

ELETROQUÍMICA DO HORIZONTE SUPERFICIAL DE
LATOSSOLOS E CARACTERIZAÇÃO DE SUAS SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS

LEONARDO BARROS DOBBSS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO - 2006

ELETROQUÍMICA DO HORIZONTE SUPERFICIAL DE
LATOSSOLOS E CARACTERIZAÇÃO DE SUAS SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS

LEONARDO BARROS DOBBS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO - 2006

ELETROQUÍMICA DO HORIZONTE SUPERFICIAL DE
LATOSSOLOS E CARACTERIZAÇÃO DE SUAS SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS

LEONARDO BARROS DOBBSS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 28 de setembro de 2006.

Comissão Examinadora:

Prof. Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni (D.Sc., Solos e nutrição de plantas) -
ESALQ

Prof. Víctor Marcos Rumjanek (Ph.D., Química Orgânica) – UFRRJ

Prof. Leonardo O. Medici (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UFRRJ

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) - UENF
Orientador

A meu pai, Walmir, e à Luíza Helena.
Aos meus irmãos, Leandro e Laís.
Aos meus avós, Edicléia, Jadilson,
Icléia, e demais membros da família.
Ao Sr. Nelson, Dona Dulce e familiares
À minha amada Luciane.
Dedico.

À minha mãe,
Eliane Barros Dobbss.
“*In memoriam*”

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Laboratório de Solos da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Ao CNPq 481303-2004-9, pelo auxílio financeiro e à FAPERJ/UENF, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Luciano Pasqualoto Canellas, pela sua paciência e compreensão como orientador e experiência transmitida.

Ao Professor Ary Carlos Xavier Velloso, pelo ensinamento e experiência transmitidos ao longo destes anos.

Ao Professor Arnaldo Rocha Façanha, pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Aos professores Leonardo Oliveira Médici e Lázaro Estáquio Pereira Perez, pela amizade e contribuição.

Ao Professor e Chefe do Laboratório de Solos, Cláudio Marciano.

À Minha namorada, Luciane da Costa Barbé, pelo amor, incentivo, paciência e apoio concedidos.

Aos amigos Daniel Basílio Zandonadi, Flávio Couto Cordeiro, Gláucio Pereira Moura, Jader Galba Busato, Maribus Altoé Baldotto, Roberto Batista Marques Júnior, Simone Quinelato Bezerra e Tatiane da Costa Barbé pelo apoio, amizade e encorajamento durante esta jornada.

Aos amigos da Rural, em especial aos do alojamento 521, que, apesar da distância, vivem no meu coração.

Aos amigos de república: Alberto, Bruno, Érico, Fábio, Maurício, Thiago, Saulo e Vitor, pelo convívio e apoio.

Aos amigos da Rural, reencontrados na UENF, Adolfo, Amanda, Anderson, Carolina, Clarissa, Felipe, Marina, Monique, Pedro, Vanessa e Viviane, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos colegas do laboratório de solos da Universidade Estadual do Norte Fluminense, que sempre fizeram do Laboratório um ambiente agradável para o trabalho.

A todos que, de alguma forma, participaram, direta ou indiretamente, deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Distribuição da matéria orgânica humificada nos Latossolos brasileiros.....	4
2.2. Reatividade da matéria orgânica do solo (MOS).....	7
2.3. Desenvolvimento de cargas nos colóides inorgânicos dos solos.....	8
2.4. Efeitos da matéria orgânica do solo sobre o PCZ.....	11
2.5 Capacidade da dupla camada elétrica.....	12
2.6. Capacidade de oxidação das substâncias húmicas.....	13
2.7. Capacidade de troca de cátions (CTC).....	14
2.8. Bioatividade da matéria orgânica humificada.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Experimento 1: Eletroquímica de horizontes superficiais de Latossolos antes e após a extração das SH.....	18
3.1.1. Coleta das amostras do horizonte superficial dos solos estudados.....	18
3.1.2. Mineralogia da fração argila.....	20
3.1.3. Composição granulométrica dos Latossolos.....	20

3.1.4. Área Superficial do solo.....	20
3.1.5. Determinação das propriedades eletroquímicas.....	21
3.1.6. Fracionamento da matéria orgânica.....	21
3.1.7. Análise estatística.....	21
3.2. Experimento 2: Caracterização das SH solúveis e do extrato hexânico-metanólico	24
3.2.1. Extração das SH das amostras de solo.....	24
3.2.2. Determinação da acidez de ácidos húmicos e fúlvicos por titulação potenciométrica.....	24
3.2.3. Caracterização das SH solúveis.....	25
3.2.4. Caracterização do extrato hexânico-metanólico.....	27
3.3. Experimento 3: Promoção do crescimento radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> por SH solúveis e pelo Ext _{hmet} isolados de diferentes Latossolos brasileiros.....	27
3.3.1. Ensaio de concentração das SH solúveis (AH e AF) e do Ext _{hmet}	27
3.3.2. Crescimento das plântulas (<i>Arabidopsis thaliana</i>).....	28
3.3.3. Delineamento experimental e análise estatística.....	28
3.4. Experimento 4: Desenvolvimento radicular de tomateiro <i>diageotropica</i> por ácidos húmicos.....	29
3.4.1. Crescimento das plântulas (Tomateiro <i>Diageotropica</i>).....	29
3.4.2. Delineamento experimental e análise estatística.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Experimento 1: Eletroquímica de horizontes superficiais de Latossolos antes e após a extração das SH.....	31
4.2. Experimento 2: Caracterização das SH solúveis e do extrato hexânico-metanólico	42
4.2.1. Caracterização das substâncias húmicas solúveis.....	42
4.2.2. Caracterização do extrato hexânico-metanólico (Ext _{hmet}).....	55
4.3. Experimento 3: Promoção do crescimento radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> por SH solúveis e pelo Ext _{hmet} isolados de diferentes Latossolos brasileiros.....	57
4.4. Experimento 4: Desenvolvimento radicular de tomateiro <i>diageotropica</i> por ácidos húmicos.....	65
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	70

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICE.....	85

RESUMO

DOBBSS, LEONARDO B. M.S. - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, setembro de 2006. ELETROQUÍMICA DO HORIZONTE SUPERFICIAL DE LATOSSOLOS E CARACTERIZAÇÃO DE SUAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas; Co-orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

Nos últimos trinta e cinco anos, a química do solo escreveu um capítulo importante na ciência brasileira, registrando o conhecimento sedimentado sobre o comportamento químico da fração mineral dos solos tropicais intemperizados. O estudo do comportamento complexo, e da reatividade da fração orgânica dos solos foi relativamente abandonado, devido ao amplo espectro a ser coberto no conhecimento do comportamento da fração mineral e às dificuldades metodológicas. Este trabalho revisita os primeiros trabalhos em eletroquímica de Latossolos, abordando, agora, os efeitos e as características da fração humificada da matéria orgânica. Dessa forma, sete diferentes tipos de Latossolos previamente estudados tiveram sua matéria orgânica humificada isolada e suas principais características eletroquímicas foram avaliadas antes e depois da extração das substâncias húmicas (SH) alcalino-solúveis. Após o procedimento de extração, as substâncias húmicas solúveis, bem como os extratos hexânico-metanólico (Ext_{hmet}), foram quantificados e caracterizados quimicamente através de métodos químicos e espectroscópicos tais como: determinação da acidez total,

carboxílica e fenólica, capacidade de oxidação, comportamento espectral na luz ultravioleta-visível e infravermelha e ressonância magnética nuclear. A extração dos ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) deslocou os valores do ponto de carga zero (PCZ) para valores mais elevados, diminuiu a CTC do solo e reverteu o sinal do potencial de carga. No entanto, o maior efeito da retirada das substâncias húmicas solúveis diz respeito à perda da capacidade tampão das cargas do solo. A capacidade da dupla camada elétrica é uma medida indireta desse poder tampão e sofreu variações entre 210 e 1669% depois da extração das substâncias húmicas alcalino-solúveis. De um modo geral, a natureza química das SH do horizonte superficial dos Latossolos estudados pode ser explicada de acordo com a teoria do arranjo supramolecular, segundo a qual os AH são constituídos por agregados de matéria orgânica com maior hidrofobicidade, maior massa molecular, menor acidez, maior capacidade de oxidação e com maior diversidade de sítios químicos para reação, o que os torna mais estáveis termodinamicamente que os AF. Na presente pesquisa, plantas foram utilizadas como instrumento biológico essencial para avaliar as características químicas e eletroquímicas das substâncias húmicas, usando-as como indicadoras da atividade de tais substâncias. Foi observado que os AH, AF, bem como o Ext_{hmet}, isolados, são capazes de alterar o padrão de enraizamento de *Arabidopsis thaliana*, proporcionando desenvolvimento de maior número de raízes laterais bem como de raízes laterais mais desenvolvidas em relação às plantas-controle. Também se pode observar que os AH não foram capazes de induzir o enraizamento no mutante *dgt* da cultivar miniatura de tomate. O estudo da eletroquímica da fração mineral foi fundamental para o avanço e o entendimento das principais práticas agronômicas relativas à adubação e correção dos solos que, junto com o desenvolvimento de novos cultivares, agroquímicos e implementos, levaram à “modernização” do campo. O desafio lançado agora para o século XXI é o de produzir garantindo a integridade dos recursos naturais para as gerações futuras. O estudo do comportamento da fração orgânica é parte fundamental dessa empreitada, para a qual esta dissertação tentará dar sua colaboração.

ABSTRACT

DOBBSS, LEONARDO B. MS. - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, september de 2006. ELETROCHEMISTRY OF THE OXISOLS SUPERFICIAL HORIZONS AND ITS HUMIC SUBSTANCES CHARACTERIZATION. Supervisor: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas; Co-supervisor: Arnaldo Rocha Façanha.

In the last thirty five years, there has been significant knowledge gain edregarding the chemical behavior of the mineral fraction of high weathering degree tropical soil. The knowledge of the complex reactivity of the soil organic fraction has received little attention due to the broad range that needs to be covered on mineral fraction behavior and also the difficulty in methodology techniques. In this work we provide an overview of the electrochemical features characteristic of Oxisols. Our approach currently is to analyze the characteristics and effects of the humified fraction of organic matter (soluble-alkaline humic substances) on Oxisols. The organic matter of seven different Oxisols previously studied were isolated and the electrochemical characteristics were evaluated before and after isolation of the organic matter. Following the isolation, the soluble HS and the hexanic-methanolic extracts (H_{metext}) were quantified and characterized trough chemical and spectroscopic methods such as: phenolic, carboxyl and total acidity measurement, oxidation capacity, spectral behavior on ultraviolet-visible and infrared light, and nuclear magnetic resonance. The

extraction of the HS fractions such as humic acids (HA) and fulvic acids (FA) enhanced the PZC value, reduced the soil CEC and reverted the charge potential sign. However, the soil charge buffer capability was the most influenced characteristic by the HS extraction. The double electric layer capacity, which is an indirect measurement of the soil charge buffer, had varied from 210 and 1669% after the HS extraction. As a general rule, the chemical nature of the humic substances (HS) from the Oxisols superficial horizons can be explained by the supramolecular association theory which states that HA clusters with lower acidity, higher degree of hydrophobicity, molecular weight, oxidation capacity, while HA becomes more thermodynamically stable than FA due to the chemical sites diversity. In the present research, plants were used as an important biological tool to evaluate the effects of HS with different chemical and electrochemical features. It has showed that HA, FA, as well as H_{metext} isolated from all Oxisols is able to modify the *Arabidopsis thaliana* typical rooting, resulting in both a higher number and improvement of lateral roots in contrast to the control plants. She can also observe that AH was not capable to induce the rooting in the mutant *dgt* of miniature cultivar of tomato. The electrochemical study of the soil mineral fraction is essential to the understanding and the development of key agriculture practices such as soil amendment and fertilization. Current practices combine new cultivars, agrochemicals and agriculture machinery to modernize field agrosience without the inclusion of electrochemical analyzes. The current challenge is to maintain the integrity crop production with the assurance that natural resources will be conserved for future generations. The study of the behavior of the soil organic matter fraction is one area of this challenge which this thesis will attempt to give insight.

1. INTRODUÇÃO

Os Latossolos são os solos predominantes no Brasil e, a despeito de suas restrições na capacidade produtiva devido à baixa fertilidade natural, eles apresentam características de ordem física excelentes, de modo que são, geralmente, aceitos como solos de grande potencial agrônomo quando manejados adequadamente (Barreto, 1986). São encontrados, principalmente, em regiões tropicais de clima quente e úmido. De acordo com Resende *et al.* (1997), a latossolização consiste, basicamente, na remoção de sílica e de bases do perfil após transformação (intemperismo) dos minerais constituintes. Praticamente, não há translocação de material para o horizonte B. Os solos formados por este processo são aqueles com horizonte B latossólico. São os mais desenvolvidos (velhos) da crosta terrestre, ocupando, portanto, as partes há muito tempo expostas da paisagem. Em geral, ocupam as superfícies mais elevadas (planalto) em relação à paisagem circundante. Portanto, são solos profundos, com pouca diferenciação entre horizontes e bastante intemperizados. Apresentam argilas de baixa atividade, pouca retenção de bases e virtual ausência de minerais primários facilmente intemperizáveis. Como a sílica e outros elementos são fortemente lixiviados, há um enriquecimento relativo em óxidos de Fe e hidróxido de Al.

Pelo fato dos Latossolos serem solos altamente intemperizados, com predominância de minerais de carga variável, eles constituem um grupo de solos distinto com propriedades eletroquímicas semelhantes e cuja capacidade de troca de cátions depende, principalmente, da matéria orgânica do solo. As propriedades

eletroquímicas da fração mineral dos principais Latossolos brasileiros já foram estudadas (Van Raij 1972; Barreto, 1986). No entanto, as propriedades eletroquímicas da matéria orgânica humificada e a quantificação de seus efeitos na eletroquímica de Latossolos têm recebido bem menos atenção (Peixoto, 1997).

A reatividade da matéria orgânica do solo e, particularmente, das substâncias húmicas (SH) está relacionada às suas propriedades eletroquímicas. A acidez depende do conteúdo de grupos funcionais oxigenados. De modo geral, a reação da matéria orgânica com íons em solução depende das características das moléculas orgânicas (e.g., carga molecular, par de elétrons isolados, pKa, ponto isoelétrico, polaridade e massa molecular). No entanto, a avaliação dessas propriedades nas SH não é tarefa simples.

Fungos, bactérias e a diversidade de plantas e animais que evoluíram com o passar do tempo são a fonte de matéria orgânica natural acumulada na superfície do solo. A maior parte da matéria orgânica do solo é estabilizada na forma de SH e, a despeito do grande número de trabalhos e do esforço científico realizado, a estrutura e a função das substâncias húmicas ainda não são muito bem compreendidas.

Piccolo (1997) aplicou o conceito da química das supramoléculas para as SH e, por meio de uma série de evidências cromatográficas (Piccolo *et al*, 1996; 1999; Conte & Piccolo, 1999; Piccolo *et al.*, 2002; 2003) e espectroscópicas (Simpson, 2002), postulou uma nova visão para a estrutura das SH, na qual moléculas orgânicas diversas, mas relativamente pequenas, formam agregados unidos entre si por ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas fracas, formando um arranjo supramolecular com massa molecular aparentemente elevada, mas que pode ser constante e indefinidamente alterada de acordo com as variações nas condições do meio de reação.

Piccolo (2002) redefiniu ácidos fúlvicos (AF) como sendo a associação de pequenas moléculas hidrofílicas com uma quantidade de grupamentos funcionais ácidos suficientemente grandes para manter os agrupamentos de AF dispersos em qualquer valor de pH. Os ácidos húmicos (AH), por sua vez, são compostos por associações onde predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteróides) que são estabilizados em pH neutro por forças hidrofóbicas dispersivas. De acordo com a conceituação de Piccolo, a conformação dos AH cresce progressivamente de tamanho quando as forças

oriundas das ligações hidrogênio são progressivamente aumentadas até um valor baixo de pH, onde os ácidos húmicos floculam. As huminas (H) continuam a denominar a fração alcalino insolúvel dos compostos orgânicos do solo.

As subunidades estruturais que compõem o arranjo supramolecular podem ser liberadas em função de alterações na solução do solo, tais como pH, força iônica e status redox (Piccolo, 2002), fornecendo íons disponíveis para (I) adsorção na superfície mineral e conseqüente abaixamento do ponto de carga protônica líquida zero e aumento da capacidade de troca de cátions, (II) complexação com íons da solução do solo e (III) absorção pelas plantas. Além disso, as SH podem afetar diretamente o metabolismo e crescimento das plantas (Vaughan & Malcolm, 1985).

A contribuição efetiva das cargas elétricas dos grupamentos funcionais orgânicos para a superfície de reação dos solos intemperizados permanece, ainda, como um desafio colocado para a Ciência do Solo (Sparks, 2001). Apesar da importância da contribuição da matéria orgânica humificada, existem poucos artigos relacionando as propriedades eletroquímicas das SH e a reatividade do solo (Fontes *et al.*, 2001; Mendonça & Rowell, 1996; Benites & Mendonça, 1998; Peixoto, 1997). Como a fração humina é pouco reativa por estar associada à fração mineral, postula-se que, apesar do baixo teor da fração alcalino-solúvel (ácidos húmicos e fúlvicos) presente na matéria orgânica dos Latossolos, são estas substâncias que condicionam a sua reatividade.

No presente trabalho, é avaliada a contribuição das SH sobre propriedades eletroquímicas do horizonte superficial de sete Latossolos diferentes. Também se caracterizou a estrutura química de AH e AF e do extrato hexânico-metanólico (Ext_{hmet}) obtidos do horizonte superficial destes solos por meio de métodos químicos e espectroscópicos, além de se realizar um estudo preliminar sobre o efeito das SH supracitadas e do Ext_{hmet} sobre a promoção do enraizamento em plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Distribuição da matéria orgânica humificada nos Latossolos brasileiros

Os Latossolos são os solos mais representativos da cobertura pedológica no Brasil, abrangendo cerca de 60% do território brasileiro, correspondendo, segundo a EMBRAPA-CNPS (1999), a uma área de 331.637.250 ha.

Apesar da matéria orgânica humificada se apresentar no solo como um *continuum* indissociável de compostos de carbono que vão desde os encontrados em células vivas até biomacromoléculas pouco ou muito transformadas, é possível separar distintas frações com base em aspectos químicos, tais como solubilidade, densidade e massa molar.

As diferentes frações de carbono humificado extraído do solo apresentam características químicas, físicas e morfológicas diferenciadas, e a distribuição destas frações no solo podem indicar a qualidade da matéria orgânica. O uso da distribuição relativa das frações da matéria orgânica, como indicador da mudança de manejo do solo ou da qualidade do ambiente, encontra respaldo nos trabalhos de Kononova (1982), Schnitzer & Khan (1978) e Schnitzer (1991).

A formação das substâncias húmicas é caracterizada por um processo complexo baseado na síntese e/ou ressíntese dos produtos da mineralização dos compostos orgânicos que chegam ao solo. É possível, teoricamente, simplificar os vários caminhos da humificação em dois mecanismos: a preservação seletiva de biopolímeros e a condensação de unidades menores (Camargo *et al.*, 1999).

Essas transformações incluem um conjunto de reações de oxidação, desidratação, hidrólise, descarboxilação e condensação, influenciadas pelas condições do solo, tais como: tipo de argila, pH e teor de bases (Zech *et al.*, 1997). Assumindo qualquer das várias possibilidades para o processo de estabilização dos compostos orgânicos no solo, os ácidos húmicos representam a fração intermediária entre a estabilização dos compostos pela interação com a matéria mineral e a ocorrência de ácidos orgânicos oxidados livres na solução do solo (ácidos fúlvicos livres ou associados). Os ácidos húmicos são, portanto, um marcador natural do processo de humificação e refletem, como tal, tanto a condição de gênese, como de manejo do solo. Solos de ambientes temperados, naturalmente férteis, apresentam teores relativos maiores de ácidos húmicos e valores da relação CAH/CAF maiores que 1,0 (Kononova, 1982). Já a fração orgânica dos solos tropicais úmidos é dominada pelas huminas e, tanto a intensa mineralização dos resíduos, como restrições edáficas à atividade biológica, tornam os valores da relação CAH/CAF menores do que 1,0 (Dabin, 1981; Ortega, 1982; Canellas *et al.*, 2000). De acordo com Kononova (1982), a faixa dos valores da relação CAH/CAF para solos temperados varia de 1,5 a 2,5. Para solos tropicais, os valores médios são mais baixos (Ortega, 1982). De uma forma geral, o baixo conteúdo de bases trocáveis nos solos mais intemperizados diminui a intensidade dos processos de humificação (condensação e síntese). Volkoff e Cerri (1988) postularam que os principais fatores que controlam a formação do húmus (tanto húmus como matéria orgânica serão utilizados daqui para frente como sinônimos da fração de compostos orgânicos do solo formados pelas substâncias húmicas e não húmicas) são a temperatura, presença ou ausência de bases e drenagem, ou seja, os fatores que mais influenciam a atividade biológica. Indicam, ainda, que a presença de bases tenha um efeito mais importante do que os outros fatores.

Os Latossolos são caracterizados pelo estágio avançado de intemperismo e, conseqüentemente, pelo baixo conteúdo de bases trocáveis. A maioria dos trabalhos reporta um conteúdo baixo de substâncias húmicas alcalino-solúveis e predomínio da fração humina nos Latossolos. (Volkoff e Cerri, 1988; Santa-Isabel, 1988). A fração humina é considerada uma fração humificada pouco reativa, quase inerte, já que está intimamente associada à fração mineral do solo (Borges & Kiehl, 1996; Yagi *et al.*, 2003).

A composição média do húmus do horizonte superficial dos Latossolos do Brasil pode ser observada na Figura 1. Verifica-se o predomínio da fração ácidos fúlvicos livres em relação à fração ácidos húmicos e uma dominância da fração humina.

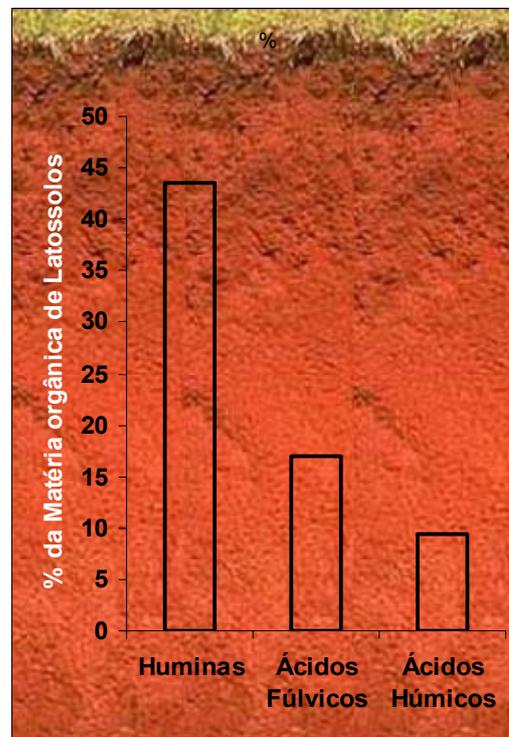


Figura 1. Distribuição das frações húmicas em % relativa do carbono total de Latossolos do Brasil (adaptado de Canellas & Santos, 2005, p.64, cap.3).

Os Latossolos são caracterizados pela presença de minerais com baixa carga de superfície, tais como argilosilicatos do tipo 1:1, como a caulinita e os “óxidos” de ferro e de alumínio (Fontes *et al.*, 2001) (o termo “óxidos” foi usado para designar tanto os óxidos propriamente ditos como os hidróxidos e oxihidróxidos). A baixa capacidade de troca de cátions nessas superfícies bem como o processo de remoção de bases que caracteriza a latossolização condicionam a distribuição das frações humificadas, promovendo o predomínio de formas insolúveis e pouco reativas (huminas) e favorecendo o acúmulo de frações alcalino-solúveis constituídas, principalmente, por compostos orgânicos pouco condensados (ácidos fúlvicos) (Santa-Isabel, 1988). Por outro lado, as características eletroquímicas das frações humificadas, apesar de pouco estudadas, condicionam a reatividade desses solos bem intemperizados.

2.2. Reatividade da matéria orgânica do solo (MOS)

A reatividade da MOS e, particularmente, das SH está relacionada às suas propriedades eletroquímicas, basicamente ao grau de acidez de seus grupos funcionais. São normalmente usadas para ácido as definições de Lowry e Brønsted e de Lewis. Os primeiros definiram um ácido como uma substância que libera próton (H^+) e base como aquela que aceita H^+ . Um composto pode funcionar como um ácido (ou base) somente na presença de uma base conjugada (ou ácido). Lewis definiu um ácido como uma substância que pode receber um par de elétrons para formar uma ligação covalente, e uma base como aquela que pode fornecer um elétron para formar uma ligação covalente. Portanto, para se comportar como ácido, uma molécula deve estar deficiente em elétrons e isso ocorre nos grupos funcionais das substâncias húmicas, tais como, R-COOH, OH, S-H.

