, A.G. & SILVA, A.P. Effect of pH on the development of acidic sites in clayey and sandy loam Oxisol from the Cerrado Region, Brazil. *Geoderma*, 132:131-142, 2006.
- MILORI, D.M.B.P.; MARTIN NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUCK, J. & BAGNATO, V.S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, 167:739-749, 2002.
- PEURA VAROURI, J. & PIHLAJA, K. Preliminary study of lake dissolved organic matter in light of nanoscale supramolecular assembly. *Environ. Sci. Technol.*, 38:5958-5967, 2004.
- PICCOLO, A.; NARDI, S. & CANCHERI, G. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.*, 47:319-328, 1996.
- PICCOLO, A. The Supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.*, 75:57-134, 2002.
- PICCOLO, A. & SPITELLER, M. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377:1047-1059, 2003.
- RESENDE, M.; CURI, N.; REZENDE, S.B. & CORRÉA, G.F. Pedologia: Base para a distinção de ambientes. Viçosa, MG, NEPUT, 1997. 367p.
- RICE, J.A. & MACARTHY, P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, 17:635-648, 1991.
- RODRIGUES, T.E. & KLANT, E. Mineralogia e gênese de uma sequência de solos do Distrito Federal. *R. Bras. Ci. Solo*, 2:132-139, 1978.
- RUMJANEK, V.M. Ressonância magnética nuclear. In: CANELLAS, L.P. & SANTOS, G.A. eds. *Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, 2005.p.160-184.
- SAAB, S.C. & MARTIN-NETO, L. Anéis aromáticos condensados e relação E_4/E_6 : Estudo de ácidos húmicos de gleissolos por RMN de ^{13}C no estado sólido utilizando a técnica CP/MAS desacoplamento defasado. *Química Nova*, 30:260-263, 2007.
- SCHNITZER, M. & GUPTA, U.C. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Am. Soc. Proc.*, 29:274-277, 1965.
- SENESI N.; MIANO, T.M.; PROVENZANO, M.R. & BRUNETTI, G. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, 152:259-271, 1991.

- SIMPSON, A.J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Res. Chem.*, 40:572-582, 2002.
- STEVENSON, J.F. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions.* 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1994. 496p.
- STRUYK, Z. & SPOSITO, G. Redox properties of standard humic acids. *Geoderma*, 102:329-346, 2001.
- SUTTON, R. & SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environ. Sci. Technol.*, 39:9009-9015, 2005.
- ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T.M., MILTNER, A. & SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralizatino of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79:117-161, 1997.