

CONGRESSO
BRASILEIRO
DE CIÊNCIA
DO SOLOCONQUISTAS
& DESAFIOS
da Ciência do
Solo brasileira

De 05 a 10 de agosto de 2007 Serrano Centro de Convenções - Gramado-RS

Estudo Quimiométrico de Características Químicas e Espectroscópicas de Ácidos Húmicos Extraídos de Solos com Horizonte A Antrópico

Tony Jarbas Ferreira Cunha⁽¹⁾, Etelvino Henrique Novotny⁽²⁾, Beata Emock Madari⁽³⁾, Ladislau Martin Neto⁽⁴⁾, Luciano Pasqualoto Canellas⁽⁵⁾, Vanderlise Giongo Petrere⁽⁶⁾

RESUMO - Ácidos húmicos de solos escuros da Amazônia brasileira (Terra Preta do Índio) foram caracterizados utilizando-se espectroscopias de UV-Vis, DRIFT, Fluorescência nos modos de excitação e emissão, EPR, e RMN, análises termogravimétricas, composição elementar, e medidas de acidez (total, carboxílica e fenólica) e os dados obtidos foram avaliados por técnicas de estatística multivariada. A fração ácidos húmicos (AH) foi extraída utilizando-se o método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Os AH foram separados em três grupos conforme o uso da terra: Solos antropogênicos sob floresta (SAF), solos antropogênicos sob cultivo (SAC) e solos não antropogênicos sob floresta (SNAF). Os solos do grupo SNAF são representativos dos Latossolos amazônicos e foram coletados em áreas adjacentes aos solos antropogênicos, sendo este o grupo referência para comparação com os grupos SAF e SAC. Análises estatísticas multivariadas (análise fatorial, análise de agrupamento e análise discriminante) foram aplicadas no estudo. A mais relevante característica dos AH dos solos antropogênicos, comparado aos solos não antropogênicos foram sua superior reatividade, estabilidade, e grau de humificação. Os resultados obtidos também mostraram diferenças entre os AH dos grupos SAF e SAC.

Introdução

Na Amazônia brasileira, ocorrem solos com horizontes superficiais de coloração escura e que apresentam elevados teores de nutrientes, denominados de horizonte A antrópico, e estes solos, mesmo quando submetidos ao uso agrícola, mantêm as suas características de fertilidade e altos conteúdos de matéria orgânica por muitos anos. Esse tipo de epipedon é encontrado em diversos tipos de solos de ocorrência na Amazônia brasileira, tais como Latossolos, Argissolos, Cambissolos, Plintossolos e Nitossolos, ainda sob floresta ou submetidos a diversos

tipos de exploração agrícola com culturas de subsistência como o milho, feijão e mandioca, além de fruticultura, hortaliças e até mesmo produção de grama em larga escala.

Vários trabalhos foram realizados, principalmente em relação à gênese dos solos com horizonte A antrópico. Entretanto, muito pouco foi feito no que diz respeito a estudos sobre as características químicas, propriedades físico-químicas e espectroscópicas da sua matéria orgânica. Nada foi encontrado na literatura em relação ao estudo destas propriedades, em frações humificadas da matéria orgânica, quando estes solos são submetidos ao uso agrícola.

O objetivo desse trabalho foi estudar a natureza físico-química e as características espectroscópicas de ácidos húmicos de solos com horizonte A antrópico, submetidos ao uso agrícola, de diversas regiões da Amazônia brasileira utilizando-se a técnica da análise multivariada.

Palavras-Chave: Solos Antropogênicos, Substâncias Húmicas, Análise multivariada.

Material e métodos

Foram selecionadas 18 áreas de ocorrência de solos antropogênicos nas regiões de Humaitá, Lábrea, Apuí, Novo Aripuanã, Manicoré e Manaus, no estado do Amazonas. Nesses solos foram realizadas amostragens do horizonte A Antrópico (Horizonte Au1), em função da separação morfológica realizada no campo. A amostragem foi realizada na camada de 0-20 cm, coletando-se várias sub-amostras que foram misturadas e acondicionadas para as análises futuras.