A reatividade das substâncias húmicas é causada, principalmente, pelo seu elevado conteúdo de grupos funcionais contendo oxigênio, tais como: álcool R-OH, aldeído R-CHO, carboxila R-COOH, enol (R-CH=CH-OH), cetona (R-CO-R'), éster (R-COOR'). (Canellas *et al.*, 1999). A dissociação do H^+ de cada grupo funcional é dependente do pH do meio. De um modo geral, os Latossolos apresentam pH ácido numa faixa que permite a dissociação somente dos ácidos orgânicos mais fortes como, por exemplo, COOH. O grupo OH de ácidos carboxílicos se dissocia mais facilmente do que dos álcoois aromáticos ou alifáticos, e os compostos fenólicos são ácidos ainda mais fracos. A maioria dos grupos funcionais ácidos se dissocia entre valores de pH de 4 a 7. A dissociação dos grupos carboxílicos e fenólicos produz 85 a 90% da carga negativa das substâncias húmicas e corresponde a uma acidez entre 300 e 1400 $cmol\ kg^{-1}$ (Rocha & Rosa, 2003). Grupos protonados, tais como R-OH₂ e R-NH₃, podem gerar cargas positivas, mas a carga líquida no húmus geralmente permanece negativa (Wershaw, 1993). No entanto, nem toda carga negativa gerada na superfície orgânica está disponível para reações. Há uma intrincada relação entre a matéria orgânica reativa e a fração mineral. (Dabin, 1981; Volkoff *et al.*, 1984). As propriedades eletroquímicas do solo são produtos desta intrincada relação, e a avaliação destas propriedades isoladamente pode resultar em equívocos e mais, pode, ainda, não expressar o produto real da interação organo-mineral. Essas

limitações, no entanto, não devem representar um empecilho para o estudo dessas misturas complexas. Se de um lado as limitações para estudar sistemas complexos parecem desafiar o problema “das substâncias húmicas”, por outro, o baixo grau de compreensão acumulado sobre esses sistemas orgânicos em ambientes tropicais altamente intemperizados permite que se façam algumas concessões e se estude, através do isolamento da matéria orgânica humificada, as principais características eletroquímicas dos solos antes e depois da extração das substâncias húmicas. É importante, também, que se isolem algumas propriedades de tais substâncias, e se façam correlações através de métodos estatísticos, para avaliar a contribuição das substâncias húmicas sobre propriedades eletroquímicas dos Latossolos.

2.3. Desenvolvimento de cargas nos colóides inorgânicos dos solos

As superfícies dos colóides dos solos são carregadas eletricamente, o que significa que essas superfícies têm excesso ou déficit de elétrons (Uehara & Gillman, 1980) e, em conjunto com os íons presentes na solução do solo, constituem uma dupla camada de cargas (Olphen, 1977). Se a dupla camada de cargas for resultado de imperfeições internas e substituições isomórficas estruturais nos minerais, a densidade de carga é constante, ao passo que o potencial elétrico de superfície é variável (Stern, 1924). Se a dupla camada for criada pela adsorção de íons determinantes de potencial, a densidade de cargas é variável enquanto o potencial elétrico de superfície é constante e determinado somente pela concentração ou atividade desses íons em solução (Fontes *et al.*, 2001).

O estudo das cargas elétricas das dispersões coloidais (orgânicas e inorgânicas) é necessário para o entendimento de diversos fenômenos físico-químicos que ocorrem nos solos. A maioria das reações eletroquímicas que influenciam a fertilidade (Kononova, 1984), a nutrição de plantas e que podem interferir em fenômenos relacionados ao seu manejo e conservação ocorre na superfície dessas partículas (Siqueira, 1985; Sposito, 1989b; Fontes *et al.*, 2001). As propriedades eletroquímicas variam de acordo com os processos pedogenéticos a que o solo foi submetido, bem como o seu estágio de intemperização. Essas observações conceituais sugerem que a química da

superfície de um solo será determinada, em grande parte, pela natureza e reatividade dos grupos funcionais da sua superfície. As reações de superfície, entretanto, são também condicionadas ao intemperismo pedoquímico. As reações de dissolução e precipitação de minerais, a síntese e oxidação/redução da matéria orgânica alteram, necessariamente, as categorias e reatividades dos grupamentos funcionais das superfícies (Velloso, 2002).

As cargas elétricas nas superfícies dos colóides de carga variável são geradas pela adsorção e dessorção de íons determinantes de potencial (Schofield, 1949), principalmente H^+ e OH^- , e daí diz-se colóides com carga dependente do pH (Zhang *et al.*, 1991). Na solução do solo, os íons localizados na superfície de minerais, como caulinita, hematita, goethita e gibbsita, completam sua camada de coordenação com íons hidroxila, de modo que toda a superfície se torna hidroxilada (Stumm, 1992). Estes solos possuem interface reversível, isto é, apresentam colóides de carga variável (Dewan & Rich, 1970). A magnitude de carga líquida resultante depende da atividade destes íons em solução (Gouy, 1910) e a carga líquida é determinada pelo íon que é adsorvido em excesso. Com a diminuição do pH, aumenta o número de sítios com carga positiva e com o aumento do pH são criados sítios com carga negativa. Num determinado pH, há possibilidade de ocorrência concomitante de sítios com carga positiva, negativa e neutra. Quando ocorre uma adsorção igual de íons H^+ e OH^- , o colóide terá uma carga protônica líquida igual a zero, o pH da solução em que ocorre esta condição é definido, genericamente, como Ponto de Carga Protônica Líquida Zero designado PCZ daqui para frente (Parks & Bruyn, 1962; Parks, 1965; Breeuwsma & Lyklema, 1973; Raij & Peech, 1972; Raij, 1973 a, b; Uehara & Gillman, 1980; Siqueira, 1985; Siqueira 1990 a, b, c; Sposito, 1981, 1989 a, b; 1998; Fontes *et al.*, 2001).

As medidas eletroquímicas, para definição dos componentes de carga superficial e dos diferentes pontos de carga zero (Raij e Peech, 1972), são necessárias para o entendimento do comportamento de cargas de superfície, validação de modelos moleculares (Charlet & Sposito, 1987), exame de consistência interna dos resultados de especiação e contribuição na interpretação de algumas características e propriedades do solo (Hendershot & Lavkulich, 1978), como, por exemplo, em características físicas de agregação (Peixoto, 1997) e na avaliação do desenvolvimento pedogenético (Fontes, 1996; Silva *et*

al., 1996). Além disso, o PCZ serve como ponto de referência para avaliar o sinal de carga líquida da superfície em relação ao pH atual do solo. Se positiva, o pH do solo é menor que o PCZ, se negativa, o pH é maior que o PCZ (Chaves & Trajano, 1992). Também é possível determinar o potencial da dupla camada elétrica pela equação simplificada de Nernst (Uehara & Gillman, 1980):

$$\Psi_o = 0,059 (\text{PCZ} - \text{pH})$$

sendo Ψ_o dado em V.

É possível determinar a densidade de carga variável por meio da fórmula limitada da equação de Gouy-Chapman (Uehara & Gillman, 1980):

$$\sigma_v = 1,67 \cdot 10^{-6} \cdot n^{0,5} (\text{PCZ} - \text{pH})$$

sendo σ_v dado em $\text{mol}_c \text{ cm}^{-2}$ e n é a concentração eletrolítica em número de íons por cm^3 .

Dentre as estimativas do PCZ, o Ponto de Efeito Salino Nulo (PESN) representa um valor de pH em que a concentração salina da solução, numa suspensão de solo, não tem efeito na carga de superfície das partículas do solo (Sposito, 1989a, b) ou estritamente um valor de pH no qual a carga líquida do próton (diferença entre moles de H^+ e OH^- adsorvidos) é invariável com a concentração do sal.

A comparação entre o pH do solo e o PCZ permite definir se a carga superficial líquida das partículas é positiva ($\text{pH} < \text{PCZ}$), negativa ($\text{pH} > \text{PCZ}$), ou nula ($\text{pH} = \text{PCZ}$). O pH dos solos bastante intemperizados tende a deslocar-se em direção ao PCZ (Uehara, 1978), caracterizando esta medida como essencial ao entendimento dos processos eletroquímicos em solos tropicais (Aleoni & Camargo, 1994; Siqueira *et al.*, 1990b; Pérez *et al.*, 1993).

A contribuição efetiva das cargas elétricas dos grupamentos funcionais orgânicos para a superfície de reação dos solos intemperizados permanece, ainda, como um desafio colocado para a Ciência do Solo (Sparks, 2001).

Apesar da importância da contribuição da matéria orgânica humificada, existem poucos artigos relacionando as propriedades eletroquímicas das

substâncias húmicas e a reatividade do solo (Fontes *et al.*, 2001; Mendonça & Rowell, 1994; Benites & Mendonça, 1998; Peixoto, 1997). No entanto, já é bem conhecido que a adsorção de ânions à superfície abaixa os valores de PCZ no solo (van Raij & Peech, 1972; Hendershot & Lavkulich, 1978; Siqueira, 1985).

2.4. Efeitos da matéria orgânica do solo sobre o PCZ

Siqueira *et al.* (1990) quantificaram o efeito da MOS sobre o PCZ de cinco perfis de Latossolos brasileiros. Foi observada uma queda sensível no PCZ de diferentes Latossolos com o incremento de matéria orgânica. Os solos de natureza oxídica tiveram queda linear do PCZ com o aumento de C, enquanto que, em solos de natureza caulínica, o comportamento da queda do PCZ foi quadrático. A queda nos valores de PCZ foi atribuída à adsorção de ânions orgânicos na matriz mineral tal como justificam anteriormente as observações de Van Raij & Peech (1972) e Uehara (1981). Kaiser & Zech *et al.* (1999) propuseram o mecanismo de troca de ligantes como o principal mecanismo envolvido na adsorção de compostos orgânicos à superfície de óxidos de Fe e Al. Barreto (1986) verificou uma diminuição significativa no PCZ nos horizontes superficiais de Latossolos em relação aos horizontes subsuperficiais. Alleoni e Camargo (1994) também observaram uma diminuição nos valores de PCZ com o aumento no conteúdo de MOS nos horizontes A de solos gibbsíticos.

Vale ressaltar que, apesar do PCZ ser afetado pelo conteúdo de MOS (Siqueira *et al.*, 1990 a, b; Peixoto, 1997), poucos estudos sistemáticos envolvendo o efeito de seus compartimentos na dinâmica de cargas do solo, principalmente o das substâncias húmicas e seus respectivos grupamentos funcionais, foram realizados. Benites & Mendonça (1998) adicionaram quantidades crescentes de ácidos húmicos num Latossolo com mineralogia predominantemente gibbsítica e observaram a queda linear no PCZ do solo. O valor do PCZ passou de 5,65 para 5,10 com a adição de uma dose equivalente a 60 Mg de AH ha⁻¹.

Para o abaixamento de valores do PCZ, é necessária uma adição de quantidades relativamente grandes de M.O. ao solo, implicando em limitações de ordem prática para o manejo de solos em ambiente tropical.

Um aspecto muito estudado é a influência da M.O. no tamponamento das cargas e, portanto, na variação do pH do solo. Uma medida simplificada de capacidade de tamponamento de cargas pode ser obtida com a capacidade da dupla camada elétrica.

2.5. Capacidade da dupla camada elétrica

Os valores de PCZ são muito próximos para solos da mesma classe e grau de intemperização e, de acordo com Barreto (1986), é encontrada alguma dificuldade para o uso desse parâmetro para discriminar o comportamento de superfície. Assim, Barreto (1986), com o objetivo de separar solos de carga variável da mesma classe de acordo com o seu grau de intemperismo, aplicou o conceito de capacidade da dupla camada elétrica (CDCE) para solos de carga variável.

Assumindo-se a validade da equação de Nerst para o potencial de superfícies com carga variável (σ) e usando-se as curvas de carga superficial vs pH em diferentes forças iônicas ($\sigma \times \text{pH}$), a capacidade da dupla camada elétrica (CDCE) pode ser definida como:

$$CDCE = \frac{d\sigma}{d\psi}$$

Assumindo-se que a relação entre o potencial da dupla camada elétrica e a atividade dos íons determinantes de potencial (H^+ , OH^-) é válida em solução de sistemas com carga variável, i.e. $\psi_0 = 0.059 (\text{pH}_0 - \text{pH})$ a 25°C , a CDCE pode ser expressa como:

$$CDCE = \frac{d\sigma}{d\text{pH}}$$

A equação acima é análoga à equação que define o poder tampão de um sistema $\beta_{C_j}^{C_i} = \frac{dC_i}{d\text{pH}}$ (Stumm, 1992).

sendo: $\beta_{C_j}^{C_i}$ a capacidade tampão de um sistema (medida da tendência ao equilíbrio onde C_j resiste à variação de pH pela adição/remoção de H^+ do sistema). Assim, o poder tampão (β) e a capacidade da dupla camada elétrica do solo de carga variável estão altamente relacionados.

O conceito da CDCE foi desenvolvido e usado com sucesso para sistemas simples como mercúrio (Grahame, 1947), iodeto de prata (Lykema & Overbeel, 1961) e óxidos metálicos (Parks & De Bruyn, 1962; Bérubé & De Bruyn, 1968a; Blok & De Bruyn, 1970a). Barreto (1986) aplicou para química de solos de

carga variável e conseguiu alto grau de discriminação entre distintos Latossolos. A CDCE foi mais afetada pelo conteúdo de matéria orgânica do solo do que o PCZ (Barreto, 1986). No entanto, o estudo para quantificação dos efeitos da matéria orgânica sobre a CDCE foi adiado.

Um dos mecanismos menos estudado na química dos colóides orgânicos é a capacidade de transferência de elétrons. A tendência em uma espécie química doar elétrons é medida pelo respectivo potencial de oxidação e a quantidade de elétrons transferidos por unidade de massa de uma determinada substância ($\text{mol}_c \text{ kg}^{-1}$) é denominada capacidade de oxidação (Cox) (Baldotto *et al.*, 2005).

2.6. Capacidade de oxidação das substâncias húmicas

Nos solos fortemente intemperizados as SH contribuem para geração de cargas elétricas por meio do abaixamento do PCZ (Struyk & Sposito, 2001) e aumento da CTC do solo (Canellas *et al.*, 1999). Além disso, as SH apresentam atividade redox (Helburn & MacCarthy, 1994) e participam de importantes reações que ocorrem nos solos, influenciando a fertilidade com liberação de nutrientes ($\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$) e pela detoxificação de elementos químicos (pesticidas) (Szilágyi, 1973, 1974; Lakatos *et al.*, 1977; Skogerboe & Wilson, 1981; Bailey *et al.*, 1983; Bartlett, 1993; Matthiessen, 1994; Struyk & Sposito, 2001).

Os AH participam em reações redox nos solos, com elementos como Fe^{+3} (Szilágyi, 1971; Lovley *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1998), Mn^{+4} (Sunda & Kieber, 1994), V^{+5} (Wilson & Weber, 1979; Lu *et al.*, 1998) e Hg^{+2} (Alberts *et al.*, 1974; Skogerboe & Wilson, 1981; Matthiessen, 1996). No entanto, são relativamente escassos os trabalhos com medições diretas das propriedades redox de SH (Struyk & Sposito, 2001).

Como numa reação redox, os elétrons são completamente transferidos de uma espécie para outra. Sillén & Martell (1964) indicaram a conveniência de considerar a atividade de elétrons (e^-) como qualquer outro reagente (mol_c) em reações químicas. O entendimento destas reações no solo é fundamental para o estudo de suas propriedades físico-químicas (Sposito, 1989; Velloso *et al.*, 1993). O potencial eletroquímico do solo (E_H) e a concentração de elétrons (pe) gerada pelas espécies químicas com atividade redox controlam a formação e precipitação

de minerais (diagramas de solubilidade), o estado de oxidação e de solubilidade de íons (Mercê *et al.*, 1998), a atividade microbiológica e enzimática, entre outras funções (Canellas *et al.*, 2002).

O processo de humificação pode ser entendido *a grosso modo* como a transformação de resíduos orgânicos em estruturas mais estabilizadas que, sob o ponto de vista químico, representam aumento de estruturas conjugadas (Zech *et al.*, 1997). O aumento de unidades aromáticas com influência de elétrons como os radicais livres do tipo semiquinona (RLS) foi definido como um indicador do grau de humificação da MO (Martin Neto *et al.*, 1994). A medida destes orbitais é obtida por meio de EPR. Baldotto (2006) conseguiu uma estreita e significativa correlação entre a concentração de RLS e a capacidade de oxidação das SH medida por iodimetria, apresentando um procedimento acessível para estimativa do grau de humificação e da sua capacidade de transferência de elétrons.

2.7. Capacidade de troca de cátions (CTC)

A CTC pode ser definida como o número de moles de cátions adsorvidos que podem ser dessorvidos de um solo (ou constituinte do solo, ou outro material) em certas condições de temperatura, pressão, composição da solução, valor de pH, e relação de massa solo:solução, sendo expressa em milimoles de carga por quilograma de adsorvente ($\text{mmol}_c \text{ kg}^{-1}$) (Sposito, 1989a).

A contribuição da matéria orgânica sobre a capacidade de troca de cátions (CTC) foi estimada como sendo entre 25 e 90% da CTC do solo (Oades *et al.*, 1989, Thompson *et al.*, 1989; Leinweber *et al.*, 1993; Oorts *et al.*, 2003). Os Latossolos apresentam uma CTC efetiva baixa e decrescente com a profundidade dependendo, basicamente, do seu conteúdo de matéria orgânica (Mendonça & Rowell, 1996).

2.8. Bioatividade da matéria orgânica humificada

Peixoto (1997) observou a necessidade de que qualquer procedimento utilizado para estudar e entender a MOS deve ser biologicamente significativo e refletir a natureza dinâmica dos processos envolvendo os constituintes do solo. A quantificação de cada fração da MOS torna-se fundamental para entender os

processos dinâmicos que refletem ou induzem as propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos, tendo em vista a interação de seus componentes. As plantas podem ser consideradas como o instrumento biológico essencial para avaliar as características químicas e eletroquímicas das SH. As SH, além de influenciarem a eletroquímica do solo, podem afetar diretamente o metabolismo das plantas.

O efeito das SH sobre o metabolismo das plantas foi resumido por Nannipieri *et al.* (1993) como resultado (i) da influência positiva sobre o transporte de íons facilitando a absorção; (ii) do aumento da respiração e da velocidade das reações enzimáticas do ciclo de Krebs, resultando em maior produção de ATP; (iii) do aumento no conteúdo de clorofila; (iv) do aumento na velocidade e síntese de ácidos nucleicos; (v) do efeito seletivo sobre a síntese protéica e (vi) do aumento ou inibição da atividade de diversas enzimas. Todavia, os alvos moleculares primariamente envolvidos nessas respostas não foram ainda elucidados.

As SH são tradicionalmente consideradas como uma macromolécula que apresenta acidez, carga líquida negativa e elevada massa molecular, sendo extraída dos solos e sedimentos por soluções alcalinas (Stevenson, 1994; Tan, 2003). O efeito fisiológico direto das frações humificadas de massa relativamente elevada, com centenas de milhares de Da, tais como os ácidos húmicos (AH), é incompatível com seu tamanho e, conseqüentemente, com sua entrada na célula através das membranas biológicas. A promoção no crescimento vegetal tem sido justificada, então, pelo aumento da solubilidade de micronutrientes com a formação de complexos solúveis (Pinton *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003; Garcia-Mina *et al.*, 2004) ou, ainda, pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (MP), já que as SH têm um conhecido efeito surfactante e são, portanto, capazes de dissolver a camada lipídica das membranas biológicas (Visser, 1982). A formação de complexos de maior solubilidade com metais, especialmente com o ferro, foi extensamente documentada, mas não justifica, por exemplo, os aumentos observados no enraizamento de plantas em ensaios de curta duração (algumas horas) em meios de cultivo axênicos e sem solução nutritiva (Vaughan & Malcolm, 1985). O aumento da permeabilidade das membranas biológicas por meio da dissipação de potencial, provocado pela abertura de furos nas camadas lipídicas, sem dúvida, aumentam a sua permeabilidade, porém com perdas na seletividade da barreira. Essa condição é

essencial para a homeostase celular, pois, apesar de facilitar a entrada dos íons na célula, a saída é igualmente facilitada.

Não é recente a idéia de que as SH podem atuar no metabolismo vegetal da mesma forma como os hormônios atuam, ou seja, mediante processos de sinalização molecular. Bottomley (1917) verificou intensa promoção de crescimento com pequenas concentrações de SH. Sistemáticamente vem sendo encontrada atividade hormonal em SH de baixa massa molecular (AF) (Pinton *et al.*, 1995, Pizziguello *et al.*, 2001; Nardi *et al.*, 2000), substâncias húmicas solúveis em água (Quagiotti *et al.*, 2004) e substâncias húmicas extraídas com ácidos orgânicos (Nardi *et al.*, 2005). Todos esses extratos representam frações da matéria orgânica que, de acordo com a concepção tradicional de estrutura macromolecular, podem acessar a célula sem impedimentos devido ao tamanho/massa molecular. No entanto, os efeitos fisiológicos diretos de AH foram reportados há bastante tempo, incluindo evidências da absorção de AH pelas células utilizando-se radioisótopos (Flaig, 1968; Kononova, 1982).

A primeira barreira biológica na interface solução do solo - célula vegetal é a membrana plasmática (MP), sendo essa, portanto, alvo primário da ação de moléculas-sinais porventura presentes na solução do solo. As H⁺-ATPases têm papel central no balanço energético celular e na promoção do enraizamento, uma vez que fornecem energia (com a hidrólise de ATP → ADP + Pi + 3 a 5 mol de H⁺) para os transportadores de íons localizados na MP e gera o gradiente eletroquímico responsável pela polarização da MP. A geração do gradiente favorece termodinamicamente a absorção de íons e energiza o transporte transmembranar (Sondergaard *et al.*, 2004). Além disso, o abaixamento do pH proporcionado pelo acúmulo de H⁺ no lado externo à célula providencia condições fisiológicas ótimas para o funcionamento de enzimas do tipo hidrolases e fenol-oxidases, enzimas com habilidade de romper ligações da parede celular. Além dessas enzimas, as proteínas expansinas operam em pH < 4,5 e tornam a parede celular mais flexível com o rompimento das ligações hidrogênio (Cosgrove, 1998). Desse modo, o bombeamento de H⁺ para o meio externo, pela ação das ATPases, proporciona pH ótimo para ação de expansinas as quais relaxam a parede celular. O relaxamento da parede celular e conseqüente diminuição do potencial de parede (ψ_p) e potencial hídrico (ψ_H) dentro da célula favorecem a entrada de água e, portanto, o turgor celular (o acúmulo de íons no citoplasma

deve ser compensado pelo aumento do volume da célula para atender o balanço de massa e carga) (Cosgrove, 2000). Esse mecanismo complexo e intrincado de promoção do crescimento celular mediado pelas H^+ -ATPases é conhecido como “teoria do crescimento ácido” (Rayle & Cleland, 1992). As auxinas assumem papel central nesse mecanismo, uma vez que promovem tanto a transcrição de genes codificando ATPases, quanto a ativação dessas proteínas (Rayle & Cleland, 1992).

Façanha *et al.* (2002) e Canellas *et al.* (2002) demonstraram que AH de massa aparentemente elevada (pelo menos maior que 14 kDa) isolados de vermicomposto apresentaram estímulos sobre a atividade de hidrólise e transporte de H^+ das H^+ -ATPases de MP isoladas de raízes de plantas mono e dicotiledôneas. Esses autores observaram aumento na síntese de H^+ -ATPase induzido por AH e postularam um mecanismo pós-transcricional via ativação de genes Mha1 e Mha2, da mesma forma como as auxinas disparam a síntese das H^+ -ATPases de MP em hipocótilos de milho (Frias *et al.*, 1996). Essa observação foi confirmada, mais tarde, por Quaggiotti e colaboradores (2004). Zandonadi (2006), utilizando plantas mutantes de tomateiro (mutante *diageotropica*), que possuem um gene formado pouco sensível à auxina, obteve evidências inequívocas de que os AH possuem uma atividade tipo auxínica.

O principal modelo vegetal para o estudo de processos fisiológicos é a *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*). Além de possuir um genoma reduzido, com cinco cromossomos, seus estudos são facilitados pelo ciclo curto e tamanho reduzido (Somerville & Meurerowitz, 2002). Pretende-se, com este trabalho, sugerir que uma pequena fração solúvel da MO, devido às suas características químicas, afeta marcadamente o comportamento químico de solos altamente intemperizados e que é capaz de estimular o enraizamento em plantas. Acredita-se que a MO solúvel tem um papel fundamental para adaptação das plantas nestes tipos de solos, seja modificando o comportamento das cargas, seja interferindo diretamente no mecanismo bioquímico-fisiológico das plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para testar a hipótese deste trabalho e atingir os objetivos propostos, foram conduzidos quatro experimentos descritos a seguir:

3.1. Experimento 1: Eletroquímica de horizontes superficiais de Latossolos antes e após a extração das SH

3.1.1. Coleta das amostras do horizonte superficial dos solos estudados

Sete perfis modais, cada um representado por um tipo distinto de Latossolo, foram reconhecidos pela primeira vez pelo prof. Marcelo Nunes Camargo e sua equipe e descritos posteriormente pelo Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Embrapa-CNPS 1980 & Embrapa-CNPS, 1999). Tendo em mente a grande variabilidade e intensidade dos fatores da formação do solo que podem refletir nas diferenças e nas características mineralógicas dos diferentes Latossolos, foram realizadas amostragens dos horizontes superficiais ao longo de 2004, em diferentes regiões do Brasil. Todas as amostras foram obtidas de corte de estrada e na profundidade de 0-20 cm. Os solos selecionados foram:

Perfil 1 (LAe): LATOSSOLO AMARELO eutrófico típico (Xanthic Hapludox; Alumini-Xanthic Ferrasol). Relevo: plano; Vegetação: Floresta tropical perenifólia;

Textura: muito argilosa. Coordenadas geográficas: Latitude 21°45' S e longitude 41°19' W Gr.

Perfil 2 (LBdf): LATOSSOLO BRUNO distroférico rúbrico (Haploperox; Alumi-Haplic Ferrasol); Relevo: plano; Vegetação: Campo úmido; Textura: muito argilosa. Coordenadas geográficas: Latitude 28°30' S e longitude 50°56' W Gr.

Perfil 3 (LVj): LATOSSOLO VERMELHO perférico húmico (Rhodic Humic Hapludox; Dystry-Rhodic); Relevo: suave-ondulado; Vegetação: Cerrado altimontano; Textura: argilosa. Coordenadas geográficas: Latitude: 20°04' S e longitude: 43°58' W Gr.

Perfil 4 (LVAd): LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico húmico (Sombrihumox; Humic Ferrasol); Relevo: Forte ondulado; Vegetação: Floresta tropical perenifólia; Textura: argilosa. Coordenadas geográficas: Latitude: 22°16' S e longitude: 42°31' W Gr.