As áreas de estudo, foram selecionadas em função dos diferentes sistemas de uso encontrados, abrangendo áreas sob mata e áreas cultivadas. Também foram selecionados quatro solos adjacentes a algumas manchas de

⁽¹⁾ Primeiro Autor é Pesquisador da Embrapa Semi-Árido: tony@cpatsa.embrapa.br

⁽²⁾ Segundo Autor é Pesquisador da Embrapa Solos: etelvino@cnps.embrapa.br

⁽³⁾ Terceiro Autor é Pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão: madari@cnpaf.embrapa.br

⁽⁴⁾ Quarto Autor é Pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária: ladislau@cnpdia.embrapa.br

⁽⁵⁾ Quinto Autor é Professor da Universidade do Norte Fluminense-UENF: canellas@uenf.br

⁽⁶⁾ Sexto autor é Pesquisadora da Embrapa Semi-Árido: vanderlise@cpatsa.embrapa.br

Apoio financeiro: Embrapa Solos.



solos antropogênicos sob mata. No total trabalhou-se com 22 amostras de solos, em função do uso e tipo de solo, que foram agrupados em **SAF**: Solos antropogênicos sob floresta; **SAC**: Solos antropogênicos sob cultivo, e **SNAF**: Solos não antropogênicos sob floresta.

A extração e o fracionamento da MOS para obtenção dos ácidos húmicos, bem como sua purificação, foram realizados conforme método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), cujo protocolo metodológico encontra-se descrito em [1]. As curvas de termodecomposição de todas as amostras de ácidos húmicos foram obtidas em um analisador termogravimétrico, TGA-50 SHIMADZU, utilizando-se $3,3 \pm 0,1$ mg de amostras, em ambiente estático ao ar. A composição dos ácidos húmicos foi determinada em analisador elementar. A acidez total, carboxílica e fenólica foi determinada conforme [2]. A espectroscopia na região do ultravioleta-visível, relação E_4/E_6 e coeficiente $\Delta \log k$ foi realizado conforme procedimentos descritos [3]. A espectroscopia na região do infravermelho DRIFT foi obtida em unidades de Kubelka-Munk.

Os espectros de fluorescência foram registrados em 3 modos: emissão, excitação e síncrona em espectrômetro de luminescência Perkin Elmer LS50B, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, utilizando-se soluções de 2 mg de AH em 100 mL de NaHCO_3 $0,005 \text{ mol L}^{-1}$, com pH resultante de aproximadamente 8,4, abertura das fendas de 10 nm e velocidade de aquisição de 20 nm/min. As medidas de radicais livres orgânicos foram realizadas usando espectrômetro de RPE da Bruker-EMX operando em banda X (aproximadamente 9,0 GHz) em temperatura ambiente [4].

Os experimentos de RMN ^{13}C com polarização cruzada com amplitude variável (VACP) e rotação em torno do ângulo mágico (MAS) (VACP/MAS RMN ^{13}C) foram realizados em um espectrômetro Varian (modelo Unity Inova 400), da Embrapa Instrumentação Agropecuária, utilizando aproximadamente 600 mg de ácidos húmicos. As inferências sobre os resultados foram efetuadas com base em análise de regressão multivariada, e estatísticas multivariada de componentes principais com rotação varimax (PCA), análise hierárquica de agrupamentos (“clusters”) e análise discriminante.

Resultados e Discussão

Utilizou-se a análise fatorial buscando-se avaliar todo o conjunto de variáveis obtidas através das diferentes técnicas utilizadas nesse estudo. Visto que os dados foram padronizados (média zero e desvio padrão unitário), utilizou-se o método de Kaiser para se determinar o número de fatores extraídos, ou seja, se extraiu apenas aqueles fatores cujo autovalor fosse

maior do que 1. Assim, os resultados da análise fatorial efetuada com os dados obtidos nas diferentes técnicas utilizadas nesse estudo, indicaram a possibilidade de reduzir o grupo de variáveis para quatro dimensões sem perda de muita informação, pois esses quatro fatores capturaram 86% da variância total dos dados originais (Tabela 1).

Após a rotação varimax e baseado nos carregamentos propõem-se a seguinte identificação dos fatores obtidos: → O primeiro fator capturou 43% da variância total e foi caracterizado por: Aumento do grau de oxidação, da razão O/H, da acidez carboxílica, do índice de aromaticidade DRIFT e do aumento do índice termogravimétrico. Diminuição da razão E_4/E_6 , dos teores de hidrogênio, dos teores de nitrogênio e da razão H/C. Como todas essas características podem ser atribuídas ao aumento do grau de humificação denominou-se esse como “fator humificação”. → O segundo fator capturou 16% da variância total e foi caracterizado por: Aumento do teor de oxigênio e da razão O/C e diminuição do índice de hidrofobicidade e do teor de carbono. Devido a isso foi denominado “fator hidrofiliçidade”. → Já o terceiro fator que capturou 11% da variância total foi caracterizado por: Aumento da acidez total e aumento da acidez fenólica. Sendo denominado de “fator acidez”. → E por último o quarto fator capturou 0,2% da variância total e foi caracterizado por: Aumento no teor de cinzas e largura da linha nos espectros de EPR e diminuição do conteúdo de Spins. g^{-1} obtido por EPR, índice A_4/A_1 e I_{480}/I_{400} obtidos pela espectroscopia de fluorescência. Devido a isso foi denominado “fator cinzas” por contribuição dessa variável e de seus efeitos sobre as análises espectroscópicas [5].

Os escores do fator humificação possibilitaram a separação dos ácidos húmicos dos grupos SAF e SAC do grupo SNAF (Figura 2), sendo estes últimos menos humificados; já o fator hidrofiliçidade possibilitou uma separação parcial das amostras dos grupos SAF e SAC, sendo as do grupo SAF mais hidrofílicas em relação à média geral (maioria das amostras).

Foi observado dentro do fator 4, que a variável cinzas se correlacionou com as variáveis spins. g^{-1} , largura da linha (obtidos da EPR), razão A_4/A_1 e $A_{480}/400$ (obtidos dos espectros de fluorescência), indicando que parte da variância destes dados foi devida ao efeito das cinzas nas amostras dos ácidos húmicos estudados, Tabela 1 e Tabela 2. Segundo [6], as substâncias húmicas contém íons paramagnéticos que podem afetar os resultados das análises de ressonância paramagnética nuclear.

Visando-se eliminar o efeito das cinzas na análise fatorial para interpretação mais precisa dos resultados, obteve-se regressões lineares entre o teor de cinzas e as variáveis que se correlacionaram com esse teor, e utilizou-se o resíduo dessa regressão (variância não explicada pelo modelo de regressão) para a realização de uma nova análise fatorial (Tabela 3).

Após as correções o resultado da análise foi: → O fator 1 (humificação) capturou 46% da variância total e foi caracterizado por: Aumento do grau de oxidação, da razão



O/H, da acidez carboxílica, da concentração de spins, do índice de aromaticidade determinado por DRIFT, além do índice termogravimétrico (ITG); Diminuição da razão E_4/E_6 , dos teores de hidrogênio, dos teores de nitrogênio e da razão H/C; → O fator 2 (hidrofilicidade) capturou 18% da variância total e foi caracterizado por: Aumento do teor de oxigênio e da razão O/C; Diminuição do índice de hidrofobicidade e do teor de carbono. → O fator 3 (acidez) respondeu por 12% da variância total e foi caracterizado por: Aumento da acidez total e aumento da acidez fenólica. → O fator 4, capturou 2% da variância e teve contribuições importantes apenas de índices obtidos da espectroscopia de fluorescência, indicando que mesmo após a correção do efeito das cinzas nesses dados, eles não se correlacionaram com nenhuma das demais técnicas empregadas, não tendo qualquer relação com o grau de humificação obtido pelas mais diversas técnicas, tais como análise elementar, termogravimétrica e espectroscopias eletrônica (UV-Vis), vibracional (DRIFT) e ressonância magnética, tanto nuclear (RMN) como eletrônica (RPE).

Após a remoção do efeito das cinzas a concentração de radicais livres orgânicos, determinada por RPE, que fazia parte do fator 4 na Tabela 1, passou a contribuir significativamente no fator 1 na Tabela 3, e, portanto se relaciona com o grau de humificação dos ácidos húmicos estudados. Na Figura 2 pode-se observar o comportamento dos ácidos húmicos em função dos dois primeiros fatores (humificação e hidrofilicidade). Novamente o fator humificação separou claramente as amostras do grupo SNAF, sendo estas, menos humificadas, enquanto que as amostras do grupo SAF tenderam a ter uma maior hidrofilicidade em relação às do grupo SAC.