Perfil 5 (LVwf): LATOSSOLO VERMELHO Acriférico típico, (Rhodustalf; Rhodic Ferrasol); Relevo: Suave ondulado; Vegetação: Floresta subperenifólia; Textura: muito argilosa. Coordenadas geográficas: Latitude: 28°17' S e longitude: 54°15' W Gr.

Perfil 6 (LVAdf): LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distroférico típico (Hapludox; Dystry-Haplic Ferrasol); Relevo: Forte ondulado; Vegetação: Floresta subperenifólia; Textura: argilosa. Coordenadas geográficas: Latitude: 22°31' S e longitude: 43°43' W Gr.

Perfil 7 (LVd): LATOSSOLO VERMELHO distrófico típico (Rhodic Hapludox; Dystry-Rhodic Ferrasol); Relevo: plano; Vegetação: Cerrado subcaducifólio; Textura: muito argilosa. Coordenadas geográficas: Latitude: 15°47' S e longitude: 47°55' W Gr.

Com exceção dos perfis 1 e 5, todos os outros foram previamente estudados por Barreto (1986). Os principais atributos químicos dos solos são mostrados no Quadro 11 em anexo.

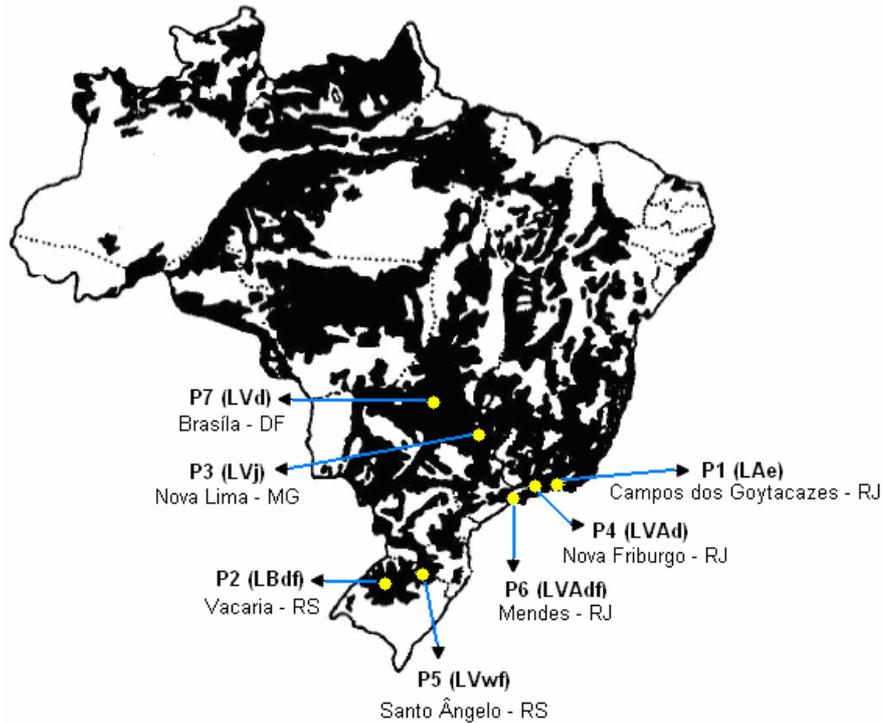


Figura 2: Representação esquemática da área de Latossolos no Brasil de acordo com IBGE (2006) e os locais de coleta dos sete perfis de Latossolos estudados.

3.1.2. Mineralogia da fração argila

A composição mineralógica foi obtida a partir da análise dos termogramas e difratogramas de raios-x da fração argila realizada em outros estudos. Os dados dos perfis 2, 3, 4, 6 e 7 foram obtidos de Barreto (1986), do perfil 1 de Anjos (1985) e perfil 5 de Rodrigues & Klant (1978). Assumiu-se que a composição mineralógica do horizonte A é a mesma do B.

3.1.3. Composição granulométrica dos Latossolos

A determinação da composição granulométrica foi obtida pelo método da pipeta conforme EMBRAPA CNPS (1997).

3.1.4. Área superficial do solo

A superfície específica foi obtida em amostras de solo, antes e depois da remoção das SH, pulverizadas em partículas menores que 35 mm. A equação de BET (Greg & Sing, 1982) foi usada para avaliar a adsorção do N₂ usando-se equipamento automatizado Micrometrics (Londonberry, USA).

3.1.5. Determinação das propriedades eletroquímicas

O pH foi determinado em água e em KCl 1 mol L⁻¹, com relação solo:solução igual a 1:2,5 (v/v); O ponto de carga líquida protônica zero (PCLPZ) aqui considerado como ponto de carga zero (PCZ) foi obtido por meio de curvas de titulação potenciométrica (Uehara & Gillman, 1981) desenvolvidas em soluções de cloreto de sódio com diferentes concentrações (Figura 3). A CTC foi obtida pelo método do acetato de cálcio e amônio 0,5 mol L⁻¹ a pH 7,0. A capacidade da dupla camada elétrica (CDCE) considerada como o poder tampão de cargas do solo (Barreto, 1986), foi calculada de acordo com Pérez *et al.* (1993) a partir da curva de titulação potenciométrica de concentração de NaCl 0,02 mol L⁻¹, aproveitando-se o gráfico utilizado para determinar o PCZ pelo método dos catetos (Barreto, 1986).

3.1.6. Fracionamento da matéria orgânica

Foi realizado o fracionamento da matéria orgânica pelo método recomendado pela IHSS com pré-tratamento da amostra com HCl 0,1 mol L⁻¹ e uso de NaOH 0,1 mol L⁻¹ como solvente. A dosagem de carbono nas frações foi realizada em três réplicas de laboratório por amostra, utilizando-se dicromato de potássio como oxidante e sulfato ferroso amoniacal para determinar o equivalente em carbono em cada fração (Yeomans & Bremner, 1988).

3.1.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de correlações não paramétricas em virtude dos dados das propriedades eletroquímicas não apresentarem distribuição normal. Os coeficientes de Spearman e Kendall foram utilizados para avaliar as relações entre a CDCE e as variáveis eletroquímicas do solo: CTC, K_i, potencial de superfície (Ψ_0), carga líquida (δ_0), pH_{H₂O}, pH_{KCl}, Δ pH (pH_{KCl} - pH_{H₂O}) e o conteúdo total de C nas frações humificadas dos sete Latossolos estudados. Em seguida, realizou-se o mesmo procedimento para observar as correlações entre a CDCE, depois da extração da matéria orgânica alcalino solúvel.

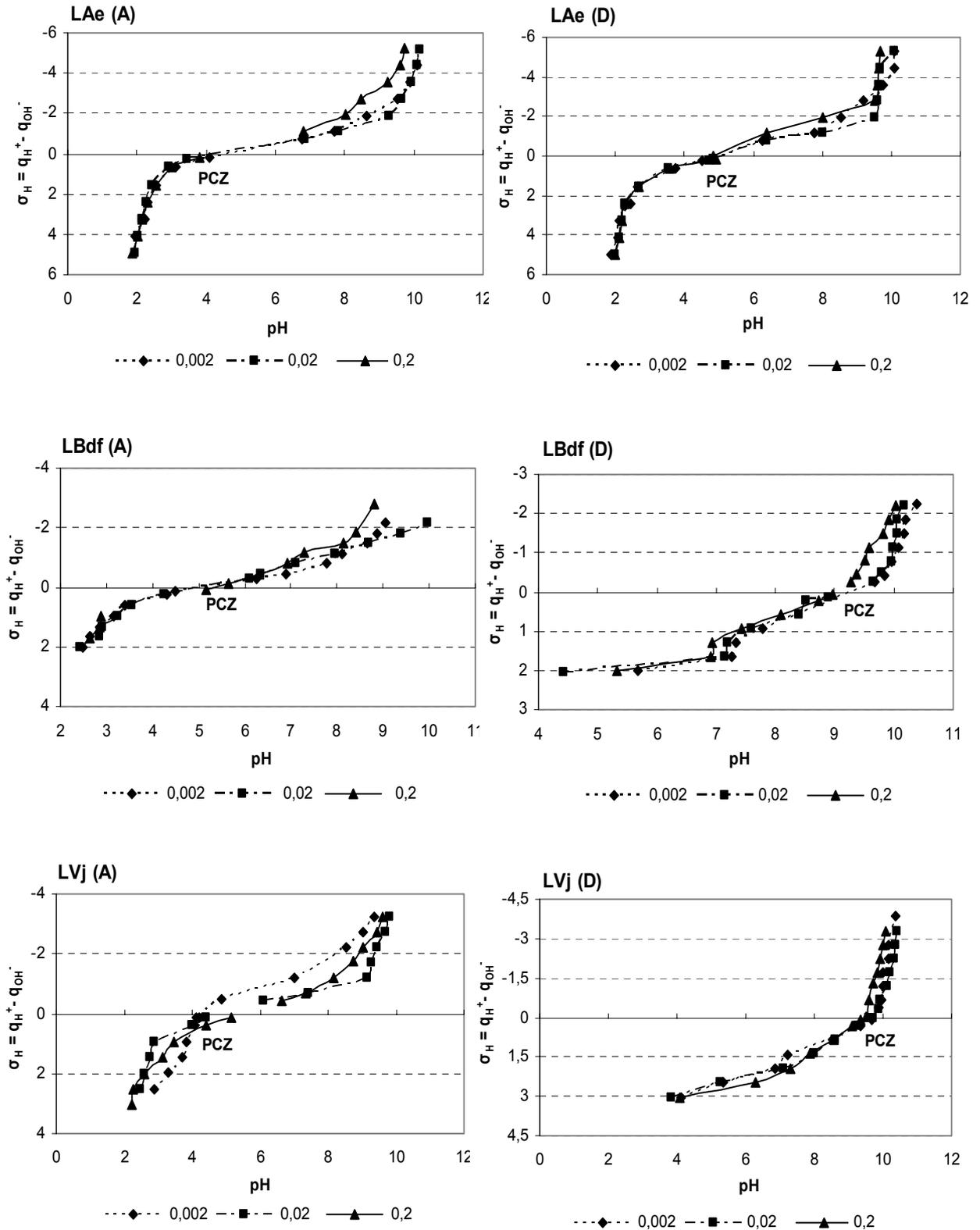


Figura 3. Curvas de titulação potenciométrica das amostras do horizonte superficial dos Latossolos estudados antes (A) e depois (D) da extração das substâncias húmicas de acordo com a metodologia da IHSS. As curvas foram obtidas utilizando-se NaCl nas concentrações de 0,002; 0,02 e 0,2 mol L⁻¹.

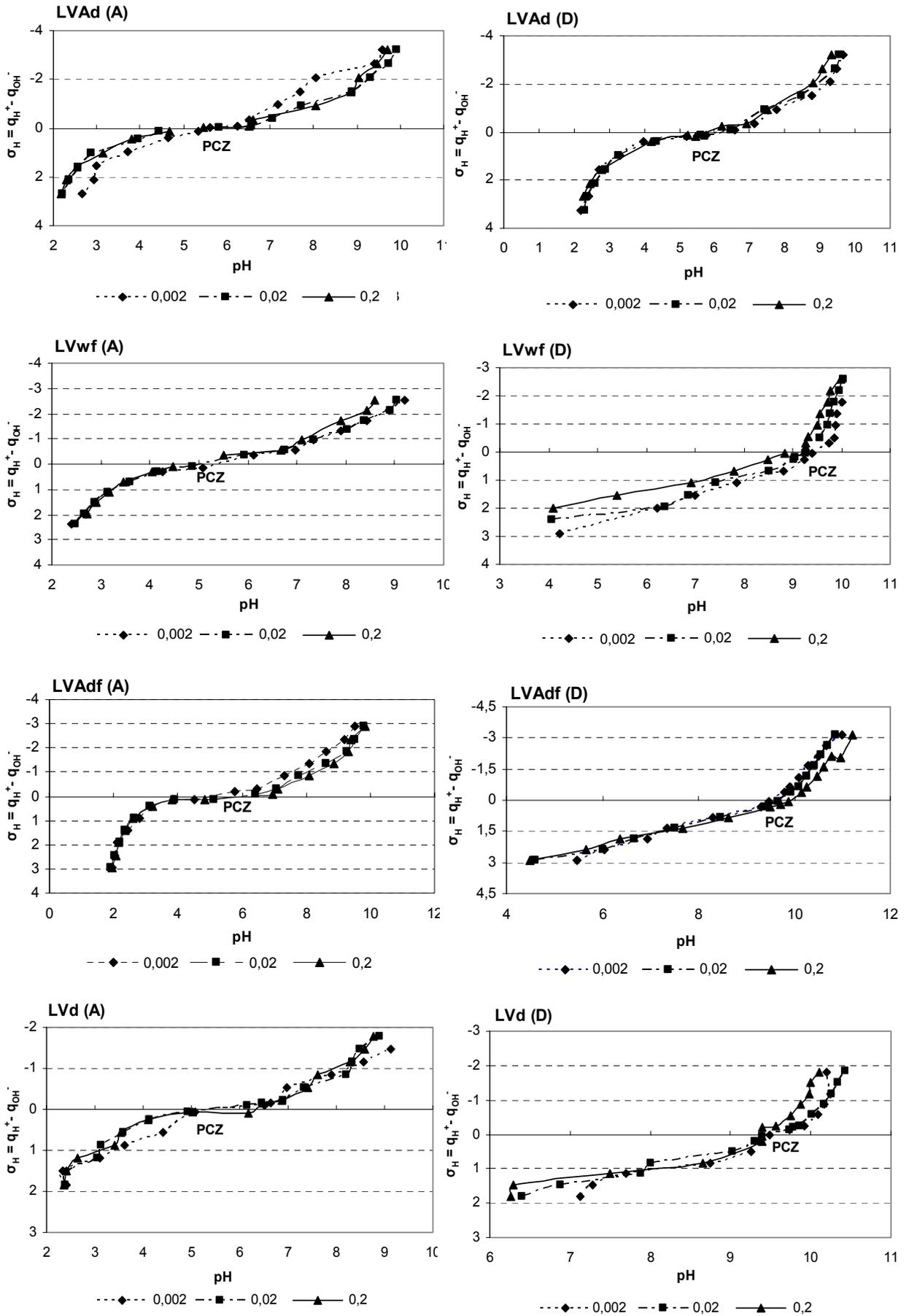


Figura 3. Continuação

3.2. Experimento 2: Caracterização das SH solúveis e do extrato hexânico-metanólico

3.2.1. Extração das SH das amostras de solo

A extração das substâncias húmicas alcalino-solúveis provenientes dos Latossolos estudados foi realizada com NaOH 0,1 mol L⁻¹, na razão solvente: solo de 1:10 (v:v) em atmosfera inerte de N₂. A extração foi repetida até a obtenção de um extrato com absorvância igual a zero em 250 e 465 nm. Foram necessários, em média, 5 extrações da matéria orgânica. 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 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, sendo o volume da solução completado para 1 L com água deionizada), agitando-se a amostra durante oito horas. Os AH foram lavados com água deionizada até teste negativo com AgNO₃. Em seguida, os AH foram dializados contra água em membranas com poros 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 contendo 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. O resíduo de solo após extração alcalina (humina) foi lavado e colocado num aparelho Soxhlet, utilizando-se uma mistura de metanol e hexano (1:1 v/v). O solvente foi sucessivamente trocado até a obtenção de um extrato incolor, sendo, em seguida, eliminado à baixa temperatura com uso de um evaporador rotativo, e o extrato seco denominado Ext_{hmet} (extrato hexânico-metanólico).

3.2.2. Determinação da acidez de ácidos húmicos e fúlvicos por titulação potenciométrica

As soluções aquosas experimentais foram preparadas com água ultrapura fervidas e tituladas com NaOH isenta de CO₂ à temperatura ambiente. A

atmosfera inerte foi mantida com N_2 numa pressão levemente acima da atmosférica. Amostras de 50 mg L^{-1} de ácidos húmicos e fúlvicos foram tituladas com $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 11. A força iônica foi mantida constante com $\text{NaCl } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados foram tratados com o programa Origin para obtenção das curvas de derivação.

3.2.3. Caracterização das SH solúveis

A composição elementar foi realizada em analisador elementar automático Perkin Elmer 2400 com amostras de 4 mg de AH e AF em duplicata. O conteúdo de oxigênio foi determinado por diferença, descontado os teores de cinzas e de umidade obtidos com a análise termogravimétrica. As curvas de termodecomposição das amostras de AH e AF foram obtidas num analisador termogravimétrico TGA-50 Shimadzu, utilizando-se amostras de $5,3 \pm 0,1 \text{ mg}$, em ambiente estático ao ar. A massa inicial foi estabilizada a 30°C e utilizou-se a rampa de aquecimento de 5°C min^{-1} até 105°C com um tempo de espera de 10 min, seguido de aquecimento a 5°C min^{-1} até 650°C , ou até 600°C quando detectado o final da queima pela estabilização da massa do resíduo. A curva de termodecomposição foi obtida por interface com microcomputador utilizando-se o programa TA-50 WSI, a uma razão de um ponto a cada 10 s, num total de 800 pontos por curva. A perda de peso até 105°C , incluído o tempo de espera, foi considerada como umidade da amostra. O resíduo ao final da queima foi considerado como igual ao teor de cinzas.

A acidez total também foi determinada pelo método do Ba(OH)_2 com titulação do excesso com HCl , a acidez carboxílica pelo tratamento com Ca(OAc)_2 e determinação do Ac liberado com NaOH e a fenólica por diferença, i.e. 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 Argônio (Ar), numa suspensão aquosa à temperatura ambiente (25°C , controlada por fluxo contínuo em banho MQBTC 99-20[®]), por meio da oxidação com I_2 . O frasco de titulação acomodou um eletrodo redox de platina (Quimis QA338) cujo funcionamento foi verificado com solução Ferroso-Férrica, que, a 25°C , apresenta $E_H = 439 \text{ mV}$ (Light, 1972), um tubo de entrada de gás e um septo para adicionar a solução de I_2 através de microbureta e um agitador magnético. Cada titulação

redox foi realizada com meio contendo 125 mL de tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH da solução foi monitorado durante a titulação. Após a solução ter sido purgada com Ar e agitada magneticamente por 60 minutos, adicionou-se AH e AF na concentração de 50 mg L^{-1} e a suspensão foi novamente borbulhada com Ar e agitada por 30 minutos. Depois de desaerada a suspensão de AH e AF, procedeu-se uma seqüência de adição de $2 \mu\text{L}$ de solução de I_2 , com concentração estabelecida antes de cada titulação pela padronização com tiosulfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Após cada adição de titulante, para facilitar a mistura, a solução foi agitada magneticamente. O ponto de equivalência da curva foi ajustada 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 aplicada à fórmula $[\text{mol}_c \text{ kg}^{-1} = (2 \text{ mol}_c / \text{mol}_c \text{ l}) \times (\text{molalidade solução } \text{I}_2 \times \text{densidade solução } \text{I}_2) / \text{massa AH ou AF}]$ fornece 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.

A espectroscopia na região do infravermelho das SH solúveis foi realizada na faixa de 400 cm^{-1} a 4000 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 do absortividade molar em 280 nm (ϵ_{280}) de acordo com o procedimento de Ching *et al.* (1994). Pela equação $MM = 3,99 \epsilon_{280} + 450$, foram obtidos correlações elevadas com o uso dessa equação 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 com aparelho Varian com probe de 5 mm . As amostras foram dissolvidas em $0,7 \text{ ml}$ de $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o espectro foi obtido com a saturação do sinal de água. A

varredura do espectro foi de 4800 Hz e obtidos 64 scans por espectro com tempo de aquisição de 3,6 s e delay de 0,5 s.

3.2.4. Caracterização do extrato hexânico-metanólico (Ext_{hmet})

A composição elementar foi realizada em analisador elementar automático Perkin Elmer 2400 em amostras de 4 mg do Ext_{hmet} em duplicata e a espectroscopia na região do infravermelho do Ext_{hmet} realizada na faixa de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas com 1 mg do extrato em 100 mg de KBr, num aparelho Perkin Elmer 1420.

3.3. Experimento 3: Promoção do crescimento radicular de *Arabidopsis thaliana* por SH solúveis e pelo Ext_{hmet} isolados de diferentes Latossolos brasileiros

3.3.1. Ensaio de concentração das SH solúveis (AH e AF) e do Ext_{hmet}

Para o estudo com *Arabidopsis thaliana*, foi obtida uma curva de resposta a densidade de raízes laterais, utilizando-se as concentrações de 0, 3, 30 e 300 mg de SH solúveis e do Ext_{hmet} por litro. Em função do número elevado de raízes laterais muito finas na dose de ótima concentração, optou-se por utilizar concentração correspondente a 50-80% do valor obtido no ponto de inflexão máxima pela primeira derivação da curva. Esses valores corresponderam a 40 e 100 mg L⁻¹ para AH e AF, respectivamente. Para o extrato hexânico-metanólico (regressão quadrática não significativa) optou-se por utilizar 100 mg L⁻¹ em função do baixo rendimento de extração. Paralelamente, foi conduzido um ensaio com tratamento das plântulas de *Arabidopsis* usando-se o mesmo sistema de cultivo, porém adicionando ácido indol acético (AIA, Sigma Aldrich Co.) na concentração de 10⁻⁶ mol L⁻¹, concentração esta rotineiramente utilizada para ensaios com *Arabidopsis* (Parry & Esttele, 2006).

Após o procedimento da análise de regressão, foram estabelecidos procedimentos para os ensaios com finalidade de comparação entre os tipos de AH, AF e Ext_{hmet}.

3.3.2 Crescimento das plântulas (*Arabidopsis thaliana*)

Sementes de *Arabidopsis thaliana* ecótipo columbia 4 (co4), foram esterilizadas com imersão em etanol 95% (v/v) por 5 min seguida de imersão em NaClO 20% por mais 7 min. Após cinco lavagens com água destilada, foi realizada a semeadura em placas de plástico posicionadas verticalmente suportando uma camada de papel de filtro e outra de tecido sintético de malha fina (poliprint). A estrutura de cultivo permaneceu aberta tanto na parte superior como na inferior e coberta com plástico preto para evitar a passagem de luz às raízes. Após a semeadura, as placas foram colocadas por 24 h a 8°C no escuro e, em seguida, transferidas para sala de cultivo com as seguintes condições: 25°C, 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos e 14 h de fotoperíodo. O sistema de cultivo consistiu em inserir as placas contendo as plântulas pré-germinadas num reservatório com água nos primeiros cinco dias. Após 5 dias de germinação, foi realizado o desbaste das plântulas nas placas deixando-se quatro plantas por placa e a aplicação da solução completa de Hoogland modificada para concentração final de N igual a 1 mmol L^{-1} (Forde & Zhang, 1998). Foram adicionados 4 mL da solução de SH solúveis e do Ext_{hmet} por placa nas concentrações utilizadas nos ensaios. No tratamento controle, foram aplicados somente 4 mL de água deionizada. Após a aplicação dos tratamentos, as placas foram inseridas no reservatório mantido com água por 48 horas e, em seguida, foi adicionada a solução nutritiva. Duas semanas após aplicação dos tratamentos, as placas foram coradas com azul de toluidina (0,05%) e escaneadas (resolução de 1200 d.p.i) para análise radicular por meio do processamento eletrônico das imagens. Foram consideradas, na análise, duas plantas por placa correspondente às plantas da posição central de cada placa. A avaliação na mudança da arquitetura radicular foi realizada por meio da análise do número de raízes laterais, comprimento das raízes laterais, comprimento da raiz principal e densidade de raízes laterais.

3.3.3. Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso com quatro placas e duas plantas por placa (4 x 2 = 8 plantas por tratamento). Foi

realizada a análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste DMS $P < 0,05$ pelo programa SAEG (Sistema de análises estatísticas e genéticas) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para comparação do efeito entre AH, AF e o Ex_{hmet} , as médias obtidas com a concentração ótima das diferentes substâncias húmicas solúveis e dos Ext_{hmet} , foram normalizadas em relação às plantas-controle (0 %) e estabelecidas as comparações com o tratamento com adição de AIA 10^{-6} mol L⁻¹.

3.4. Experimento 4: Desenvolvimento radicular de tomateiro *diageotropica* por ácidos húmicos

O mutante *dgt* de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) é, praticamente, insensível à auxina. É uma planta anã, com crescimento diageotropico de caules e raízes, sendo essas não ramificadas (Kelly & Bradford, 1986). Essa mutação foi introgridida na cultivar Micro-Tom, passando, assim, a ter porte e ciclo de vida reduzidos, além das características inerentes à mutação (Pino-Nunes, 2005). Portanto, o micro-*dgt* constitui o modelo ideal para a comprovação de atividade auxínica ou não. Desse modo, se substâncias que possuem respostas ligadas à auxina (e.g. enraizamento) comprovadas em plantas não mutantes falharem em induzir a mesma resposta em *dgt*, essa pode ser uma indicação de que tal substância age como auxina.

3.4.1. Crescimento das plântulas (Tomateiro *Diageotropica*)

Sementes do mutante *dgt* foram esterilizadas com solução comercial de NaClO 30% por 15 minutos, sob agitação. Essas sementes foram lavadas com água destilada e estéril em capela de fluxo laminar e inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com metade da concentração dos macronutrientes, 3% de sacarose e 0,8% de ágar. Após a germinação (5 dias), as plântulas foram transferidas para placas de Petri contendo meio MS suplementado com 40 mg L⁻¹ de AH extraído do Latossolo Amarelo eutrófico (LAe), Latossolo Vermelho distrófico (LVd) e Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (LVAd). Para o controle, não foi adicionado AH ao meio de cultura. As placas foram incubadas em sala de luz com fotoperíodo de 16 horas, na vertical,

durante 10 dias. Após esse período, foi avaliado o número de raízes laterais emergidas.

3.4.2. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições por tratamento. Foi realizada a análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste DMS $P < 0,05$ pelo programa SAEG da UFV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1: Eletroquímica de horizontes superficiais de Latossolos antes e após a extração das SH

Houve grande variabilidade dos Latossolos tanto nas propriedades eletroquímicas e no conteúdo de carbono quanto nas frações humificadas da MO. Essa variação está em conformidade com a diversidade das características químicas, mineralógicas e granulométricas dos solos (Quadro 1). No Quadro 2 é mostrada a porcentagem de redução do carbono, CTC, área superficial e argila após o processo de extração das substâncias húmicas.

A maior parte da MO dos Latossolos estudados foi constituída pela fração humificada, que representou de 67 a 93% do carbono no solo (Quadro 3). A maior fração foi a residual, não solubilizada, ou seja, a fração humina (H), seguida por AF e AH, conferindo aos solos relação CAH/CAF valores menores do que 1,0. Dabin (1981), Ortega (1982) e Canellas *et al.* (2000) encontraram a humina como principal fração orgânica de solos, e que tanto a intensa mineralização dos resíduos, como restrições edáficas à atividade biológica, tornaram os valores da relação CAH/CAF menores do que 1,0. O aumento do conteúdo de matéria húmica solúvel mais condensada pode ser entendido como decorrência do favorecimento das reações de humificação. Solos de elevada fertilidade natural, ou seja, com CTC e conteúdo de bases elevados apresentam normalmente relação CAH/CAF mais elevadas (Kononova, 1982; Stevenson, 1994). Práticas de

manejo e conservação da matéria orgânica do solo favorecem também acúmulo de AH no solo (Canellas *et al.*, 2003).

Somente uma pequena parte, entre 1 e 3% do carbono, foi solubilizada pelo NaOH 0,1 mol L⁻¹. A extração da matéria orgânica pela base forte diluída ocorre devido à ionização de grupamentos ácidos suficientes para receber elétrons da base forte. A baixa capacidade de extração é compatível com a forte adsorção específica de grupamentos funcionais oxigenados das SH com íons Al ou Fe da superfície, de acordo com mecanismo da troca de ligantes descrito por Gu *et al.* (1994) e Kaiser & Zech (1999).

Não foi observada correlação significativa entre o conteúdo de argila ou de carbono no solo e o conteúdo de matéria húmica solubilizada. No entanto, a correlação entre a composição mineralógica (avaliada indiretamente pelo índice Ki) e o conteúdo de SH solúveis foi significativa.

Quadro 1. Granulometria, índice de intemperismo (ki), composição mineralógica e área superficial dos horizontes superficiais dos Latossolos estudados

Solos	Areia	Silte	Argila	Ki ⁽¹⁾	Composição	Área	
					mineralógica da fração argila**	m ² g ⁻¹ TFSA ⁽²⁾	m ² g ⁻¹ argila
	g kg ⁻¹			-	-		
LAe	600	20	380	2,1	K>>> Gt	163	545
LBdf	50	230	720	1,8	K>> Va>> G > Gt	96	134
LVj	430	290	280	0,1	Ht>> G > Gt	183	382
LVAAd	350	160	490	0,7	K>> Gt	106	132
LVwf	130	250	620	2,0	K>> Gt > G	158	255
LVAAdf	400	110	490	1,5	K >> Gt > G > Ht	162	323
LVd	140	110	750	1,6	G> K > Ht > Gt	98	218

** K: caulinita; G: gibbsita; Gt: goetita; Ht: hematita; Va: vermiculita aluminosa. Valores extraídos de Barreto (1986); Anjos (1985) e Rodrigues & Klant (1978).

⁽¹⁾:

$$Ki = \frac{\frac{SiO_2\%}{60}}{\frac{Al_2O_3\%}{102}}$$

⁽²⁾ TFSA: Terra fina seca ao ar

Quadro 2. Percentagem de redução do carbono, capacidade de troca de cátions, argila e área superficial após o processo de extração das substâncias húmicas com NaOH 0,1 mol L⁻¹

Latosolos	C	CTC	Argila	% área	
				TFSA*	Argila**
LAe	2,6	52	2	33	33
LBdf	1,5	45	2	29	28
LVj	0,9	13	1	36	36
LVAd	1,4	50	14	76	72
LVwf	3,2	66	3	8	11
LVAdf	1,8	32	2	12	10
LVd	1,9	20	1	28	29

* percentagem da área reduzida em m² g⁻¹ de TFSA.

** percentagem da área reduzida em m² g⁻¹ de argila.

Quadro 3. Fracionamento da matéria orgânica humificada das amostras do horizonte superficial dos sete Latossolos estudados

Latosolos	C	CAF	CAH	CH	CAH/CAF	[(AH+AF)/H]x100 ⁽¹⁾	[(AH+AF+H)/C]x100 ⁽²⁾
-	g.kg ⁻¹ solo			-	-	%	%
LAe	8,6	0,1	0,09	6,6	0,9	3,4	79
	100%	1,5%	1,0%	76,9%			
LBdf	43,0	0,6	0,05	33,2	0,08	2,0	79
	100%	1,5%	0,1%	77,3%			
LVj	12,8	0,1	0,02	8,5	0,2	1,5	67
	100%	0,8%	0,2%	66,5%			
LVAd	29,5	0,3	0,08	26,9	0,3	1,5	93
	100%	1,1%	0,3%	91,3%			
LVwf	10,7	0,3	0,06	7,2	0,2	4,7	70
	100%	2,6%	0,6%	67,4%			
LVAdf	12,5	0,2	0,06	8,4	0,3	2,6	69
	100%	1,3%	0,5%	66,9%			
LVd	25,4	0,4	0,07	19,8	0,2	2,4	80
	100%	1,6%	0,3%	77,8%			

C: carbono total; C_{AF}: C na fração ácidos fúlvicos; C_{AH}: C na fração ácidos húmicos; C_H: C na fração huminas; C_{AH}/C_{AF} razão entre o conteúdo de C na fração ácidos húmicos pela fração ácidos fúlvicos; ⁽¹⁾ proporção de matéria húmica solúvel em relação à insolúvel; ⁽²⁾ proporção de matéria orgânica humificada no solo.

Nos solos de natureza oxidica, foi menor a quantidade de matéria orgânica solubilizada que nos solos de natureza caulinitica. Mais do que a quantidade de argila, o tipo de argila parece determinar a quantidade de ácidos fúlvicos e ácidos húmicos possíveis de serem extraídos desses Latossolos.

Mendonça & Rowell (1996) observaram em Latossolos argilosos, que o principal componente orgânico responsável pela carga foi a fração ácidos fúlvicos. Foi sugerido um bloqueio do sítio de carga da fração mineral pela interação com o ligante fúlvico, impedindo a evolução da matéria orgânica com a formação desses complexos. Em solos mais arenosos, a fração ácidos húmicos passa a ter relevância no componente de carga uma vez que seu teor é maior. Resultados similares foram obtidos por Dabin (1981) em solos altamente intemperizados da África, e por Volkoff *et al.* (1984), que estudaram a distribuição das frações humificadas em função da mineralogia de solos do sudeste brasileiro. Mendonça (1995) promoveu oxidação da matéria orgânica de dois Latossolos usando quantidade diferente de peróxido de hidrogênio e verificou uma liberação significativa de Al tanto da forma iônica como na forma fortemente complexada para a solução. Essa liberação, de acordo com Mendonça (1995), ocorreu em dois estágios: num primeiro com a oxidação da matéria orgânica lábil e num segundo a com a oxidação da matéria orgânica fortemente complexada. Esse mecanismo é indicativo da presença de vários sítios de troca de ligantes, responsáveis pela complexação e estabilização dos AF.

O procedimento de extração da matéria orgânica removeu um conteúdo baixo de argila. Foi perdido, em média, cerca de 1,5% de argila, exceção para o Latossolo Vermelho Amarelo distrófico, do qual foram removidos cerca de 14% da argila (Quadro 2). Essa baixa remoção da argila está de consonância com o elevado grau de flocculação das argilas dos Latossolos, fenômeno que ocorre naturalmente e é uma característica do processo de latossolização (Resende *et al.*, 1997).

Foi observada uma perda média de 30% da área superficial após o procedimento de extração, com uma grande variação entre os tipos de solo, entre 8 a 76% (Quadro 2). Não houve correlação significativa entre conteúdo removido de C e a diminuição da área superficial (% C decréscimo na área superficial = %C removido x (-15,79) + 61,15; $R^2=0,28^{ns}$). Os compostos orgânicos humificados não participam do fenômeno de adsorção física de N_2 devido à baixa temperatura

utilizada para realização da isoterma (77 K), que impõe uma energia cinética baixa às moléculas e restringe a difusão de N₂ na superfície humificada (Alvarez-Puebla *et al.*, 2005 e De Jonge 2000). Tanto Alvarez-Puebla *et al.* (2005) como De Jonge (2000) observaram uma área superficial desprezível para substâncias de natureza húmica (AH e AF) da ordem de menos de 1 até 4 m² por g de matéria húmica, quando utilizado o método de adsorção de N₂.

A retirada de menos de 3% do C total promove elevação do PCZ (Quadro 4) a valores bem próximos dos observados por outros autores para os minerais isolados (Sposito, 1989). Assim, nos Latossolos de natureza oxídica, o PCZ que se encontrava na faixa de 4,0-5,0 passou para 9,3-9,5 enquanto que, nos de natureza caulínica, a mudança foi de 4,1 para 5,7 (Figura 3). O fenômeno da adsorção da matéria orgânica à superfície mineral promove a queda no valor do PCZ. Siqueira *et al.* (1990) verificaram que essa queda foi linear para os Latossolos de natureza oxídica e quadrática para os de natureza caulínica. Benites & Mendonça (1998) adicionaram quantidades crescentes de ácidos húmicos num Latossolo com mineralogia predominantemente gibbsítica e observaram a queda linear no PESN do solo. O valor do PCZ passou de 5,65 para 5,10 com a adição de uma dose equivalente a 60 Mg de AH ha⁻¹.

Tanto Siqueira *et al.* (1990) como Benites & Mendonça (1998) observaram a queda nos valores de PCZ nos Latossolos com adição de quantidades muito elevadas de matéria orgânica. No presente trabalho, foi verificado que a retirada de pequena quantidade de matéria orgânica solúvel promove uma elevação muito mais dramática no PCZ do que a adição de grandes quantidades de matéria orgânica. Presume-se que o componente de carga seja bastante sensível aos fenômenos de degradação da matéria orgânica em solos tropicais e que a acentuada oxidação, além de liberar formas ativas de Al³⁺ como observou Mendonça (1995), possa reverter a carga das superfícies sólidas dos solos altamente intemperizados.

Os valores de ΔpH não foram revertidos com a extração da MO humificada e não foram correlacionados com a quantidade de C removido. No entanto, o potencial de superfície sofreu modificações significativas, tanto em magnitude como no seu sinal. Após a retirada da matéria orgânica solúvel, ocorre, para os solos LVj, LVd, LVA_{df}, LVw_f e LB_{df} a reversão do Ψ₀ negativo para valores positivos.

Quadro 4. Propriedades eletroquímicas do horizonte superficial antes (A) e depois (D) da extração de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos com NaOH 0,1 mol L⁻¹: Capacidade da dupla camada elétrica (CDCE), carga elétrica a uma unidade de pH acima do ponto de carga zero (pH_{PCZ+1}) e valores de PCZ e capacidade de troca de cátions (CTC) a pH 7 nas amostras de horizonte A antes (A) e depois (D) da extração das substâncias húmicas. A CDCE foi calculado pelo método do cateto na curva de titulação com concentração de 0,02 mol L⁻¹ de NaCl. A CTC foi obtida pelo método do acetato de amônio. O potencial de superfície (Ψ_0) foi estimado pela equação $\Psi_0=59,1(PCZ-pH)$

Latossolos	Tratamento	CDCE	⁽¹⁾ σ no pH _(PCZ+1)	PCZ	pH _{H₂O}	pHKCl	Δ pH	CTC	Ψ_0
-	-	($\mu\text{C V}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	cmol _c kg argila ⁻¹	-	-	-	-	(cmol kg ⁻¹)	(mV)
LAe	A	4,8	0,2	4,1	5,1	4,2	-0,9	3,2	-59
	D	14,8	0,3	5,2	6,4	4,4	-2,0	1,5	-71
LBdf	A	62,2	5,1	5,8	6,1	4,2	-1,9	8,6	-18
	D	382,1	22,4	9,6	6,5	4,6	-1,9	4,8	183
LVj	A	15,4	3,6	4,0	5,8	4,8	-1,0	2,1	-106
	D	271,9	40,7	9,3	7,6	6,6	-1,0	1,9	100
LVAd	A	30,4	6,0	4,9	5,2	4,4	-0,8	3,0	-18
	D	63,8	11,4	5,7	6,3	4,7	-1,6	1,5	-36
LVwf	A	17,4	2,7	5,2	6,8	5,9	-0,9	7,4	-95
	D	84,6	14,9	9,1	7,0	6,2	-0,8	2,5	124
LVAdf	A	20,4	2,7	5,1	5,3	4,5	-0,8	6,5	-12
	D	299,6	11,4	9,2	7,0	5,3	-1,7	4,4	130
LVd	A	22,6	1,8	5,0	5,1	4,6	-0,5	5,2	-6
	D	270,4	15,7	9,5	5,2	4,9	-0,3	4,2	254

⁽¹⁾ A carga elétrica foi transformada em cmolc kg argila⁻¹ baseado no conteúdo de argila das amostras antes e depois da extração da matéria orgânica.

Já com os Latossolos LVAd e LAe de natureza caulínítica o Ψ_0 permaneceu negativo mesmo após o procedimento de extração, visto que os valores de PCZ não aumentaram tanto como no caso dos demais Latossolos.

Foi observada redução bastante expressiva na CTC dos solos após a extração da matéria orgânica. A perda de 1% de C na matéria orgânica humificada solúvel representou uma queda média de 21% na CTC do solo ($R^2=0,67^{**}$). A quantidade elevada de cmols de H^+ por massa (kg) de ácidos húmicos ou de ácidos fúlvicos observada (Figura 3 e Quadro 5) justifica essa queda drástica na CTC com a perda da matéria orgânica humificada solúvel. A acidez total dos ácidos húmicos variou de 1314 a 1940 $cmol\ H^+ kg^{-1}$ e a de ácidos fúlvicos de 1338 a 2527 $cmols\ H^+ kg^{-1}$ AF (Quadro 5). Considerou-se que a curva foi resultado da simples ionização de grupos CO_2H e OH , desconsiderando a possível geração de carbocátions pelo ataque eletrofílico de ligações duplas insaturadas pelo HCl em valores de pH abaixo de 2,0 (Stevenson, 1994).

Quadro 5. Acidez total e sistemas tampão presentes nas substâncias húmicas solúveis

Latossolos	Acidez total ($cmol_c\ kg^{-1}$)	Nº de Sistemas tampão	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	pKa ₄	pKa ₅
-	AH	-	-	-	-	-	-
LAe	1521	2	-	-	5,4	7,6	-
LBdf	1393	3	-	-	5,8	7,5	9,6
LVj	1940	5	3,2	4,2	5,7	7,7	9,4
LVAd	1370	1	-	-	5,8	-	-
LVwf	1525	3	3,1	4,2	5,6	-	-
LVAdf	1314	5	3,3	4,6	5,9	7,4	9,5
LVd	1701	4	-	4,4	5,5	7,6	9,6
-	AF	-	-	-	-	-	-
LAe	1563	2	-	-	5,8	-	9,6
LBdf	1338	3	-	4,2	5,7	7,7	-
LVj	2527	4	3,3	4,6	-	7,6	9,6
LVAd	1945	2	-	4,3	5,2	-	-
LVwf	1806	2	-	4,6	-	-	9,4
LVAdf	1907	3	3,2	4,4	5,4	-	-
LVd	1298	3	3,1	4,6	5,9	-	-

As SH apresentaram capacidade tampão diferente entre si e foi possível observar a presença de vários grupos funcionais reativos incluindo ácidos carboxílicos e fenólicos com diferentes valores de pKa (Figura 4 e Quadro 5). Além da quantidade de H^+ o número de sistemas tampão definidos por

unidades moleculares capazes de se dissociarem em valores diferentes de pH, afeta a capacidade de tampão ácido-base do solo, ou seja, solos com maior número de sistemas tampão, tendem a apresentar maior resistência a variação da carga (García-Gil *et al.*, 2004).

A CDCE foi a propriedade eletroquímica modificada em maior grau pelo procedimento de extração. Verificou-se um incremento de 3 a 15 vezes com a retirada da MO. Latossolos de natureza oxídica tiveram incremento da CDCE quase oito vezes maiores do que os Latossolos de natureza caulínítica. A CDCE é uma medida indireta do tamponamento das cargas na superfície e depende da área de superfície, do conteúdo de cargas e do número de sistemas tampão envolvidos. Os sistemas tampão das superfícies caulíníticas e oxídicas são bastante simples e dependem da protonação e deprotonação de OH associados a Fe e Al. Notou-se, de um modo geral, para os AF e AH estudados um comportamento de ácidos fracos polipróticos, como observado por Schnitzer & Khan (1978). AF e AH isolados de Latossolos de natureza oxídica apresentaram número maior de sistemas tampão, do que os de natureza caulínítica tanto na faixa ácida, como na faixa básica (Quadro 5 e Figura 5). A retirada de SH interrompe essa seqüência de tampão de carga, e a variação da carga aumenta muito em relação à variação de uma unidade de pH. Foi observada relação linear entre o número de sistemas tampão nas substâncias húmicas (AH+AF) e o aumento da CDEC com a retirada da matéria orgânica ($y = 0,0034x + 3,3629$; $R^2 = 0,95^{**}$). Foi observado ainda um número maior de sistemas tampão nos AH do que nos AF, compatível com a maior heterogeneidade estrutural dos AH. Mendonça *et al.* (2006), por meio de curvas de titulação, observaram que a fração orgânica foi a principal responsável pelo poder tampão de Latossolos e, que a fração ácidos húmicos foi mais importante do que a fúlvica para a capacidade tampão do solo medida com NaOH.

Com este experimento foi possível observar que o sistema de tamponamento de cargas do solo é altamente dependente da pequena concentração das SH alcalino solúveis. A MO humificada insolúvel pode ter capacidade para recobrir a superfície sólida mineral, mas o tamponamento das propriedades eletroquímicas do conjunto organomineral que forma a superfície sólida é dirigido pela presença de uma pequena fração alcalino solúvel.

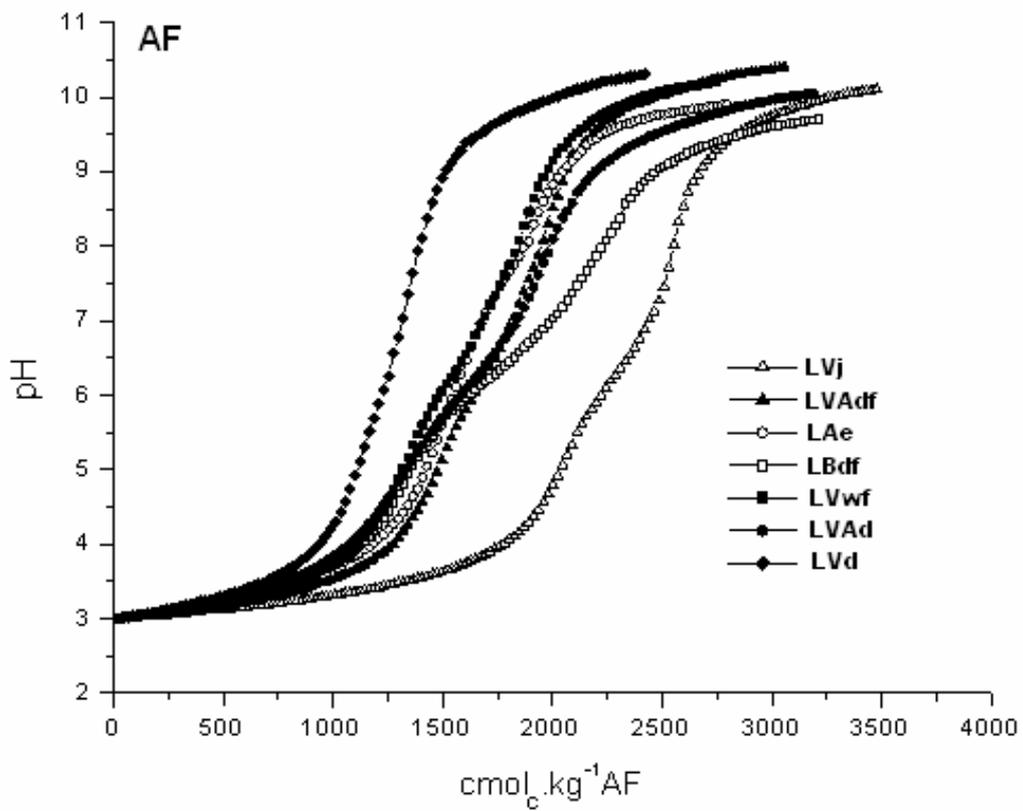
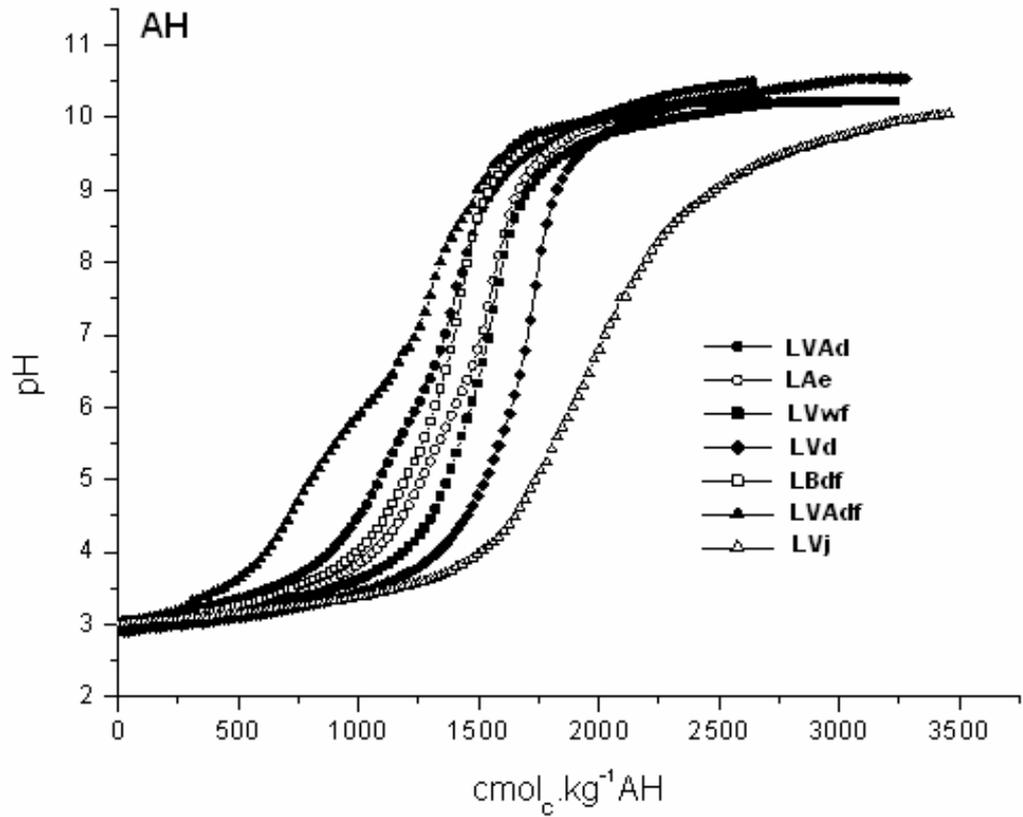


Figura 4. Curvas de titulação potenciométrica (NaOH 0,1 mol L⁻¹) de ácidos húmicos (A) e fúlvicos (B) isolados dos sete Latossolos estudados.