A análise de agrupamento hierárquico dos resultados da análise fatorial realizado (Figura 3), na qual as amostras são agrupadas com base na similaridade entre as mesmas (amostras mais semelhantes estão mais próximas entre si no espaço amostral), nos leva à mesma conclusão obtida na análise de componentes principais (PCA). As amostras estão ordenadas em três diferentes grupos, que foram denominados nesse trabalho, de grupo SAF, grupo SAC e grupo SNAF. A técnica de análise discriminante foi utilizada nesse estudo como um teste de significância da análise de agrupamento para verificar a adequação da partição obtida, uma vez fixado o número de grupos e conhecido os seus componentes e também para determinar quais variáveis discriminaram melhor as amostras [7]. Utilizou-se o método “forward stepwise”, onde as variáveis são incluídas no modelo, uma a uma de acordo com a ordem decrescente de discriminação entre os grupos. Utilizaram-se as mesmas variáveis empregadas na análise fatorial, e obteve-se um acerto de 100% dos casos (Figura 4). Os índices obtidos dos espectros de fluorescência não

foram incluídos no modelo por não discriminarem as amostras.

Ao se analisar a estrutura das funções discriminantes geradas (Tabela 4), pode-se observar que a primeira função, que já é capaz de discriminar todos os grupos com acerto de 100%, tem a contribuição de diversas variáveis e índices que podem ser associados à humificação, tais como razão E_4/E_6 ; ITG, IADRIFT, concentração de radicais livres orgânicos entre outras.

Conclusões

As informações obtidas com o uso da análise quimiométrica deram suporte e concordaram com todas as avaliações feitas anteriormente sobre os dados químicos e espectroscópicos, demonstrando grande potencial dessa ferramenta estatística no estudo da química ambiental. Ficou também evidente, nas condições em que foi realizado esse estudo, que a técnica de fluorescência não foi adequada na caracterização dos ácidos húmicos por não discriminar as amostras e nem ter apresentado correlações estreitas com as demais técnicas espectroscópicas utilizadas nesse estudo.

A análise estatística multivariada permitiu reduzir o grupo de variáveis para quatro dimensões, das quais três representam características relevantes dos AH (humificação, hidrofilicidade e acidez), demonstrando que os AH dos solos antropogênicos, com base em medidas e índices que descrevem características moleculares, são diferentes dos AH dos solos não antropogênicos. As principais diferenças entre os grupos dos solos antropogênicos sob floresta (SAF) e sob cultivo (SAC), em relação aos solos não antropogênicos (SNAF) foram no grau de humificação dos AH. Os AH pertencentes aos grupos SAF e SAC demonstraram estar num estágio mais avançado de humificação do que os do grupo SNAF. O maior grau de humificação dos AH dos solos antropogênicos foi devido à maior concentração de estruturas aromáticas e de radicais livres orgânicos. Alguns resultados sugeriram que isso está relacionado à origem pirogênica desses AH. Adicionalmente observou-se que os AH do grupo SAC foram mais hidrofóbicos. Este comportamento provavelmente está relacionado ao cultivo que favoreceria a oxidação de frações mais lábeis da MOS com conseqüente preservação de estruturas mais recalcitrantes como C-alquil e C-aromático.

Referências

- [1] SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P. N.; TABATABAI, M. A.; JOHNSTON, C. T.; SUMNER, M. E. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America: American Society of Agronomy, 1996. p. 1011-1020. (Soil Science Society of America Book Series, 5). Part 3. Chemical methods.
- [2] SCHNITZER, M.; GUPTA, U.C. Determination of acidity in soil organic matter. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 27, p. 274-277, 1965.



XXXI
CONGRESSO
BRASILEIRO
DE CIÊNCIA
DO SOLO

CONQUISTAS
& DESAFIOS
da Ciência do
Solo brasileira



De 05 a 10 de agosto de 2007 Serrano Centro de Convenções - Gramado-RS

- [3] YONEBAYASHI, K.; HATTORI, T. Chemical and biological studies on environmental humic acids. I. Composition of elemental and Functional Groups of Humic Acids. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 34, n. 4, p. 571-584, 1988.
- [4] MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A. E.; TRAGHETA, D. G. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil fractions of a mollisol. *Soil Science*, Baltimore, v. 157, 365-372, 1994.
- [5] Novotny, E. H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo**. 2002. 215 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [6] SMERNIK, L.S.; OADES, J.M. The use of spin counting for determinig quantitation in solid state ^{13}C NMR spectra of natural organic matter. 1. Model systems and the effects of paramagnetic impurities. *Geoderma*, Amsterdam, v. 96, p. 1001-109, 2000.
- [7] CUNHA, T.J.F. 2005. Ácidos húmicos de solos escuros da Amazônia: Terra Preta de Índio. Tese (Doutorado); Universidade Federal do Rio de Janeiro, 140pp.



Tabela 01. Carregamentos dos fatores calculados. Rotação varimax normalizada.