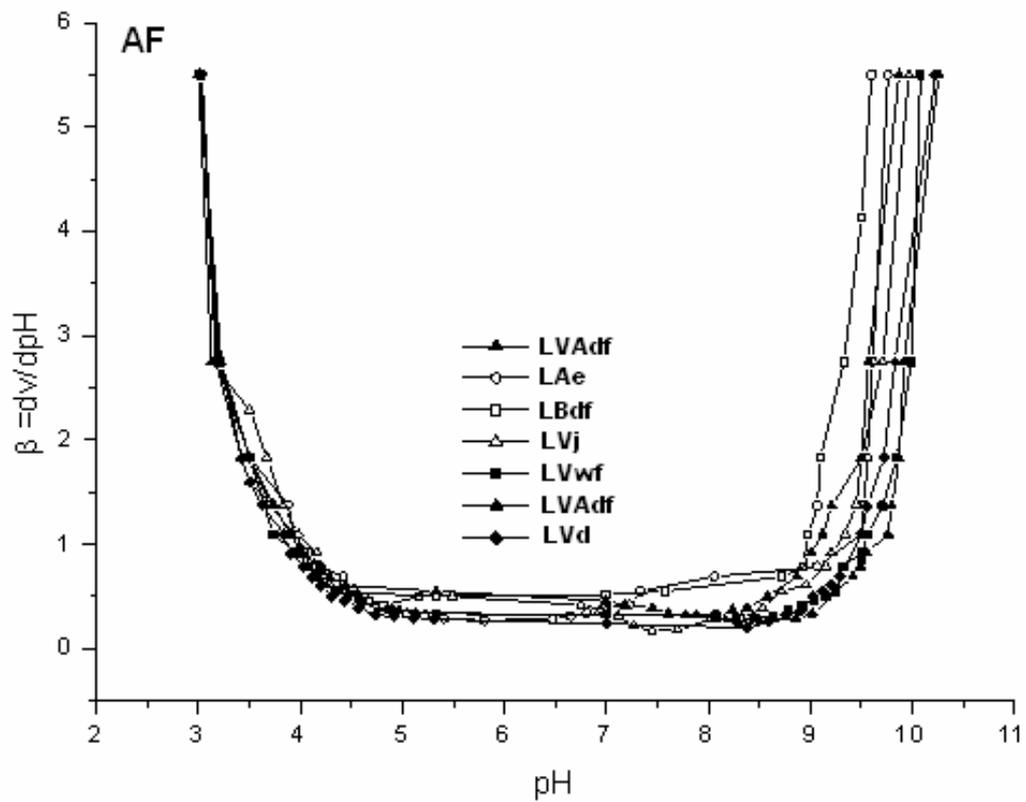
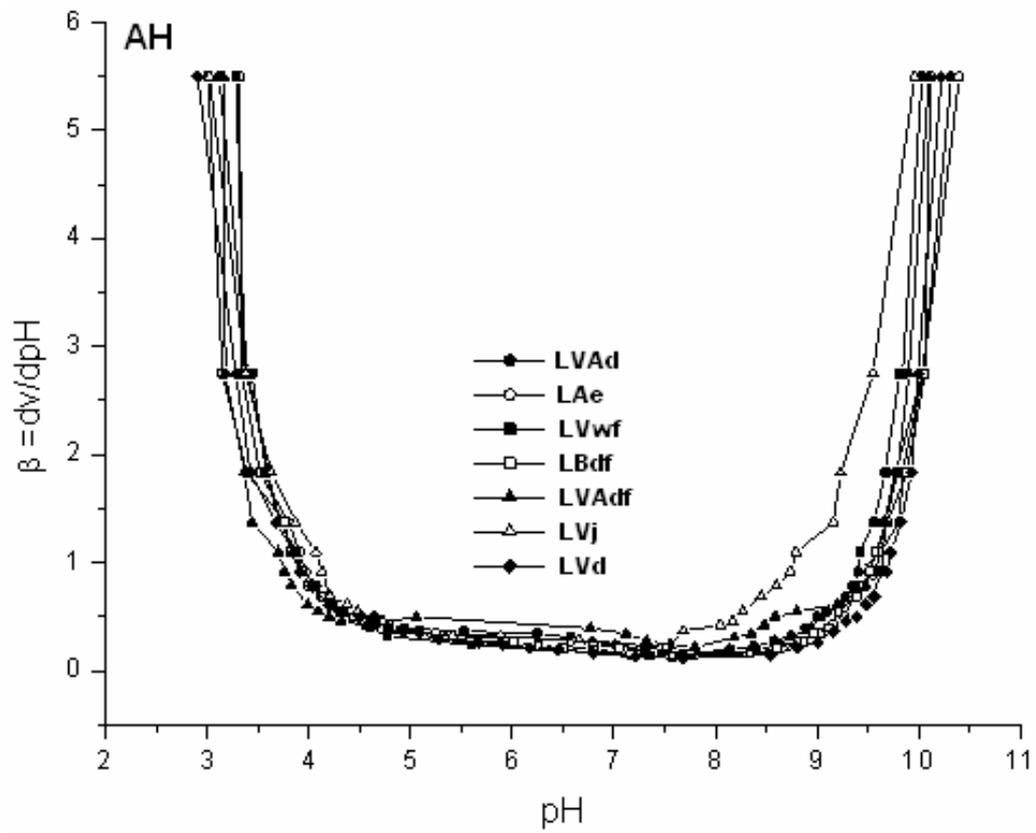


Figura 5. Curvas de derivação $[(dv/dpH)/pH]$ usada para estimar a capacidade tampão de ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) dos sete Latossolos estudados.

A remoção dessa fração promove redução bem significativa no tampão das cargas, isto é, na capacidade de regeneração do potencial de superfície com a modificação das condições do meio. Esse fator capacidade de cargas tem sido sistematicamente subestimado na química do solo em função do pequeno conteúdo de substâncias húmicas solúveis nos solos altamente intemperizados e, também, das dificuldades metodológicas inerentes ao estudo do efeito das SH sobre as propriedades eletroquímicas do solo.

A elevada correlação da CDCE com as demais propriedades eletroquímicas do solo e com o conteúdo de carbono e argila é mostrada no Quadro 6. A forte relação da CDCE com a constituição mineralógica e a sua sensibilidade em função da retirada da matéria orgânica solúvel credenciam seu uso como poderosa ferramenta para avaliação da influência das práticas de manejo do solo sobre as propriedades eletroquímicas.

Quadro 6. Coeficientes de correlação não paramétrica entre capacidade da dupla camada elétrica, propriedades eletroquímicas e conteúdo de matéria orgânica humificada dos Latossolos estudados

ANTES	CDCE ANTES		% DE REMOÇÃO	CDCE % AUMENTO	
	a	b		a	b
%			MOH	-0,72*	-0,59*
C TOTAL	0,93**	0,81**	CTC	-0,82*	-0,62*
CSH	0,85**	0,68*	Argila	-0,79*	-0,69*
CAH	-0,20	0,00	Área TFSA	-0,25	-0,24
CAF	0,90**	0,71*	Área Argila	-0,32	-0,24
CH	0,89**	0,81**			
			% DE AUMENTO		
Argila	0,70*	0,59*	PCZ	0,93*	0,81**
Ki	0,14	-0,05	pH H₂O	0,32	0,14
CTC	0,60	0,24			
PCZ	0,79*	0,33	Nº de pKas (AH+AF)	1,00**	1,00**
pH H₂O	0,26	0,10			
pH KCl	-0,30	-0,29			
ΔpH	-0,78*	0,15			
Ψ₀	0,47	0,39			
Área TFSA	-0,73	-0,81*			
Área Argila	-0,73	-0,71*			
			DEPOIS	a	b
			CTC	0,86*	0,71*
			PCZ	0,82*	0,62*
			pH H₂O	0,41	0,20
			pH KCl	0,29	0,24
			ΔpH	0,00	-0,05
			Ψ₀	0,70*	-0,59*

a- Spearman ; b- Kendall ; * P<0,05; ** P<0,01

4.2. Experimento 2: Caracterização das SH solúveis e do extrato hexânico-metanólico

4.2.1. Caracterização das substâncias húmicas solúveis

O primeiro passo crítico no estudo das substâncias húmicas solúveis é a escolha do solvente, já que as propriedades que serão avaliadas descrevem o estado do material isolado pelo determinado solvente. Camargo *et al.* (1999) mostraram que diferentes solventes extraem diferentes tipos de SH. Nesse trabalho, optou-se pelo uso de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em função do maior rendimento de extração, uma vez que a maioria das amostras de solo apresentaram baixo teor de C total. Além disso, este é o solvente recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), o que pode facilitar a comparação com outros resultados. O segundo passo crítico reside no fato de que o teor e as características das SH dependem dos fatores de formação do solo (tempo, material de origem, relevo, clima, atividade biológica) e são intensamente modificados pela atividade antropogênica, ou seja, pelo uso do solo. O processo de latossolização é comum à classe de solo elegida para esse estudo (intensa transformação da fração mineral e orgânica) e é impossível isolar a participação de cada um dos fatores de formação nas propriedades químicas das SH. Na prática, na escolha das amostras levou-se em consideração a mineralogia e conteúdo de argila no horizonte superficial, procurando-se uma possível diversidade entre os Latossolos.

A composição elementar, o conteúdo de umidade e cinzas e as relações atômicas dos AH e AF são mostradas no Quadro 7 e os resultados da acidez total, carboxílica e fenólica, relação E₄/E₆, intensidade de emissão de fluorescência com excitação fixa no azul (IF₄₆₅), capacidade de oxidação determinada em valor de pH igual a 5 (Cox₅) e 7 (Cox₇) e, por fim, a estimativa da massa molar média (MM) são apresentados no Quadro 8. De um 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 composição elementar média de outros AH e AF (Rice & MaCarthy, 1991). O teor de C nos AH variou de 432 a 563 g kg⁻¹, enquanto que a variação nos AF foi 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 a 877 g kg⁻¹ nos AF.

Quadro 7. Composição elementar (livres de cinzas e de água) e relações atômicas de ácidos húmicos e fúlvicos isolados dos sete Latossolos brasileiros estudados

Latossolos	C	H	N	O	Umidade cinzas	C/N	H/C	O/C	
-----g kg ⁻¹ -----								-	
Ácidos húmicos									
LAe	562,5	64,0	52,5	558,7	86	106	12,5	1,4	0,7
LBdf	542,0	64,1	58,9	524,1	93	66	10,7	1,4	0,7
LVj	503,1	51,1	49,9	627,5	72	116	11,8	1,2	0,9
LVAd	432,0	56,6	57,8	667,2	90	86	8,7	1,6	1,2
LVwf	468,0	60,9	46,6	603,7	86	66	11,7	1,6	1,0
LVAdf	504,8	61,1	68,5	504,6	84	38	8,6	1,5	0,7
LVd	536,5	62,7	52,9	542,7	81	82	11,8	1,0	0,8
média	507,0	60,1	55,3	575,5	85	80	10,8	1,4	0,9
SD	45,3	4,7	7,2	59,1	6,8	26,4	1,6	0,1	0,2
Ácidos fúlvicos									
LAe	545,1	67,7	87,6	519,1	10	170	7,3	1,5	0,7
LBdf	303,0	55,4	64,4	843,0	50	160	5,5	2,2	2,1
LVj	301,7	64,3	99,7	867,6	150	100	3,5	2,6	2,2
LVAd	611,6	73,8	95,7	689,4	80	240	7,5	1,5	0,8
LVwf	261,2	46,1	50,0	877,2	60	130	6,1	2,1	2,5
LVAdf	342,8	46,5	63,3	797,4	20	180	6,3	1,6	1,7
LVd	515,1	70,8	91,9	655,5	100	150	6,5	1,7	1,0
média	411,5	60,7	79,0	749,9	67	161	6,1	1,9	1,6
SD	141,3	11,4	19,4	133,4	48,2	43,8	1,3	0,4	0,7

Quadro 8. Acidez total, carboxílica e fenólica, relação E_4/E_6 , intensidade de fluorescência, capacidade de oxidação e massa molar média de ácidos húmicos e fúlvicos isolados dos sete Latossolos brasileiros estudados

Latosolos	COOH	OH Fenólico	Acidez Total	E_4/E_6	I.F. ⁽¹⁾	Cox ⁽²⁾		MMr ⁽³⁾
						pH ₅	pH ₇	
		-----cmol Kg ⁻¹ -----	-	u.a	mol _c kg ⁻¹	g mol ⁻¹ C ⁻¹		
Ácidos Húmicos								
LAe	264,4	1300,0	1565,4	7,2	107,3	1,0	1,5	990
LBdf	197,4	1230,0	1427,4	6,9	158,5	1,1	1,9	1100
LVj	70,8	1909,8	1980,4	6,7	80,7	1,9	2,9	990
LVAd	184,6	1210,8	1395,4	4,0	149,6	1,5	2,7	1227
LVwf	69,4	1495,0	1564,4	6,5	81,7	1,3	2,4	1227
LVAdf	354,5	942,0	1296,5	5,4	115,1	2,3	3,5	1163
LVd	223,6	1513,6	1737,1	8,9	113,6	1,1	1,7	1045
Média	194,9	1371,7	1566,7	6,5	115,2	1,5	2,4	1106
SD	102,0	305,6	231,7	1,5	30,1	0,5	0,7	102,6
Ácidos Fúlvicos								
LAe	168,3	1754,4	1922,6	9,5	28,1	0,5	1,0	524
LBdf	245,5	2061,3	2306,8	13,2	15,5	0,9	1,6	887
LVj	357,1	2193,8	2551,0	11,8	36,0	0,5	1,5	507
LVAd	314,3	1654,4	1968,7	9,3	30,6	0,8	2,1	794
LVwf	267,9	1598,4	1866,3	10,8	40,4	1,3	2,5	534
LVAdf	163,6	1813,6	1977,2	9,3	42,0	1,0	2,2	557
LVd	229,2	1109,4	1338,6	10,0	19,5	1,0	1,5	524
Média	249,4	1740,8	1990,2	10,5	30,3	0,9	1,8	618
SD	71,4	351,2	378,6	1,5	10,1	0,3	0,5	155,0

⁽¹⁾ Intensidade total de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a) obtida pelo espectro de emissão de uma solução de AH e AF (20mg C L⁻¹) com excitação fixa em 456 nm; ⁽²⁾ Cox: Capacidade de oxidação ⁽³⁾ MMr: massa molar média obtida pela equação $y=3,99\varepsilon + 490$ 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}.

O teor médio mais elevado de C nos AH e menor de O é compatível com o maior grau de humificação dos AH em relação aos AF (Stevenson 1994). O teor de N encontrado nas SH foi elevado, entre 47 e 69 g kg⁻¹ nos AH e entre 50 e 100 g kg⁻¹ nos AF, indicando as SH solúveis 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 Jacquín & Vong (1989) identificaram os AF como a principal fração alcalino solúvel responsável pela estabilização de N adicionado na forma de (NH₄)₂SO₄. O teor relativamente elevado de N e baixo de C nos AH e AF confere valores baixos para a relação C/N das SH solúveis. Os AH dos Latossolos apresentam 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, que apresentou valor igual a 3,5, que pode ser associado mais à involução química das SH do que à estabilização pela atividade biológica. A mineralogia predominada por óxidos de ferro impede 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 1,8 vezes maior nos AF do que nos AH, compatível com a maior acidez desses compostos, que permite sua solubilidade em qualquer valor de pH do meio.

A acidez total como esperado foi maior nos AF que apresentam, em média, 1990 cmol_c kg⁻¹ AF com valores oscilando entre 2551 e 1339 cmol_c kg⁻¹ para os AF isolados do LVj e LVd, respectivamente. Os AH apresentam conteúdo de H⁺ trocável médio de 1567 cmol_c kg⁻¹ e valores oscilando entre 1980 cmol_c kg⁻¹ e 1296 cmol_c kg⁻¹ nos AH isolados do LVj e LVAdf, respectivamente. A acidez total dos AF foi 1,2 vezes maior do que a observada nos AH, indicativo da maior hidrofiliabilidade dos AF. A acidez total das SH é alta e compatível com o grau elevado de oxidação das SH de clima tropical e, portanto, com elevado conteúdo de O. A acidez fenólica foi responsável por quase dois terços do número moles de H⁺ na acidez total das SH. Como o pKa aparente desses grupamentos é bem mais elevado do que dos grupos CO₂H, na faixa de pH normalmente encontrada para os Latossolos, a carga líquida negativa é praticamente devida à dissociação de CO₂H que aparecem em menor proporção na acidez total. Os AH isolados do LVj e do LVwf apresentaram valores mais baixos de acidez carboxílica (69,44 e

70,75 $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$, respectivamente). Os elevados conteúdos de hematita e goethita no primeiro solo e de Al^{3+} no segundo aumentam a possibilidade de formação de complexos estáveis com Fe e Al. Mendonça & Rowell (1996) mostraram o bloqueio dos grupamentos funcionais oxigenados nas SH, 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.

O grau de humificação das SH solúveis pode ser normalmente avaliado pelos valores da relação E_4/E_6 obtidos com a espectroscopia na região do visível. Os valores da relação E_4/E_6 variaram numa faixa muito ampla, com valor médio de 6,5 para AH e 10,5 para os AF. Os valores de E_4/E_6 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 E_4/E_6 dos AF foi encontrado no AF isolado do LBdf e os menores nos LVd e LBdf (10,0 e 13,2 respectivamente). Essa relação tem sido amplamente utilizada para caracterizar SH em vários tipos de ambientes (Kononova, 1982). Foi observado, anteriormente por cromatografia, que os valores da relação decresciam com o aumento da complexidade e heterogeneidade das amostras de SH e, portanto, ela pode ser usada para indicar o grau de humificação (Kononova, 1966). 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 sugerir um 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 E_4/E_6 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. Foi observada uma correlação inversa e significativa entre E_4/E_6 e a massa molecular média determinada por cromatografia de exclusão ou por ultracentrifugação. Sendo assim, é possível sugerir 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.

Foi realizada, nesse 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). Foram encontrados valores entre 990 e 1227 u.m.a para cada mol de C_{AH} e de 507 e 887 u.m.a por mol de C_{AF} , respectivamente.

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 E_4/E_6 e com o baixo conteúdo de C e elevado de O encontrados anteriormente.

Os diferentes grupamentos funcionais de uma mistura heterogênea de compostos químicos com predominância de grupamentos ácidos podem ser facilmente analisados por meio da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF), que é capaz de caracterizar vibrações de estiramento e deformações de ligações químicas entre átomos que apresentem momento dipolo diferente de zero (Coulthup *et al.*, 1964). Portanto, a espectroscopia de IV-TF é especialmente útil para a observação de grupamentos funcionais oxigenados. As Figuras 6 e 7 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 (Coulthup *et al.*, 1964). De um 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 3380 cm^{-1} (variando de 3346 a 3396 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 2929 cm^{-1} devida ao estiramento simétrico de ligações C-H, principalmente de grupos metilas (CH_3); banda de absorção forte e larga com centro em 1716 cm^{-1} (variando entre 1722 cm^{-1} e 1712 cm^{-1}) atribuída genericamente à presença de carbonilas (C=O) em cetonas e aldeídos; uma banda de absorção intensa e alargada em 1634 cm^{-1} (1625 e 1635 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 1533 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 1447 cm^{-1} atribuída à deformação de ligações C-H de grupos metilas e metilenos; uma banda de absorção bem definida centrada em 1249 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 1126 cm^{-1} e 1035 cm^{-1} devida a estiramentos C-O de polissacarídeos nos AH.

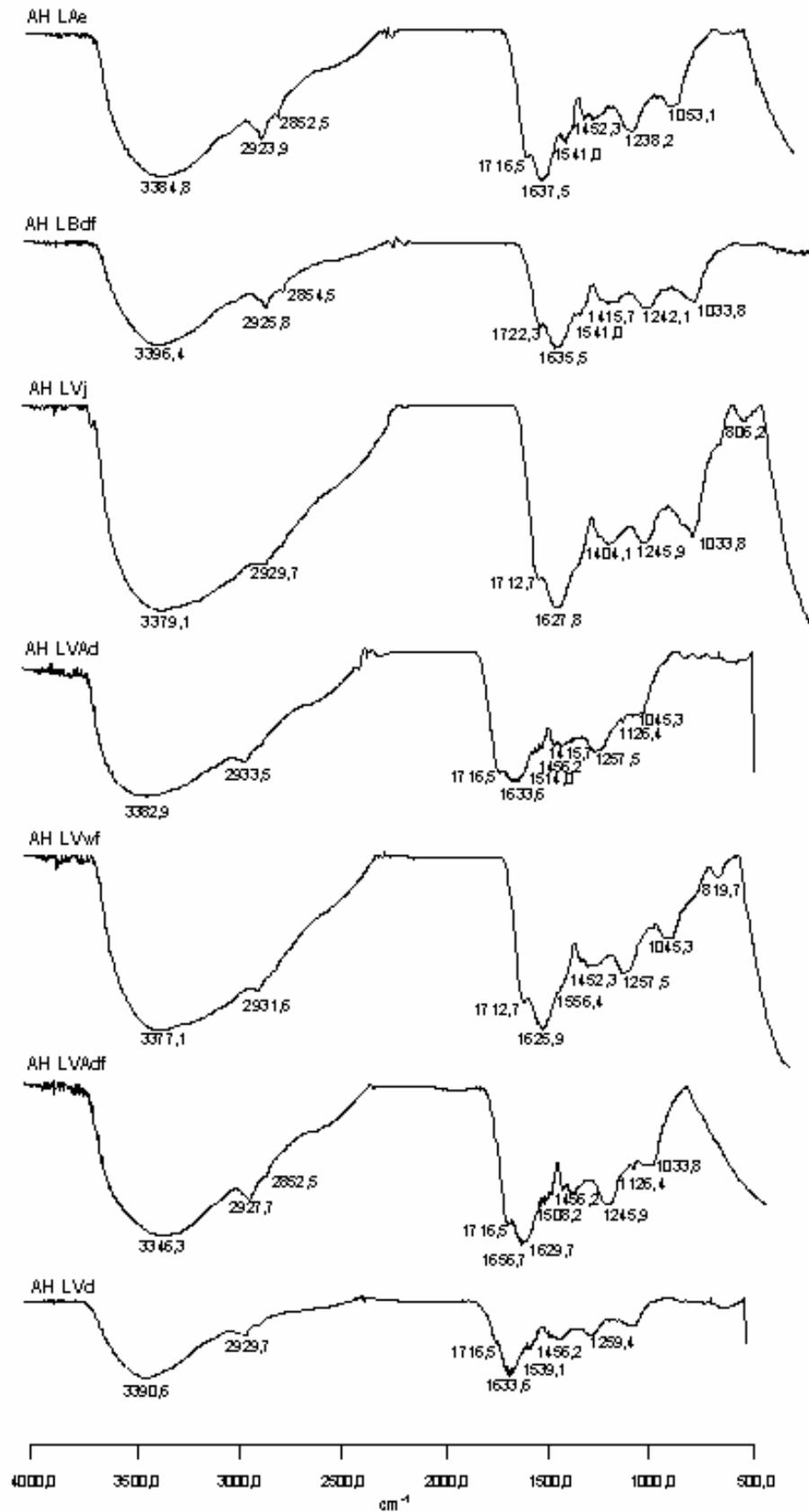


FIGURA 6. Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier dos ácidos húmicos (AH) isolados do horizonte superficial de sete Latossolos brasileiros.

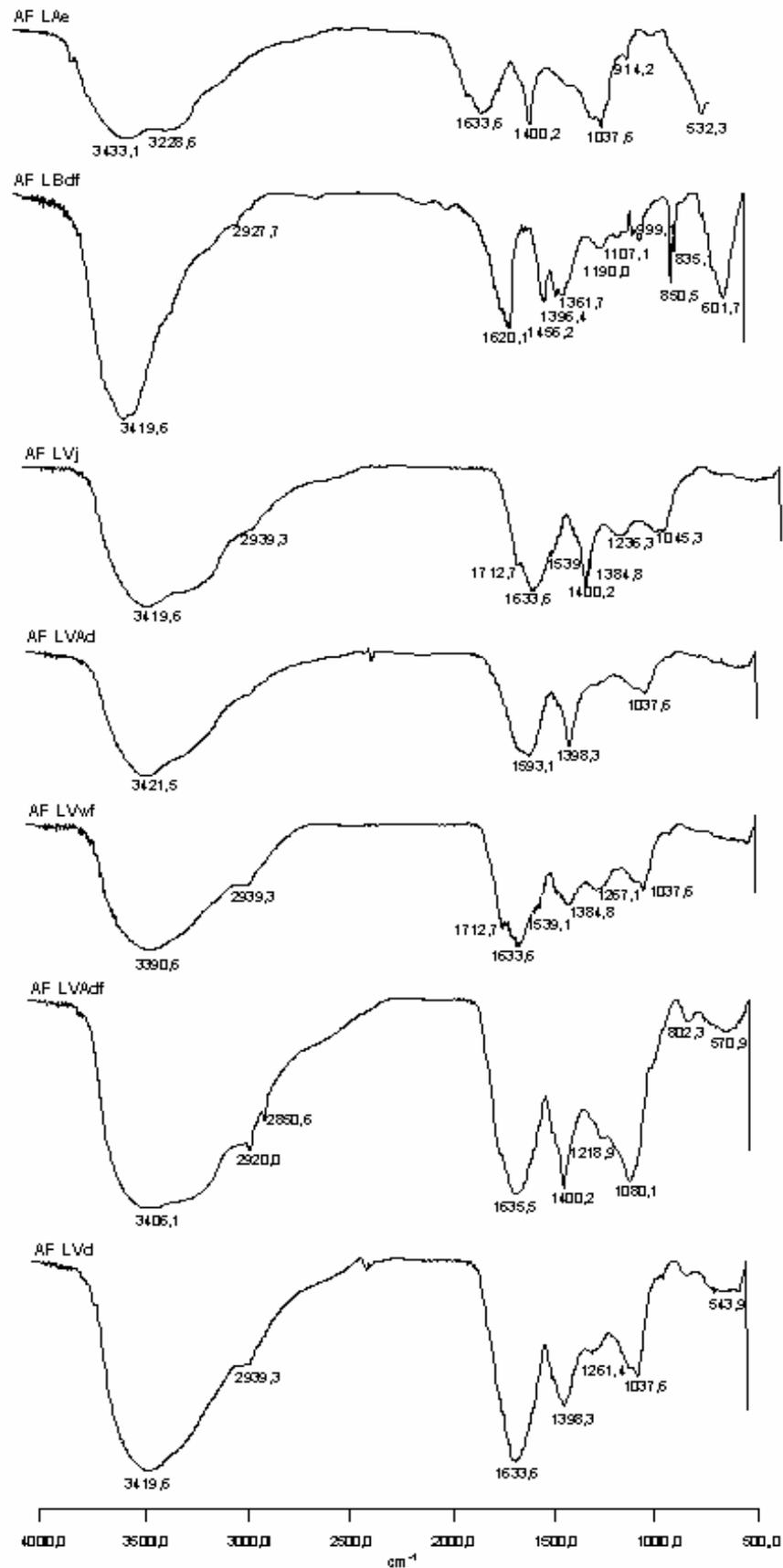


FIGURA 7. Espectros da região do infravermelho obtidos com transformada de Fourier dos ácidos fúlvicos (AF) isolados do horizonte superficial de sete Latossolos brasileiros.

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 grupos metilas (mais intensa nos AH LBdf, LAe e LVAdf, com aparecimento de uma absorção adicional em 2840 cm^{-1} atribuída a C-H de metilenos) e ao alargamento da banda de absorção em 1634 cm^{-1} nos AH isolados do LBdf e LVAd.

A análise da região de impressão digital (entre 1400-900 cm^{-1}) revela uma similaridade muito grande na funcionalidade dos espectros de IV, mas que, no entanto, não são exatamente idênticos, indicando uma origem distinta para cada tipo de 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 todos os AF a banda de absorção centrada em 3419 cm^{-1} atribuída a estiramentos O-H mais alargada nos AF isolados do LVAdf, LVj e LAe que apresentaram um ombro adicional em 3228 cm^{-1} . Essa banda de absorção centrada em 3400 cm^{-1} é bem mais estreita nos AF isolados do LBdf, indicando baixo grau de associação dessas SH. Os AF isolados do LVj, LVwf e LVd apresentaram ombro de absorção em 2940 cm^{-1} atribuído a estiramento C-H de metilas.

A intensidade de emissão de fluorescência com excitação fixa em 465 nm (IF_{465}) é maior nos AH comparada aos AF, compatível com maior grau de complexidade dessas SH. Entre os diferentes AH, os isolados do LBdf e do LVAd tiveram quase o dobro da IF_{465} do que os AH isolados do LVj e do LVwf. Os AH isolados do LVd, LVAdf e LAe apresentam intensidade de fluorescência intermediária entre os extremos citados acima. Os AF isolados de LBdf e LVd apresentam uma intensidade muito baixa de emissão de fluorescência, enquanto que os AF isolados de LVwf e LVAdf apresentam uma intensidade relativamente maior, embora quase a metade observada para os AH de menor intensidade de emissão. A IF_{465} 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 IF_{465} e a concentração de radicais do tipo semiquinonas e com o grau de aromaticidade

obtido por RMN ^{13}C em AH de diferentes fontes. O sucesso 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 semiquinonas 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 IF_{465} , o grau de humificação dos AH apresenta a ordem: $\text{LBdf} = \text{LVAd} > \text{LVd} = \text{LVAdf} > \text{LAe} > \text{LVwf} = \text{LVj}$ e a dos AF, $\text{LVAdf} = \text{LVwf} > \text{LVj} > \text{LVAd} = \text{LAe} > \text{LVd} > \text{LBdf}$.

A capacidade de oxidação determinada em pH 5 e 7 (Cox_5 e Cox_7) está associada à presença de elétrons disponíveis para reações de oxirredução, importantes na complexação de íons, principalmente Fe. A capacidade de transferir um mol_e 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, para que ocorra essa transferência, é necessária uma quantidade de elétrons relacionada à presença de radicais livres do tipo semiquinona (Baldotto, 2006). Para um determinado pH e força iônica, a Cox define um “status redox” das SH compatível com seu grau de evolução química (Baldotto *et al.*, 2005). A Cox em pH 5 variou de 1,03 a 2,31 para os AH e de 0,52 a 1,33 para os AF, enquanto para a Cox em pH 7, a variação foi de 1,51 a 3,48 para AH e 1,04 a 2,45 para os AF. Entretanto, houve somente correlação linear positiva entre os valores de Cox_5 e Cox_7 para os AH ($y = 1,4x + 0,3$; $R^2 = 0,88^{**}$). Assim, o uso da Cox_5 e Cox_7 permite estabelecer a seguinte ordem de humificação para esta SH solúvel: $\text{LAe} > \text{LVd} > \text{LBdf} > \text{LVwf} > \text{LVAd} > \text{LVj} > \text{LVAdf}$.

Os espectros de RMN ^1H de AH e AF isolados dos Latossolos estão apresentados na Figura 8 e o Quadro 9 mostra o resultado da integração das principais regiões de deslocamento químico (δ^{H}) dos respectivos espectros. Os espectros foram divididos em três grandes regiões de δ^{H} . A primeira região entre 0,2 e 3,0 ppm é geralmente assinalada como de H alifáticos, enquanto que o final dessa faixa do espectro, entre 2,0 até 2,8 ppm, pode ser atribuído a H ligados a átomos eletronegativos (O e N).

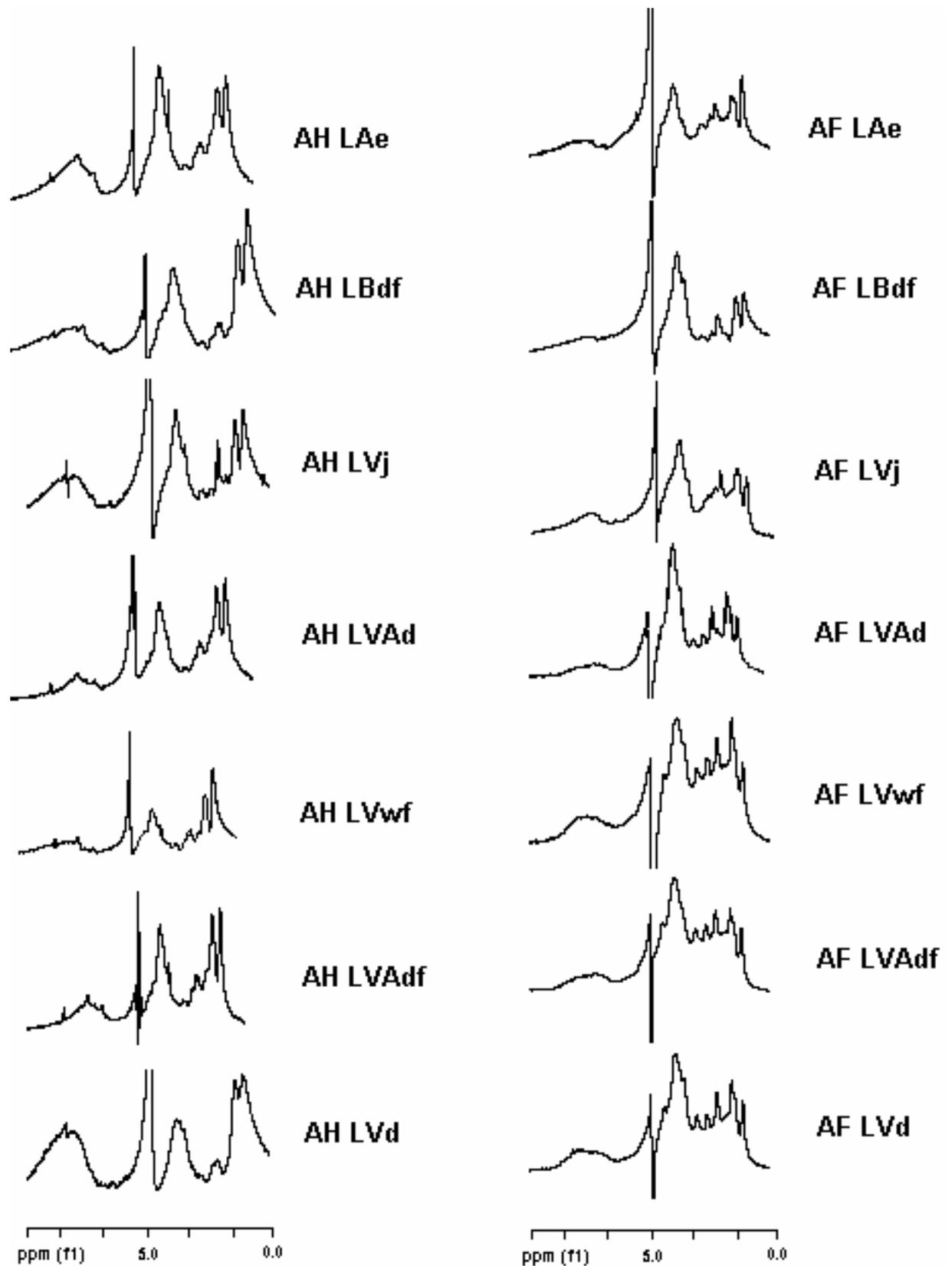


Figura 8. Espectros de RMN H^1 de ácidos húmicos (AH) e Fúlvicos (AF) do horizonte superficial dos sete Latossolos brasileiros estudados.

Quadro 9. Distribuição relativa dos deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio em ppm obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) de ácidos húmicos (AH) e Fúlvicos (AF) dos sete Latossolos brasileiros estudados

Latossolos ⁽¹⁾	H alifáticos	H polissacarídeos	H aromáticos
	0,2-3,0 ppm	3,0-4,5 ppm	6,0-8,5 ppm
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
SD	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
SD	4,5	7,2	3,8

O δ^H entre 0,9 e 1,3 ppm pode ser atribuído à existência de H em grupos metilas de cadeias alifáticas ramificadas ou grupos metilas em posição terminal em longas cadeias metilênicas. A segunda região é compreendida pelos δ^H entre 3 e 4,5 ppm 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 ppm é devida à 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 ppm do que os AF. Além disso, os AH apresentam, em média, um teor de H na região de compostos aromáticos de 17%, enquanto que, nos AF, esse valor é de 11%. Os AF apresentaram menor quantidade relativa de H em grupos metilas (CH_3) e metilenos (CH_2) do que os AH e, além disso, a quantidade relativa de CH_2 foi maior do que a de CH_3 nos espectros dos AF.

Outra diferença significativa com relação à distribuição de H nos AF em relação aos AH corresponde à maior quantidade de H na região de δ^H entre 3 e 4,5 ppm 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 ligados a O é compatível 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>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 seqüência 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 observaram 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.

4.2.2. Caracterização do extrato hexânico-metanólico (Ext_{hmet})

A composição elementar obtida no analisador elementar automático Perkin Elmer 2400, em amostras de 4 mg do Ext_{hmet} , é mostrada no Quadro 10. O Ext_{hmet} é constituído, essencialmente por compostos genericamente designados por ácidos graxos, uma vez que a espectroscopia de IV-TF (Figura 9) permite observar a forte presença de grupos CH_3 e CH_2 e uma presença discreta de grupos O-H, típica de ácidos graxos de cadeia longa (C18-C20) conforme Coulthup *et al.* (1964).

Quadro 10. Composição elementar dos Extratos hexânico-metanólico obtidos dos diferentes Latossolos após a extração da matéria orgânica humificada solúvel com NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Latossolos ⁽¹⁾	C	H	N
-----g.kg ⁻¹ -----			
Extrato hexânico-metanólico			
LAe	99,0	15,5	8,3
LBdf	191,0	44,7	47,7
LVj	78,9	8,4	7,0
LVAAd	168,3	31,3	48,4
LVwf	185,1	39,0	41,6
LVAdf	123,0	17,4	11,9
LVd	98,7	15,6	8,2
Média	134,9	24,6	24,7
SD	45,9	13,8	20,0

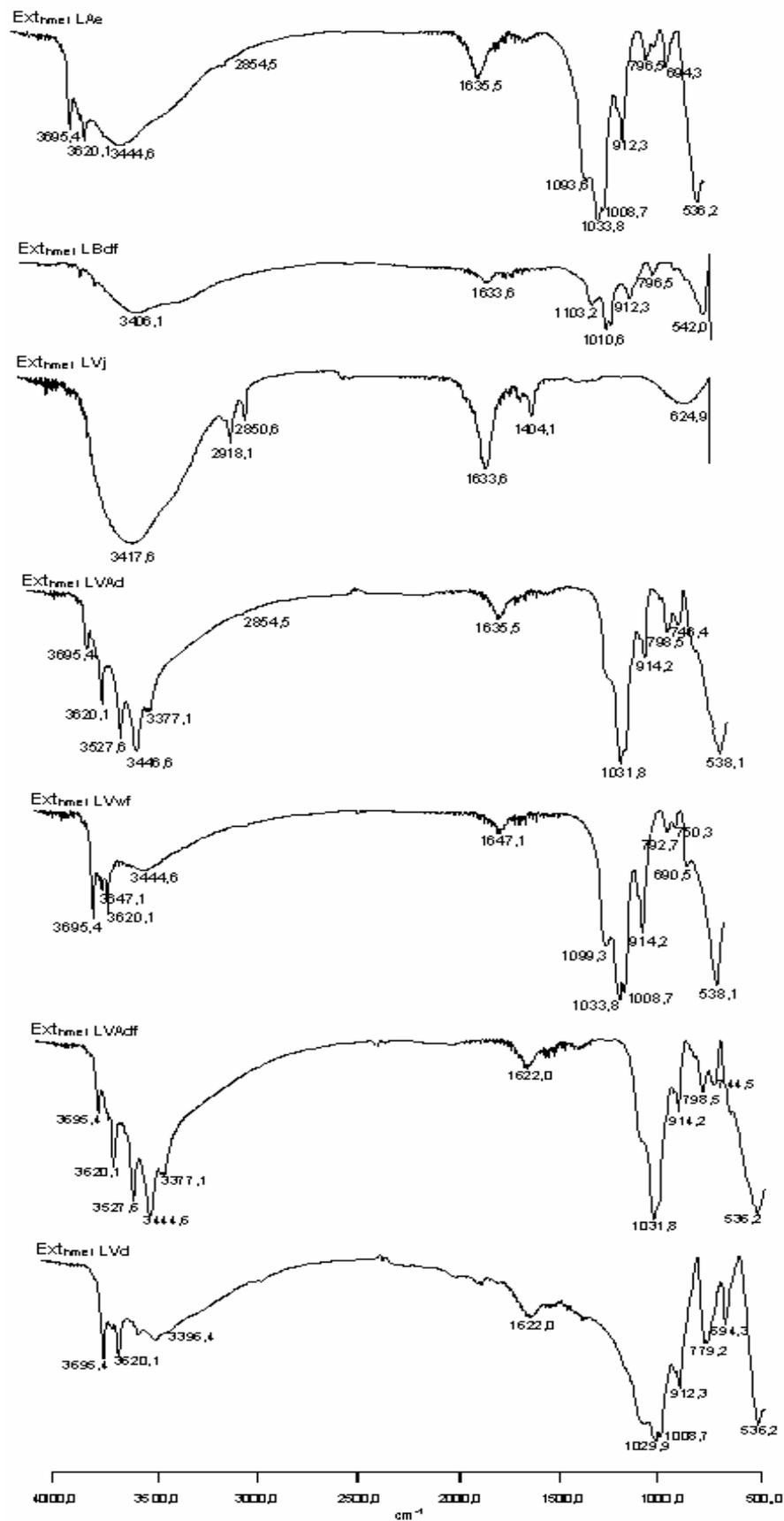


FIGURA 9. Espectros de IV-TF dos extratos hexânico-metanólico obtidos dos diferentes Latossolos após a extração da matéria orgânica humificada solúvel com $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A acidez total, carboxílica e fenólica do extrato foi desprezível, não sendo detectada pela titulação potenciométrica descontínua (método de Schnitzer & Gupta, 1965). Usando-se o método da titulação contínua ácido-base, os valores obtidos foram muito baixos e não superaram os valores encontrados para a titulação das amostras em “branco”. A composição elementar encontrada é típica de compostos com grande insaturação. A detecção de N no Ext_{hmet} indica a possibilidade da presença de alquilamidas (banda de absorção em 1650 cm⁻¹ no IV-TF, Figura 9) e, portanto, do mecanismo de retenção de N em compostos altamente hidrofóbicos. As amostras não foram solúveis nos solventes disponíveis (NaDO, CCl₃, MetOD, Hex), não sendo possível a obtenção de espectros RMN H em solução. O baixo rendimento de extração (menos de 20 mg de extrato) inviabilizou a obtenção de espectros no estado sólido.

4.3. Experimento 3: Promoção do crescimento radicular de *Arabidopsis thaliana* por SH solúveis e pelo Ext_{hmet} isolados de diferentes Latossolos brasileiros

A arquitetura do sistema radicular é alterada em resposta aos estímulos hormonais e ambientais e a quantidade de raízes laterais é influenciada por uma diversidade muito complexa de sinais externos e internos (Torrey, 1986; López-Bucio *et al.*, 2003; Sorin *et al.*, 2005). AH, AF e o Ext_{hmet} apresentaram habilidade para induzir mudanças no padrão de enraizamento de *Arabidopsis*. A Figura 10A apresenta as curvas de regressão quadrática para a densidade de raízes laterais dos AH, AF e Ext_{hmet}. Os resultados do incremento da densidade de raízes laterais em relação ao controle na concentração correspondente a 100% do estímulo, obtida pela primeira derivada da regressão quadrática do efeito da concentração de ácidos húmicos (190 mg L⁻¹), ácidos fúlvicos (220 mg L⁻¹), e de extrato hexânico-metanólico (100 mg L⁻¹) são mostrados na Figura 10B. Os valores são superiores aos obtidos com a aplicação de AIA na concentração de 10⁻⁶ mol L⁻¹.

As plântulas de *Arabidopsis thaliana* no experimento são mostradas na Figura 11 A. As raízes das plântulas tratadas com AH, AF e com o Ext_{hmet} isolados dos diferentes Latossolos após a extração alcalina das substâncias húmicas são mostradas na Figura 11 B.

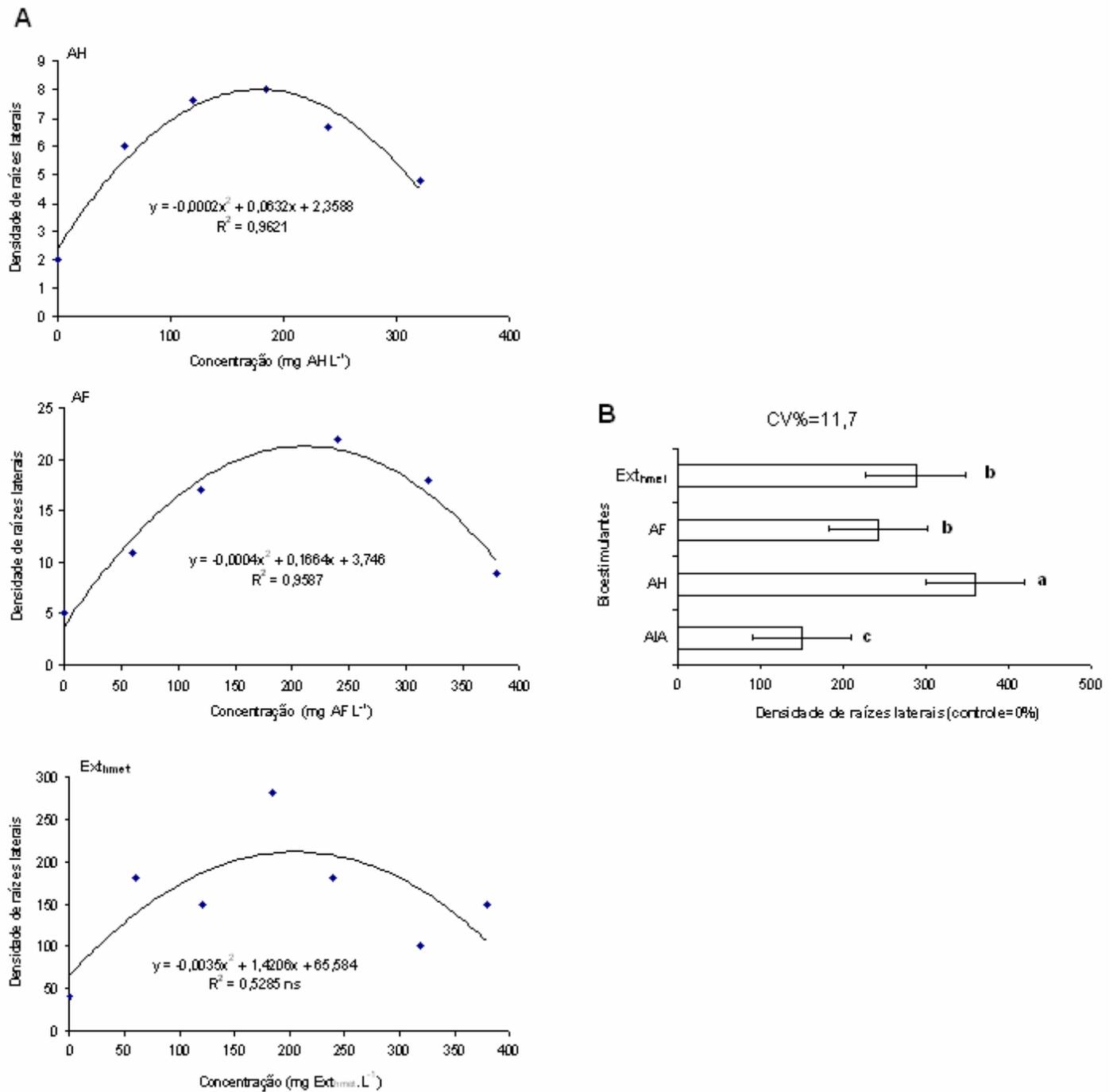


Figura 10. **A:** Curvas de regressão quadrática dos AH, AF e do Ext_{hmet}; **B:** Incremento da densidade de raízes laterais em relação ao controle na concentração correspondente a 100% do estímulo obtida pela primeira derivada da regressão quadrática do efeito da concentração de ácidos húmicos (AH, 190 mg L⁻¹), ácidos fúlvicos (AF, 220 mg L⁻¹), extrato hexânico-metanólico (Ext_{hmet}, 100 mg L⁻¹) e ácido indol acético (IAA, 10⁻⁶ mol L⁻¹).

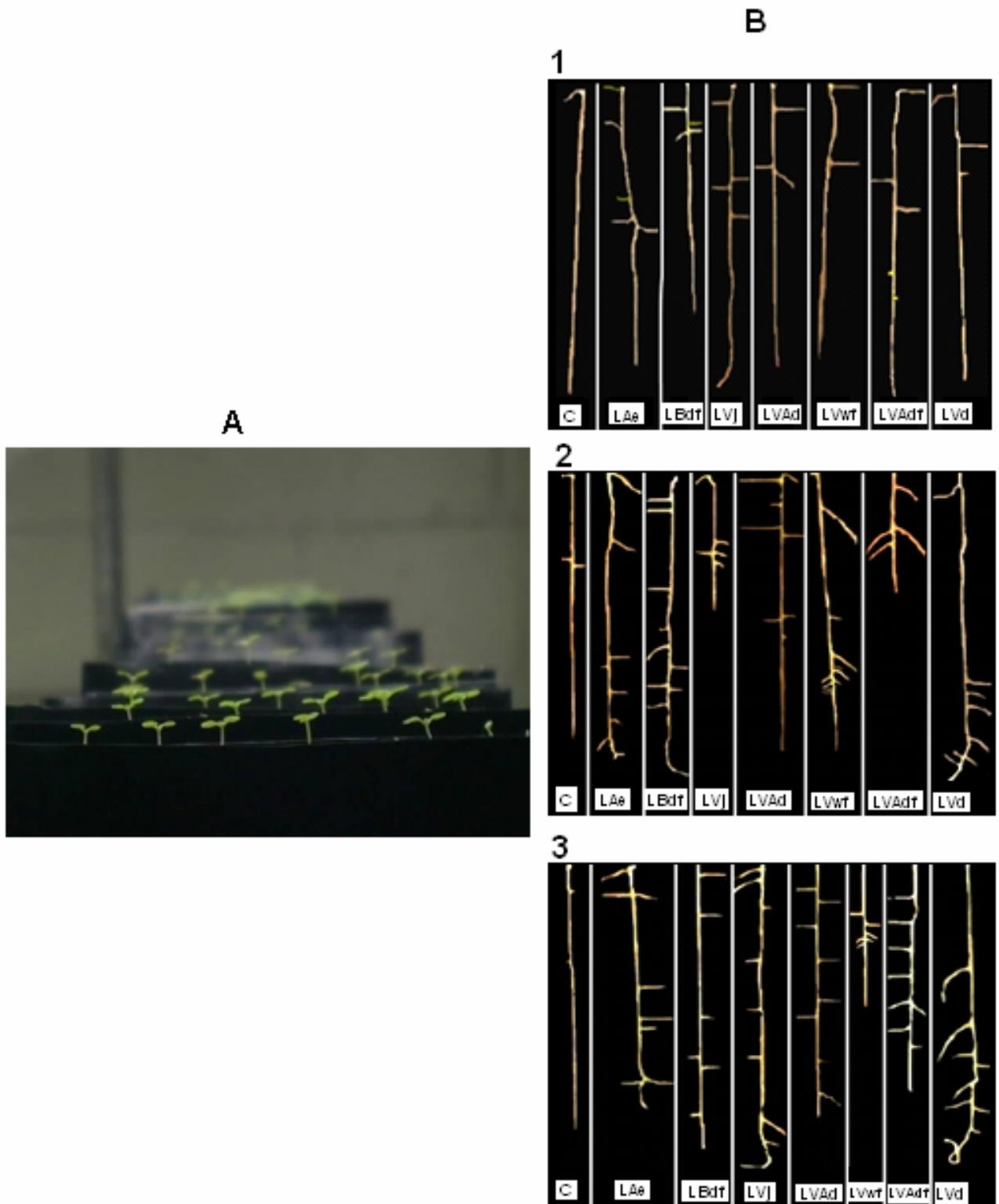


Figura 11. **A:** Plântulas de *Arabidopsis thaliana* no experimento; **B:** Raízes das plântulas tratadas com ácidos húmicos (40 mg L^{-1}) **(1)**, ácidos fúlvicos (100 mg L^{-1}) **(2)** e com o extrato metanólico-hexânico (100 mg L^{-1}) **(3)**, isolados dos Latossolos. C: controle; LAe: Latossolo Amarelo eutrófico; LBdf: Latossolo Bruno distroférico; LVj: Latossolo Vermelho perférico; LVAd: Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico; LVwf: Latossolo Vermelho acriférico; LVAdf: Latossolo Vermelho-Amarelo distroférico e LVd: Latossolo Vermelho distrófico.

A arquitetura radicular de *Arabidopsis thaliana* foi significativamente modificada pela adição de AH à solução de cultivo e os resultados são apresentados na Figura 12 (A, B, C e D). O número de raízes laterais emergidas é de duas a quatro vezes maior nas plantas tratadas com AH do que das plantas controle. A indução de raízes laterais é o resultado típico da influência das substâncias húmicas sobre o crescimento radicular e também foi manifestado em *Arabidopsis*.

As plantas tratadas com AH isolados do LAe apresentaram maior número de raízes laterais e as tratadas com AH proveniente do LVwf o menor número, embora significativamente maior do que as plantas controle (Figura 12A). Curiosamente, o AH, que promoveu o menor estímulo no número de raízes laterais, foi o que promoveu o aparecimento de raízes laterais mais compridas. Foi observado, além disso, o encurtamento da raiz principal provocado pela adição de AH. Esse efeito foi significativo para os AH isolados de LBdf, LVAd, LVwf e LVAdf e não significativo em relação às plantas-controle para os AH isolados de LAe, LVj e LVd. (Figura 12C).

A densidade de raízes laterais foi significativamente afetada pelos diferentes AH. Os AH isolados do LBdf apresentaram o maior número de raízes laterais por unidade de comprimento da raiz primária e o LVwf o menor, embora ainda superior estatisticamente às plantas controle (Figura 12 D).