	Fator 1 Humificação	Fator 2 Hidrofilicidade	Fator 3 Acidez (total e fenólica)	Fator 4 Cinzas
E ₄ /E ₆	-0,833746	0,019702	0,180159	0,266139
IH	0,097123	-0,820361	-0,165707	0,200969
C%	0,508305	-0,701527	0,108049	-0,457220
H%	-0,888844	0,131634	-0,243978	0,277845
N%	-0,948406	-0,023347	-0,020246	0,211153
O%	0,323794	0,854823	-0,008427	0,333594
Cinzas	0,015535	0,221967	-0,329413	0,813623
W	0,952815	0,124181	0,003973	-0,175368
C/N	0,894330	-0,096424	0,180317	-0,256905
H/C	-0,871913	0,223229	-0,210772	0,322933
O/C	0,049349	0,895145	-0,075882	0,371243
O/H	0,850512	0,088277	0,397164	-0,123378
A. total	0,427677	0,078527	0,851096	-0,230785
A. carboxi.	0,772552	0,126005	0,095987	-0,496414
A. Fenoli	-0,014688	0,008702	0,968615	0,063600
Spins g ⁻¹	0,569092	-0,243802	0,045129	-0,701369
Largura	-0,242814	0,458229	0,037366	0,801116
A ₄ /A ₁	0,485920	-0,121010	0,002895	-0,718905
I ₄₈₀ /I ₄₀₀	0,490385	0,119498	-0,162028	-0,680121
IADRIFT	0,872755	0,129245	-0,081345	0,335775
ITG	0,768415	-0,294360	0,165593	-0,447737
Expl.Var	8,942807	3,270820	2,216089	4,299443
Prp.Totl	0,425848	0,155753	0,105528	0,204735

*Carregamentos em negrito são $\geq 0,7$.

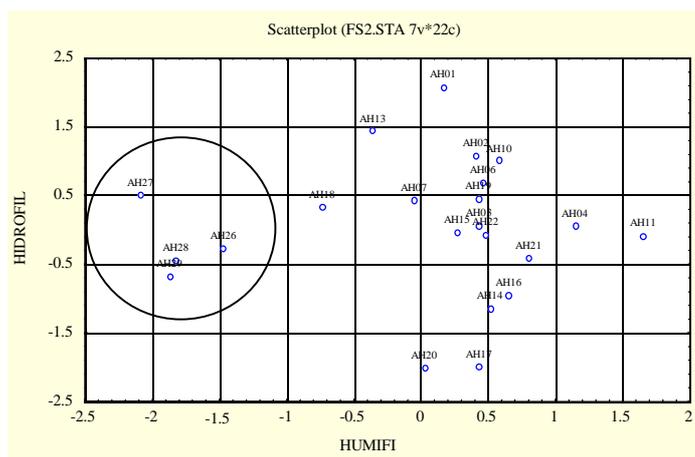


Figura 01. Agrupamento dos ácidos húmicos estudados em função dos fatores humificação e hidrofilicidade

Tabela 02. Coeficientes de correlação entre o teor de cinzas e variáveis obtidas por espectroscopia de RPE e fluorescência.

Variáveis	r	P
Spin	-0,65	0,000876
Largura	0,75	0,000036
A ₄ /A ₁	-0,56	0,005749
I ₄₈₀ /I ₄₀₀	-0,38	0,073656

Tabela 03. Carregamentos dos fatores calculados após a remoção do efeito das cinzas. Rotação varimax normalizada.

	Fator 1 Humificação	Fator 2 Hidrofilicidade	Fator 3 Acidez (total e fenólica)	Fator 4 Fluorescência
E ₄ /E ₆	-0,818483	0,059572	0,176713	0,333697
IH	0,087221	-0,760287	-0,260895	0,223538
C%	0,552710	-0,786677	0,128317	-0,190648
H%	-0,912860	0,149803	-0,246558	0,148398
N%	-0,931101	-0,006749	-0,028564	0,271192
O%	0,268375	0,946544	-0,028664	0,018519
W	0,931146	0,116759	0,012916	-0,260387
C/N	0,876744	-0,129652	0,195861	-0,300269
H/C	-0,899008	0,253845	-0,218804	0,168898
O/C	-0,012361	0,981267	-0,083135	0,037394
O/H	0,843773	0,100525	0,398945	-0,139710