Os AF estimularam significativamente o enraizamento lateral de *Arabidopsis* tanto em número como no comprimento das raízes laterais (Figura 13 A e B).

O crescimento da raiz principal foi fortemente inibido pelos AF isolados de LVj, LVAd, LVwf e LVAdf num comportamento típico de plantas tratadas com auxinas e sem inibição em relação ao controle para os tratamentos com AF isolados de LAe, LBdf e LVd (Figura 13 C). O estímulo na emissão de raízes laterais e encurtamento da raiz principal, com a maioria dos AF, gerou um aumento na densidade média de raízes laterais entre duas e três vezes maior em relação às plantas controle (Figura 13 D).

O AF isolado do LBdf promoveu o maior estímulo na formação de raízes laterais seguido dos AF isolados de LVwf e LVd. O menor estímulo foi observado com o AF isolado do LVAdf, porém ainda significativamente superior ao observado no controle (Figura 13 A).

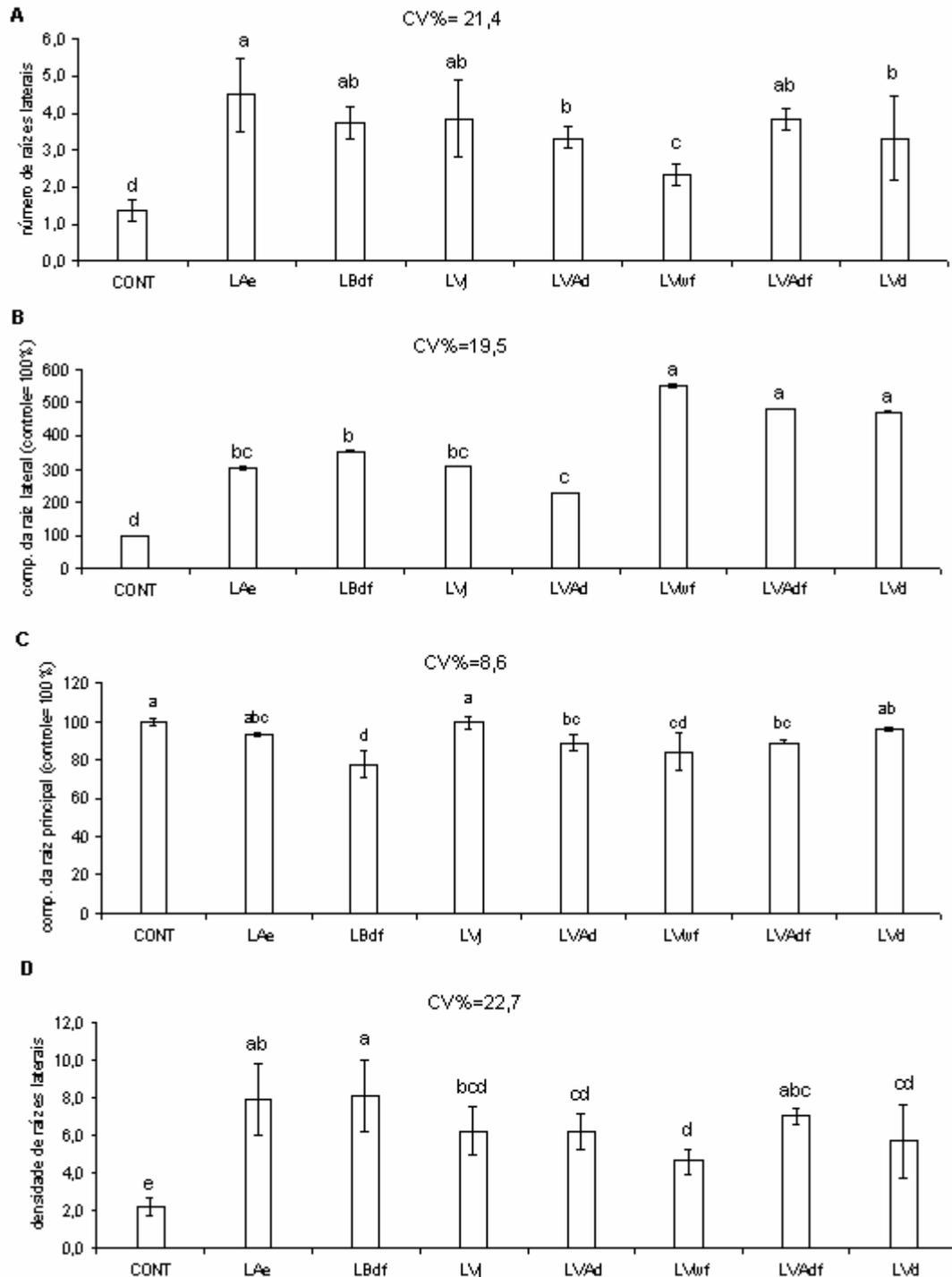


Figura 12. Efeito de ácidos húmicos (40 mg L^{-1}) isolados de diferentes Latossolos brasileiros sobre a arquitetura do sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Dados do número de raízes laterais (**A**); comprimento das raízes laterais (**B**); comprimento da raiz principal (**C**); densidade de raízes laterais (**D**) representam a média de 8 plantas \pm SD. O comprimento das raízes laterais e o comprimento do eixo principal foram normalizados em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS $P < 0,05$.

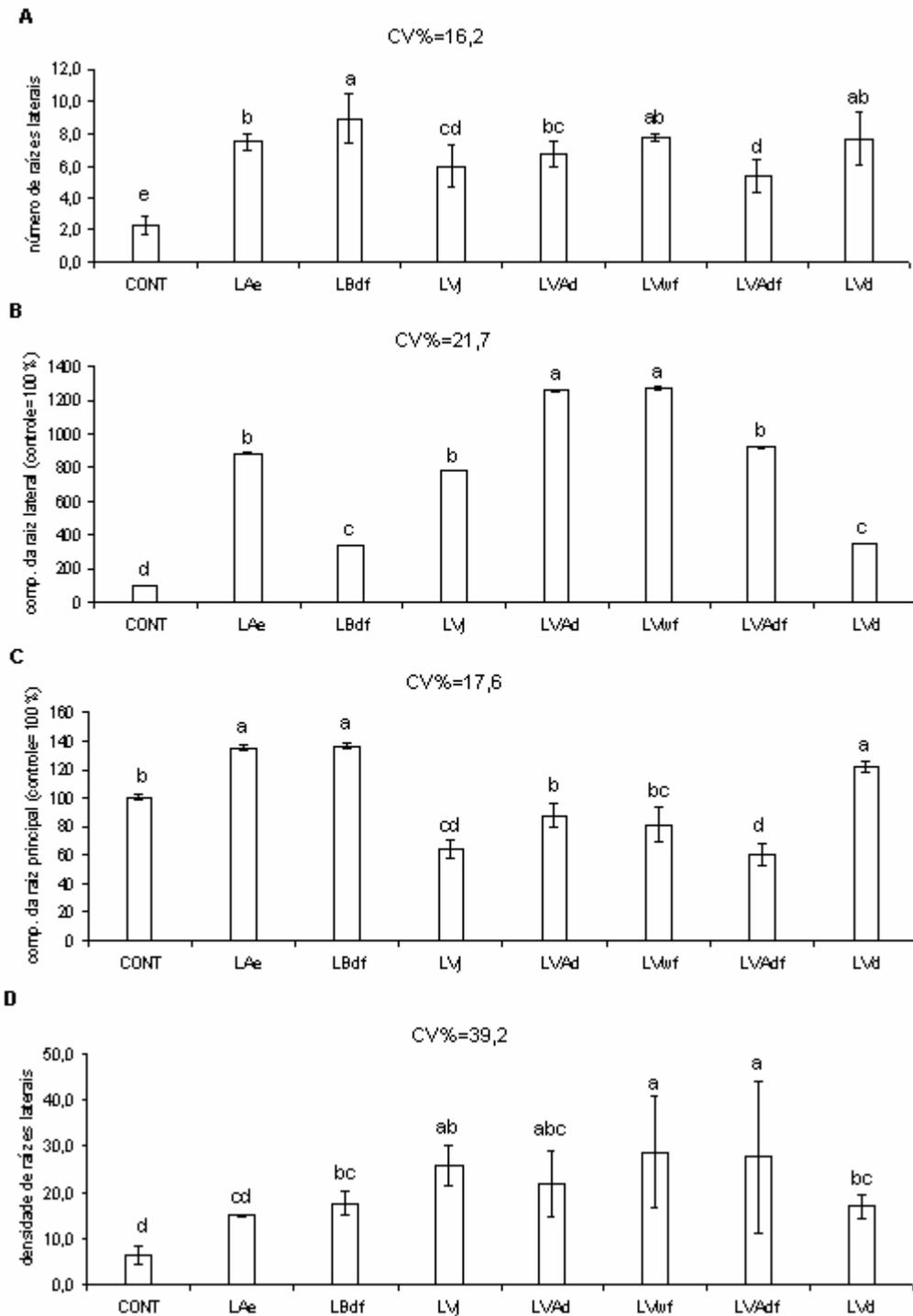


Figura 13. Efeito dos ácidos fúlvicos (100 mg L^{-1}) isolados de diferentes Latossolos brasileiros sobre a arquitetura do sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Dados do número de raízes laterais **(A)**; comprimento das raízes laterais **(B)**; comprimento do eixo principal **(C)**; densidade de raízes laterais **(D)** representam a média de 8 plantas \pm SD. O comprimento das raízes laterais e o comprimento do eixo principal foram normalizados em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS $P < 0,05$.

O maior efeito em magnitude dos AF sobre a arquitetura radicular foi observado no comprimento das raízes laterais. Os AF isolados de LVAd e LVwf promoveram acréscimos no comprimento de raízes laterais da ordem de 12 vezes em relação ao controle, ou seja, acréscimos de 1100%. O menor estímulo observado foi com o AF isolado do LBdf, que promoveu acréscimo de 200% no comprimento das raízes laterais em relação às plantas controle (Figura 13B).

Surpreendentemente, o extrato metanólico-hexânico (Ext_{hmet}) obtido dos Latossolos após o processo de extração da matéria humificada alcalino solúvel também estimulou significativamente o enraizamento, modificando marcadamente a arquitetura radicular de *Arabidopsis* (Figura 14 A, B, C e D).

O Ext_{hmet} que corresponde à parte solúvel em solventes apolares da fração da matéria orgânica intimamente associada à fração mineral (huminas) promoveu acréscimos entre 150 e 264% no número de raízes laterais e de 405 a 2280% no comprimento dessas raízes em relação às plantas controle (Figura 14 A e B). Esse dramático efeito no enraizamento lateral foi especialmente sentido com o Ext_{hmet} obtido do LVj, seguido do LVAd e LVwf.

As respostas obtidas com o comprimento da raiz principal foram bastante contrastantes. Três Ext_{hmet} , obtidos de LBdf, LVj e LVd aumentaram o comprimento da raiz principal em relação ao controle. O Ext_{hmet} obtido de LVAdf não teve qualquer efeito e os obtidos de LAe, LVAd e LVwf diminuiram o comprimento da raiz principal, sendo que, para este último, foi observada uma diminuição dramática (Figura 14 C).

Há muito tempo pesquisadores têm encontrado na matéria orgânica humificada substâncias fisiologicamente ativas com capacidade de influenciar positivamente o desenvolvimento das plantas (Bottonley, 1917). Geralmente, é observado um forte estímulo no desenvolvimento radicular (bem mais do que na parte aérea) com concentrações relativamente pequenas de SH em solução e inibição do crescimento em doses maiores, semelhante à curva normalmente obtida nos ensaios com hormônios vegetais (Vaughan & Malcolm, 1985).

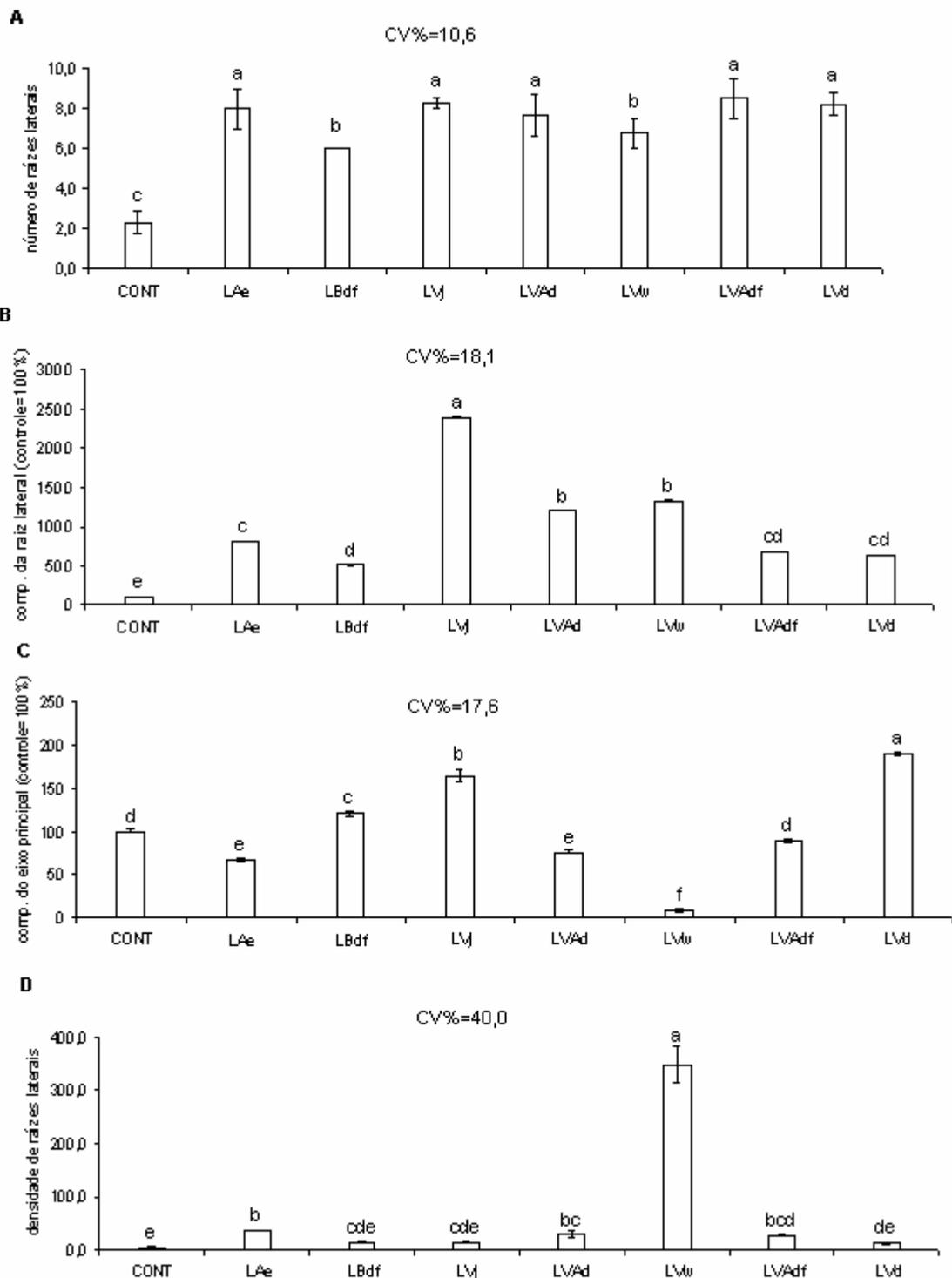


Figura 14. Efeito do Extrato hexânico-metanólico (100 mg L^{-1}) isolados de diferentes Latossolos brasileiros sobre a arquitetura do sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Dados do número de raízes laterais (**A**); comprimento das raízes laterais (**B**); comprimento do eixo principal (**C**); densidade de raízes laterais (**D**) representam a média de 8 plantas \pm SD. O comprimento das raízes laterais e o comprimento do eixo principal foram normalizados em relação ao controle (CONT=100%). Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste DMS $P < 0,05$.

Vários autores verificaram, por diferentes métodos, a presença de estruturas similares ou muito próximas das auxinas nas SH (Muscolo *et al.*, 1998; Canellas *et al.*, 2002) e, a partir das informações proporcionadas por estes pesquisadores, realizou-se o experimento a seguir.

4.4. Experimento 4: Desenvolvimento radicular de tomateiro *diageotropica* por ácidos húmicos

As auxinas (do grego *auxin*, crescimento) são pequenas moléculas (179 Da) produzidas, principalmente, a partir do triptofano (Sarwar *et al.*, 2002), que, raramente, se acumulam nos tecidos, mas são, constantemente, produzidas também por uma ampla gama de microrganismos do solo (Sarwar & Kremer, 1995).

Estudos genéticos com *Arabidopsis* têm levado à identificação de genes com função de sinalização para auxina e duas grandes famílias de proteínas foram extensamente identificadas: as ARF (fator de resposta à auxina, 22 genes identificados) e AUX/IAA (29 genes identificados) (Parry & Estelle, 2006).

Além disso, uma série de proteínas habilitadas a se unirem às auxinas foram identificadas no lado de fora das membranas biológicas (out-side), tais como as ABP1 (Auxin Binding Protein), que podem atuar como receptores exógenos de estruturas similares às auxinas presentes em solução como a do solo. Recentemente, foi identificada a proteína TIR1 como um receptor de auxina (Kepinski & Leyser, 2005). Esta proteína, ao se ligar à auxina, ativa a degradação de proteínas AUX/IAA via ubiquitinação e complexo proteossômico, liberando a transcrição de genes pelos ARFs. Apesar do aumento constante das informações fisiológicas e moleculares, o mecanismo de controle da emissão das raízes continua muito pouco entendido (Perry & Estelle, 2006), ainda mais em relação à presença de estímulos hormonais exógenos à célula.

O mecanismo hormonal proposto para a iniciação de raízes laterais tem se baseado no uso de mutantes com genes defectivos para as respostas hormonais, como os mutantes de tomateiro *Never ripe* (*Nr*, etileno) *diageotropica* (*dgt*, auxina) e *bushy root* (*brt*, citocinina) e engloba um balanço dessas moléculas sinais (Peres *et al.*, 2004). Segundo Perry & Estelle (2006), o sinal primário que dispara a iniciação da raiz lateral é promovido pela auxina que induz a iniciação

da raiz lateral pelo movimento descendente polar desde as folhas jovens até a ponta da raiz através do cilindro vascular (pelo periciclo ou xilema diferenciado). A citocinina inibe a iniciação de raízes laterais no ápice radicular e o etileno produzido localmente nos vasos diferenciados de células do protoxilema determina o sítio exato da iniciação celular. A produção de etileno é um resultado direto da elevada concentração de auxina nas células do protoxilema. Foi observado que os AH isolados de LAe, LVd e LVAd não foram capazes de induzir o enraizamento lateral no mutante defeutivo para via de sinalização de auxina *dgt* Figura (15 A e B).

Considerando-se que resultados anteriores evidenciaram que o AH oriundo de vermicomposto (Zandonadi, 2006) e os AH isolados dos diferentes tipos de Latossolos avaliados neste experimento estimulam a formação de raízes laterais no controle não mutado, ou seja, a cv Micro-Tom (Figura 16 A e B), conclui-se que o AH precisa de uma via de sinalização de auxina para agir, o que coloca essa substância na categoria de auxinas. No entanto, a presença de respostas atípicas em *Arabidopsis*, tais como estímulo no comprimento do eixo principal de alguns AH, AF e Ext_{hmet} sugerem a presença de outras substâncias fisiologicamente ativas nas SH. É possível, ainda, considerar a participação das SH em solução como um tampão de moléculas sinais, liberando ou captando moléculas-sinais da solução de acordo com o padrão de exsudação de H⁺ ou ácidos orgânicos pelas raízes, funcionando como um agente regulador do balanço hormonal ligado ao enraizamento lateral.

A presença de substâncias orgânicas fisiologicamente ativas de natureza individual ainda é considerada por alguns autores como incompatível com o conceito de matéria orgânica humificada constituída por macromoléculas de constituição mais ou menos constante e incapaz de acessar o interior da célula (Stevenson, 1994; Tan, 2003). Os fragmentos biomoleculares identificáveis têm sido especificamente excluídos da definição tradicional das substâncias húmicas por estes autores. No entanto, se a matéria orgânica humificada for reconhecida como uma associação supramolecular de componentes moleculares, não há motivos, segundo Sutton & Sposito (2005), para excluir uma categoria inteira de componentes da definição de matéria humificada simplesmente porque eles apresentam natureza bioquímica definida.

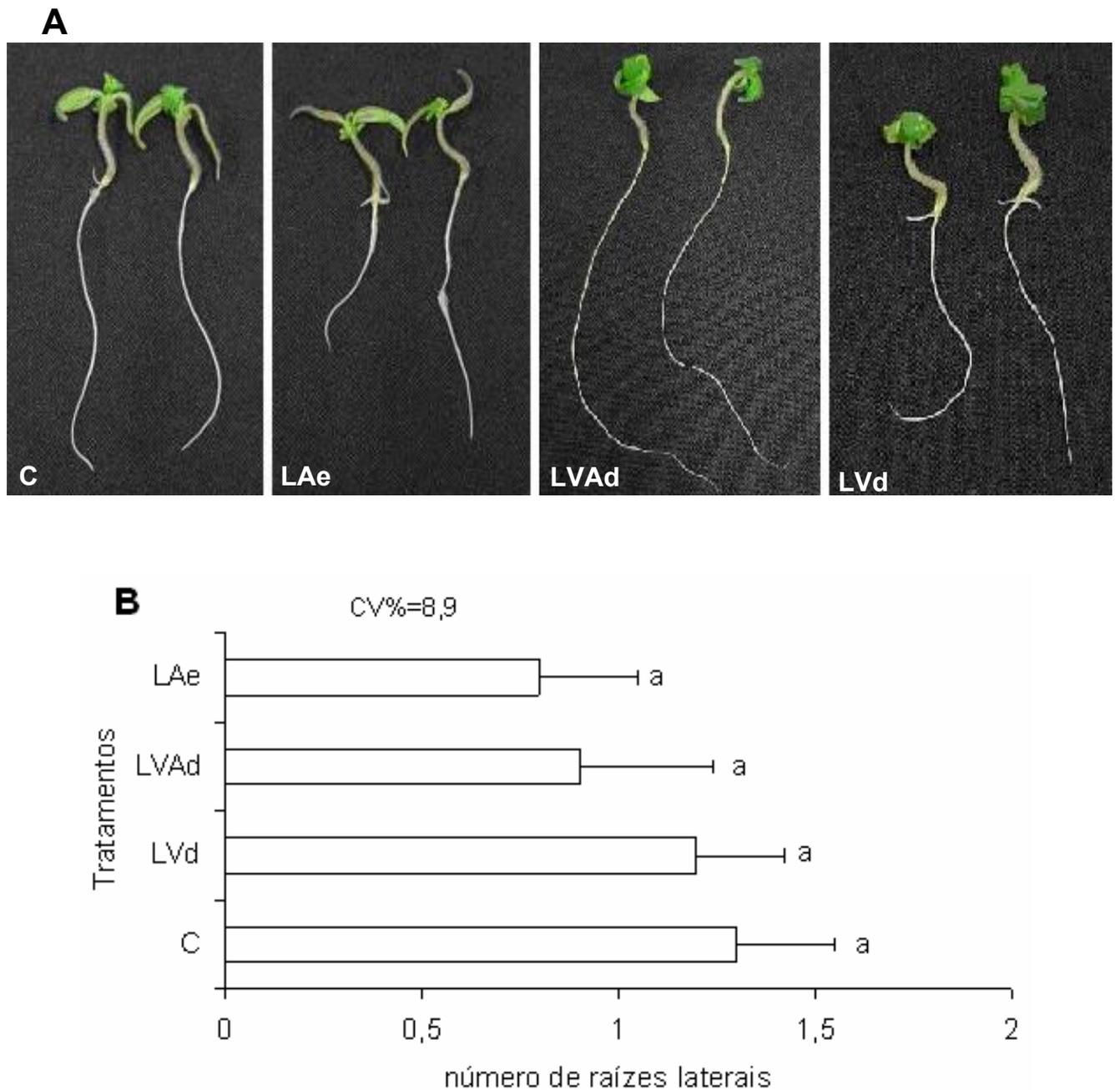


Figura 15. A: Microplantas de tomateiro *diageotropico* (*dgt* BC5F3) com gene defectivo para resposta à auxina, crescidas em meio MS nas concentrações de 0 (controle) e 40 mg AH L⁻¹. C: controle, LAe: Latossolo Amarelo eutrófico, LVAd: Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico e LVd: Latossolo Vermelho distrófico; **B:** Número de raízes laterais emergidas em tomateiro *dgt* BC5F3. Dados representam à média de cinco plantas ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste DMS P<0,05.