	De 05 a 10 de agosto de 2007	Serrano Centro de Convenções - Gramado-RS		
A. total	0,484307	0,002170	0,835462	-0,044658
A. carbox	0,818666	-0,016038	0,145202	-0,312309
A. fenoli	0,022808	0,014534	0,914949	0,164203
Spin resíduo	0,763389	-0,192855	-0,271323	-0,303571
ΔH resíduo	-0,368384	0,532665	0,460388	0,383767
A ₄ /A ₁ resíduo	0,437786	-0,073724	-0,052308	-0,794504
I ₄₈₀ /I ₄₀₀ res	0,384865	0,097630	-0,132368	-0,861480
IADRIFT	0,837477	0,290971	-0,205425	0,081326
ITG	0,823425	-0,380285	0,179773	-0,190256
Expl.Var	9,254265	3,610336	2,367221	2,283108
Prp.Totl	46%	18%	12%	2%

*Carregamentos em negrito são $\geq 0,7$.

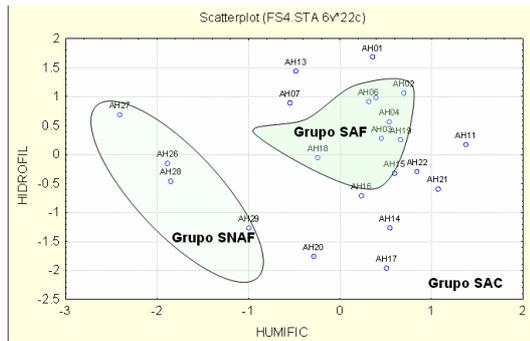


Figura 02. Agrupamento dos ácidos húmicos estudados em função dos fatores humificação e hidrofiliçidade, após a remoção do efeito das cinzas.

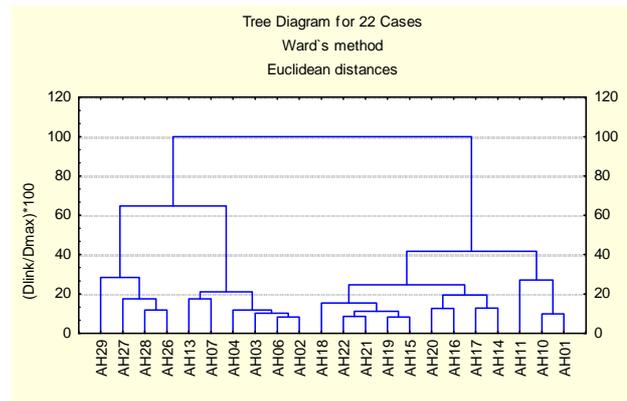


Figura 03. Grupamento hierárquico dos ácidos húmicos estudados.

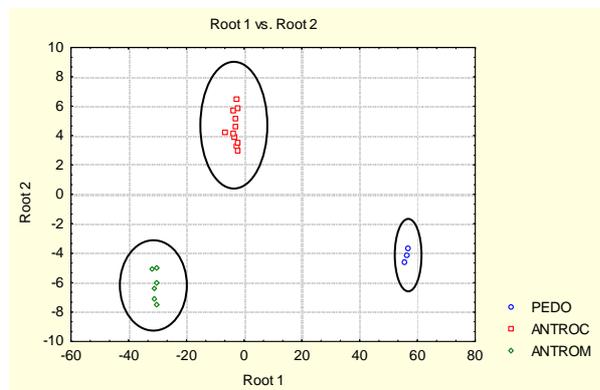


Figura 04. Agrupamento dos ácidos húmicos em função das duas primeiras variáveis discriminantes. Root 1 e 2: variáveis discriminantes 1 e 2, respectivamente.

Tabela 04. Cargas relativas de cada variável utilizada no modelo sobre as variáveis discriminantes 1 e 2.

	Variável discriminante 1 (Root 1)	Variável discriminante 2 (Root 2)
H%	0.039641	-0.250733
CINZAS	-0.009676	-0.214596
A. CARBOX	-0.034951	0.131721
E ₄ /E ₆	0.052267	-0.150013
O%	-0.023359	-0.080997
IH	0.000733	0.038452
O/H	-0.026057	0.140995
LARGURA	0.004925	-0.157604
A. TOTAL	-0.005025	0.123205
H/C	0.036747	-0.259516
O/C	-0.014887	-0.110593
A. FENOL	0.011017	0.077499
Spins g ⁻¹ C	-0.019761	0.190168
ITG	-0.026306	0.195083
W	-0.046668	0.118349
IADRIFT	-0.041419	0.036614
C%	-0.005262	0.173462