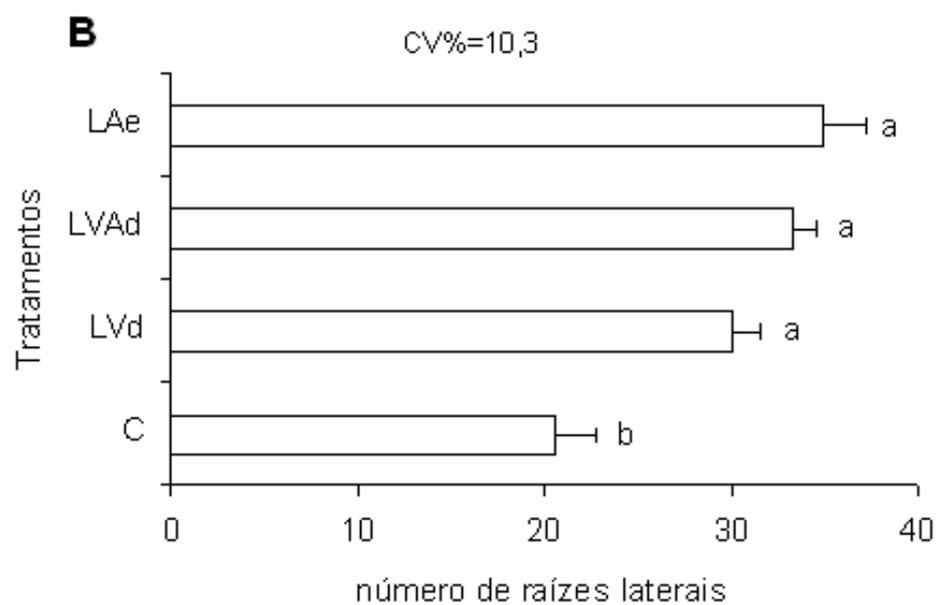
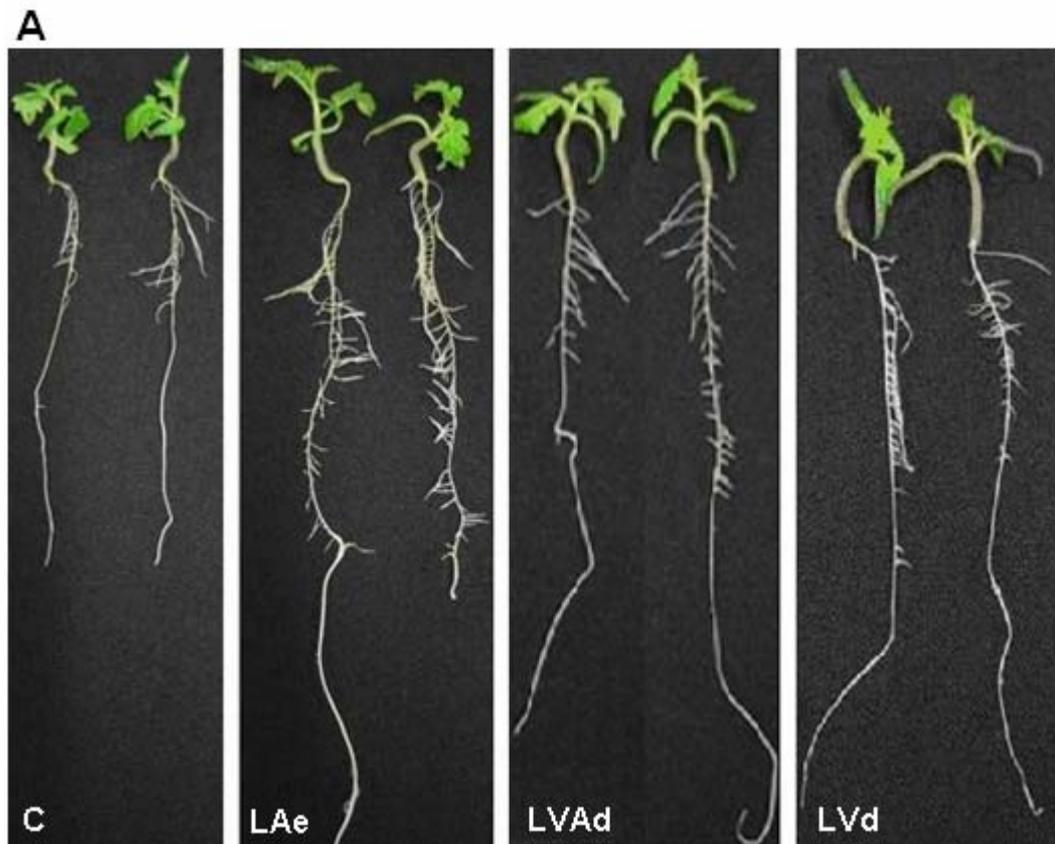


Figura 16. **A:** Microplantas de tomateiro não mutado (cv Micro-Tom) crescidas em meio MS nas concentrações de 0 (controle) e 40 mg AH L⁻¹. C: controle, LAe: Latossolo Amarelo eutrófico, LVAd: Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico e LVd: Latossolo Vermelho distrófico; **B:** Número de raízes laterais emergidas em tomateiro cv Micro-Tom. Dados representam à média de cinco plantas ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste DMS P<0,05.

Dessa forma, as biomoléculas podem ser incorporadas ao conceito de SH uma vez que, de acordo com Piccolo (2002), podem estar preservadas do ataque microbiano dentro dos domínios hidrofóbicos da associação supramolecular ou, ainda, estar associadas por interações fracas a outras unidades estruturais que formam o agregado húmico. Esses fragmentos biomoleculares podem apresentar um papel central no estímulo do crescimento vegetal que as SH apresentam.

A presença de agentes de promoção de crescimento de natureza bioquímica individual (e.g. análogos de auxina) preservada nos domínios hidrofóbicos da associação supramolecular ou estabilizado por interações de natureza fraca pode justificar os efeitos fisiológicos da matéria orgânica humificada, uma vez que Simpson (2002) observou, de modo inequívoco, a desagregação do arranjo supramolecular com a adição de ácido orgânico de cadeia curta. A exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes pode, então, desmontar a, aparentemente, complicada estrutura das SH e liberar compostos similares às auxinas, que, ao acessarem receptores externos à célula, desencadeiam a mudança na arquitetura radicular. A promoção na síntese de H⁺-ATPase nas membranas plasmáticas observadas por Canellas e colaboradores (2002) pode concorrer para a energização dos canais transportadores de ácidos orgânicos presentes nas membranas, cujos genes foram recentemente clonados (Parry & Estelle, 2006). A ativação do transporte de H⁺ pela bomba é importante para a hiperpolarização da membrana e esse feito pode ativar a abertura dos canais de ânions, facilitando a passagem pelo canal através do balanço positivo de cargas, ou, ainda, no caso do co-transporte, energizar diretamente todo o processo.

Tomados em conjunto os dados obtidos de estímulo no enraizamento de *Arabidopsis*, pela matéria orgânica humificada e pelo extrato metanólico-hexânico, isolados dos diferentes Latossolos brasileiros e ausência desse estímulo no mutante (*dgt*), da cultivar miniatura de tomate, é possível indicar a presença de um mecanismo geral, relacionado ao estímulo típico das respostas obtidas com hormônios vegetais.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A elucidação das relações entre a eletroquímica, reatividade e a atividade biológica da matéria orgânica humificada dos Latossolos pode contribuir para o manejo dos mesmos dentro da perspectiva de sustentabilidade. As propriedades eletroquímicas dos horizontes superficiais dos solos altamente intemperizados são correlacionadas, geralmente, com o conteúdo de matéria orgânica nessa camada. No entanto, são relativamente escassos os estudos com objetivo de avaliar essa complexa relação. Informações estruturais sobre as substâncias húmicas solúveis são essenciais para o entendimento da sua natureza e, conseqüentemente, da sua reatividade.

A idéia de que as substâncias húmicas podem atuar no metabolismo vegetal não é recente. A presença de um sistema radicular ramificado com grande abundância de raízes laterais é fundamental para o crescimento de plantas em solos altamente intemperizados. O maior volume de solo explorado é uma adaptação importante no caso de solos com baixo conteúdo de nutrientes e CTC. A partir dos resultados, concluiu-se que:

- i. As propriedades eletroquímicas do horizonte superficial dos Latossolos foram grandemente afetadas pela retirada das substâncias húmicas alcalino solúveis que representaram menos de 3% do carbono total do solo. Foram observadas reduções na CTC, elevação do PESN e reversão do sinal do potencial elétrico da superfície. Esses efeitos foram de maior magnitude para os solos de natureza oxídica do que caulínica, indicando uma relação substância

húmica - constituição mineralógica no comportamento das propriedades eletroquímicas.

ii. A capacidade da dupla camada elétrica (CDCE) foi correlacionada com o conteúdo de carbono no solo, com o conteúdo de SH. Sua variação após a retirada da MO solúvel foi acentuada. A remoção de substâncias húmicas solúveis com elevada densidade de carga reduziu o poder tampão de cargas do solo.

iii. Devido à sua sensibilidade à variação dos teores de carbono e à remoção das substâncias húmicas, a CDCE é uma propriedade eletroquímica que, além discriminar bem seqüências pedoquímicas, pode ser usada como indicadora do processo de degradação oriundo da perda de matéria orgânica alcalino solúvel.

iv. A retirada de menos de 3 % do carbono contido na fração alcalino-solúvel de Latossolos afeta, marcadamente, seu comportamento químico. Portanto, as substâncias húmicas solúveis condicionam a reatividade desses solos;

v. Através das análises químicas e espectroscópicas das SH solúveis e do extrato hexânico-metanólico, conclui-se que estes compostos possuem estruturas diferenciadas. De um modo geral, Latossolos com maiores índices de intemperização possuem SH com maior grau de humificação.

vi. Os ácidos húmicos, fúlvicos e o extrato metanólico-hexânico obtidos do horizonte superficial de sete Latossolos brasileiros apresentam capacidade de modificar a arquitetura do sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*, induzindo o aumento no número de raízes laterais e ramificação radicular.

vii. As mudanças observadas na arquitetura radicular são típicas das normalmente observadas com o uso de ácido indolacético (AIA), porém superiores às respostas observadas com AIA 10^{-6} mol L⁻¹. A incapacidade de diferentes ácidos húmicos induzir o enraizamento lateral no mutante defeitivo para sinalização de auxina (*dgt*) de tomateiro fortalece a hipótese da atividade análoga à auxina desta SH solúvel.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, J.J., Schindler, J.E., Miller, R.W. (1974) Elemental mercury evolution mediated by humic acid. *Science*, 184: 895-896.
- Alleoni, L.R.F., Camargo, O.A. (1994) Pontos de efeito salino nulo de Latossolos Ácricos. *Rev. Bras. Ci. Solo*. 18: 175-180.
- Alvarez-Puebla, R.A., Goulet, P.J., Garrido, J.T. (2005) Characterization of the porous structure of different humic fraction. *Colloids and Surfaces A*. 256: 129-135.
- Anjos, L.H.C. (1985) *Caracterização, gênese, classificação e aptidão agrícola de uma seqüência de solos do Terciário na região de Campos, RJ*. Tese (mestrado em Ciências - área de Ciência do Solo) Itaguaí - RJ, UFRRJ, 110p.
- Bailey, S.I., Ritchie, I.M., Hewgill, F.R. (1983) The construction and use of potential-pH diagrams in organic oxidation-reduction reactions. *J. Chem. Soc., Perkins Trans. 2*: 645-652.
- Baldotto, M.A., Canellas, L.P., Canela, M.C., Velloso, A.C.X. (2005) 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: Canellas & Santos, p. 201-223.
- Baldotto, M.A., (2006) *Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos*. Tese (doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, UENF, 100p.
- Barreto, W.O. (1986) *Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: capacidade da dupla camada elétrica*. Tese (Doutorado em Agronomia) - Itaguaí - UFRRJ, 294p.

- Bartlett, R.J., James, B.R. (1993) Redox chemistry of soils. *Adv. Agron.* 50: 151-208.
- Benites, V.M., Mendonça, E.S. (1998) Propriedades eletroquímicas de um solo eletropositivo influenciadas pela adição de diferentes fontes de matéria orgânica. *Rev. Bras. Ci. Solo.* 22: 215-222.
- Bérubé, Y. C., De Bruyn, P.L. (1968a) Adsorption at the rutile-solution interface. I. Thermodynamic and experimental study. *J. Colloid Interf. Sci.*, 27 (2): 305-318.
- Blok, L., De Bruyn, P.L. (1970a) The ionic layer at the ZnO/solution interface. I. The experimental point of zero charge. *J. Colloid Interf. Sci.* 32 (3): 518-526.
- Borges, A.L. & Kiehl, J.C. (1996) Alteração da matéria orgânica de um Latossolo Amarelo álico de Cruz das Almas (BA) pelo cultivo com frutíferas perenes e mandioca. *R. Bras. Ci. Solo*, 20:313-318.
- Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic-promotion substances auxinones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. *Roy. Soc. Proc., B.* London. 89: 481- 507.
- Breeuwsna, A., Lyklema, J. (1973) Physical and chemical adsorption of ions in the electrical double layer on hematite ($\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$). *J. Colloid and Interface Sci.*, 43 (2): 437-448.
- Camargo, F.O., Santos, G. De A., Guerra, J.G.M. (1999) Macromoléculas e substâncias húmicas. *In: Santos, G. de A.; Camargo, F.A.O. (eds.) Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais.* Porto Alegre: Gênese, p. 27-39.
- Canellas, L.P., Santos, G.A., Amaral Sobrinho, N.M.B. Reações da matéria orgânica. *In: Santos, G. de A.; Camargo, F.A.O. (eds.) (1999) Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais.* Porto Alegre: Gênese, p. 69-86.
- Canellas, L.P., Berner, P.G., Silva, S.G. Da; Silva, M.B. E & Santos, G.A. (2000) Frações da matéria orgânica em seis solos de uma topossequência no Estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, 35:133-143.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Façanha, A.L.O., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H^+ -ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 130: 1951-1957.
- Canellas, L.P., Santos, G.A. (eds.) (2005) *In: Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas.* Campos dos Goytacazes: L.P. Canellas, G.A. Santos, 309p.
- Chaves, L.H.G., Trajano, M.D.M. (1992) Determinação do ponto de carga zero e das cargas elétricas do horizonte Ap de solos do Estado da Paraíba. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 16: 415-418.

- Charlet, L., Sposito, G. (1987) Monovalent ion adsorption by an Oxisol. *Soil Sci. Am. J.*, 51: 1155-1160.
- Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. (1977) Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 41: 352-358.
- Chen, J., Gu, B., Royer, R.A., Burgos, W.D. (2003) The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric ion. *Sci. Total Environment*, 307: 167-178.
- Cheshire, M.V. & Senesi, N. (1998) Electron spin resonance spectroscopy of organic and mineral soil particles. In: Huang, P. M.; Senesi, N. & Bufle, J. (eds.). *Structure and surface reactions of soil particles*. New York: Wiley. 492p.
- Ching, Y.P., Aiken, G., O'Loughlin, E. (1994) Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 28: 1853-1858.
- Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E. (1964) *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Academic Press New York. 510p.
- Conte, P.; Piccolo, A. (1999) Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 1682-1690.
- Cosgrove, D.J. (1998) Cell Wall Loosening by expansins, *Plant Physiology*, 118:333-339.
- Cosgrove, D.J. (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:109-124.
- Curtin, D., Wen, G. (1999) Organic matter fractions contributing to soil nitrogen mineralization potential. *Soil Science Soc. Am. J.*, 63: 410-415.
- Dabin, B. (1981) Les matières organiques dans les sols tropicaux normalement drainés. *Cah. ORSTOM*, Ser. Pedol., Paris, 16 : 197-215.
- De Jonge, H., De Jonge, L.W., Mittelmeijer-Hazeleger, M.C. (2000) The microporous structure of organic and mineral soil material. *Soil Science*, 165: 99-108.
- Dewan, H.C. & Rich, C.I. (1970) Titration of acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34: 38-44.
- Embrapa - Centro Nacional de Levantamento e Classificação de Solos. (1980). Rio de Janeiro: EMBRAPA, BT nº 62.
- Embrapa. (1997) *Manual de métodos de análise de solo*. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPS (Documentos 1), 2.ed. 212p.

- Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Solos. (1999) *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. EMBRAPA Produção de Informação. Rio de Janeiro: 412p.
- Façanha, A.R., Façanha, A.R., Olivares, F.L., Velloso, A.C.X., Braz-Filho, R., Santos, G.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37: 1301-1310.
- Flaig, W. (ed.) (1968) *Uptake of organic substances from soil organic matter by plants, study week on organic matter and soil fertility*, New York: Wiley-Interscience, 723-776.
- Fontes, M.P.F. (1996) Carga elétrica superficial de partículas de solo. CD-ROM dos *Anais do Congresso Latinoamericano de Ciência do Solo*, 13 - Sociedade Latinoamericana de Ciência do Solo - Águas de Lindóia, SP, Brasil.
- Fontes, M.P.F., Camargo, O.A., Sposito, G. (2001) Eletroquímica das partículas coloidais e sua relação com a mineralogia de solos altamente intemperizados. *Scientia Agricola*, 58: 627-646.
- Forde, B.G., Zhang, H. (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture, *Science* 279: 407-409.
- Frias, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, A., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8: 1533-1544.
- García-Gil, J.C., Ceppi, S.B., Velasco, M.I., Polo, A., Senesi, N. (2004) Long-term effects of amendment with municipal solid waste compost on the elemental and acidic functional group composition and pH-buffer capacity of soil humic acids. *Geoderma*, 121: 135-142.
- Garcia-Mina, J.M., Antolin, M.C., Sanchez-Diaz, M. (2004) Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: a study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant and Soil*, 258: 57-68.
- Gouy, G. (1910) Sur la constitution de la charge electric a la surface d'un electrolyte. *Ann. Phys.*, 9: 457-468.
- Grahame, D.C. (1947) The electrical double layer and the theory of eletrocapillarity. *Chem. Rev.*, 41: 441-501.
- Greg, S.J., Sing, K.S.W. (ed.) (1982) *Adsorption Surface Area and Porosity*, 2nd. ed., London: Academic Press, INC., 303p.
- Gu, B.J., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L., Mccarthy, J.F. (1994) Adsorption and desorption of different organic matter fractions on iron oxide: mechanisms and models. *Environm. Sci. Technol.* 28: 38-46.

- Helburn, R.S., Maccarthy, P. (1994) Determination of some redox properties of humic acids by alkaline ferricyanide titration. *Anal. Chem Acta.*, 295: 263-272.
- Hendershot, W.H., Lavkulich, L.M. (1978) The use of zero point of charge (ZPC) to assess pedogenic development. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42: 468-472.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: www.ibge.gov.br em 25/07/2006.
- Jacquin, F.; Vong, P.G. (1989) Incorporation of nitrogen fertilizer in the humified compounds of a typic Hapludalf. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 465-469.
- Kaiser, K., Zech, W. (1999) Release of natural organic matter sorbed to oxides and subsoil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63: 1157-1166.
- Kelly, M.O., Bradford, K.J. (1986) Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. *Plant Physiology*, 82: 713-717.
- Kepinski, S., Leyser, O. (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 446-451.
- Kononova, M.M. (ed.) (1966) *Soil organic matter*. 2nd ed. New York: Pergamon Press. 555p.
- Kononova, M.M. (ed.) (1982) *Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona: Oikos-Tou. 365p.
- Kononova, M.M. (1984) Organic Matter and soil fertility. *Soviet Soil Sci.*, 16: 71-86.
- Lakatos, B., Tibai, T., Meisel, J. (1977) EPR Spectra of humic acids and their metal complexes. *Geoderma*, 19: 319-338.
- Leinweber, P.; Reuter, G.; Brozio, K. (1993) Cation exchange capacities of organo-mineral particle-size fractions in soils from long-term experiments. *J. Soil Sci.*, 44: 111-119.
- Light, T. S. (1972) Standard solution for redox potential measurements. *Analytical Chemistry*, 44: 1038-1039.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 280-287.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C. (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382: 445-448.

- Lovley, D.R., Woodward, J.C., Blunt-Harris, E.L., Hayes, L., Phillips, E.J.P., Coates, J.D. (1998) Humic substances as mediator for microbially-catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 26: 152-157.
- Lu, X., Johnson, W.D., Hook, J. (1998) Reaction of vanadate with aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 2257-2263.
- Lyklema, J. And Overbeek, J. Th. G. (1961) Electrochemistry of Silver Iodide. *J. Colloid Science*, 16: 595-608.
- Martin Neto, L., Vieira, E.M., Sposito, G. (1993) Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 1867-1873.
- Matthiessen A. (1994) Evaluating the redox capacity and the redox potential of humic acids by redox titrations. In: Senesi, N. & Miano, T.M. (eds.). *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Amsterdam: Elsevier, 187.
- Matthiessen, A. (1996) kinetic aspects of the reduction of mercury ions by humic substances. *J. Anal. Chem.*, 354: 747-749.
- Mendonça, E.S. (1995) Oxidação da matéria orgânica e sua relação com diferentes formas de alumínio de Latossolos. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 19: 25-30.
- Mendonça, E.S., Rowell, D.L. (1996) Mineral and organic fractions of two oxisols and their influence on effective cation-exchange capacity. *Soil Science Society of America Journal*, 60: 1888-1892.
- Mendonça, E.S., Rowell, D.L., Martins, A.G., Silva, A.P. (2006) Effect of pH on the development of acidic sites in clayey and sandy loam Oxisol from the Cerrado Region, Brazil. *Geoderma*, 132: 131-142.
- Mercê, A.L.R., Lombardi, S.C., Mangrich, A.S., Levy, N.M., Szpoganicz, B. (1998) *J. Braz. Chem. Soc.*, 9: p. 231-242.
- Milori, D. M.B.P., Martin Neto, L., Bayer, C., Mielniczuck, J., Bagnato, V.S. (2002) Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, 167: 739-749.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., Nardi, S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 1199-1201.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15: 437-497.
- Nannipieri, P., Grego, S., Dell'agnola, G., Nardi, S. (1993) Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica. In: Nannipieri, P. (ed.). *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici y selvicolturali*. Bologna: Patron, 67-78.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Gessa, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G. (2000) A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 415-419.
- Nardi, S., L'osoni, M., Pizzeghello, D., Provenzano, M.R., Cilenti, A., Sturaro, A., Rella, R., Vianello, A. (2005) Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. *Soil Sci. Soc. Am.*, 369: 312-2019.
- Oades, J.M., Gillman, G.P., Uehara, G., Hue, N.V., Van Noordwijk, M., Robertson, G.P., Wada, K. (1989) Interactions of soil organic matter and variable-charge clays. In: Coleman, D.C., Oades, J.M., Uehara, G. (eds.). *Dynamics of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems*. Honolulu: University of Hawaii Press, 69-95.
- Olphen, H. van. (ed.) (1977) *An introduction to clay colloid chemistry*. New York: John Wiley & Sons INC., 318 p.
- Oorts, K., Vanlauwe, B. Merckx, R. (2003) Cation exchange capacities of soil organic matter fractions in a Ferric Lixisol with different organic matter inputs. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 100: 161-171.
- Ortega, F. (ed.) (1982) *La matéria orgánica de los suelos tropicales*. La Habana: Academia de Ciências de Cuba, 152p.
- Österberg, R., Shirshova, L. (1997) Oscillating, nonequilibrium redox properties of humic acids. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61: 4599-4604.
- Parks, G. A. & Bruyn, P. L. (1962) The zero point of charge of oxides. *J. of Phys. Chem.*, 66:967-973.
- Parks, G.A. (1965) The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems. *Chem. Rev.*, 65: 177-198.
- Parry, G., Estelle, M. (2006) Auxin receptors: a new role for F-box proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 18:152-156.
- Peixoto, R. T. dos G. (1997) Matéria orgânica e a dinâmica das cargas elétricas dos solos: processos e conseqüências. CD-ROM dos *Anais do Congresso Brasileiro de Ciência do Solo*, 26, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/EMBRAPA-CNPS.
- Peres, L.E.P., Carvalho, R.F., Pino-Nunes, L.E., Lima, J.E., Pioto, F.A. (2004) A collection of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) mutants useful to study the multiple hormonal control of plant development. CD-ROM In: *18TH International Conference on Plant Growth Substances*, Canberra-Australia: IPGSA Conference.
- Pérez, D.V., Ramos, D.P., Nascimento, R.A.M., Barreto, W.O. (1993) Electrochemical properties of some B argillic horizon. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 17: 157-164.

- Peuravarouri, J., Pihlaja, K. (2004) Preliminary estudy of lake dissolved organic matter in light of nanoscale supramolecular assembly. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 5958-5967.
- Piccolo, A.; Nardi, S.; Cancheri, G. (1996) Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.*, 47: 319-328.
- Piccolo, A. (1997) New Insights on the conformational structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. In: Drozd, J; Gonet, S.S., Senesi, N.; Weber, J. (eds). *The role of humic substances in the ecosystems and in environmental protection*. Wroclaw, Polish Society of Humic Substances, p. 19-38.
- Piccolo, A.; Conte P.; Cozzolino, A. (1999) Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular associations of dissolved humic substances. *Eur. J. Soil Sci.*, 50: 687-694.
- Piccolo, A. (2002) The Supramolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Adv. Agron.*, 75: 57-134.
- Piccolo, A.; Conte, P.; Trivellone, E.; Van Lagen, B.; Buurman, P. (2002) Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by Pyr-GC-MS and H-1-NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 76-84.
- Piccolo, A.; Conte, P.; Spaccini, R.; Chiarella, M. (2003) Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biol. Fert. Soils*, 37: 255-259.
- Pino-Nunes L.E. (2005) *Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (Lycopersicon esculentum cv Micro-Tom)*. Tese (mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Piracicaba - SP, Esalq-USP, 73p.
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Varanini, Z. (1995) Effect of soil humic substances on surface redox activity of oat roots. *Journal of Plant Nutrition* 18: 2111-2120.
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Agnolon, F., Varanini, Z. (1999) Water extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe deficient cucumber plants. *Plant and Soil*, 210: 145-157.
- Pizzeghello, O., Nicolini, G., Nardi, S. (2001) Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvaticae* forests. *New Phytologist*, 151: 647-657.
- Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 55: 803-813.

- Raij, B. van., Peech, M. (1972) Electrochemical properties of some Oxisols and Alfisols of the tropics. *Soil Sci. Soc. of Am. Proc.*, 36: 587-593.
- Raij, B. van. (1973a) Determinação de cargas elétricas em solos. *Bragantia*, 32: 171-183.
- Raij, B. van. (1973b) Determinação do ponto de carga zero em solos. *Bragantia*, 32: 337-347.
- Rayle, D. L., Cleland, R. E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99:1271-1274.
- Resende, M., Curi, N., Rezende, S. B., Corrêa, G. F. (eds.) (1997) *Pedologia: base para a distinção de ambientes*. Viçosa: NEPUT, 367 p.
- Rice, J.A., Macarthy, P. (1991) Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, 17: 635-648.
- Rocha, J.C e Rosa, A.H. (eds.) (2003) *Substâncias húmicas aquáticas - Interação com espécies metálicas*. São Paulo: UNESP, 120p.
- Rodrigues, T.E., Klant, E. (1978) Mineralogia e gênese de uma seqüência de solos do distrito federal. *Rev. Bras. Ci. Solo.*, 2: 132-139.
- Santa-Isbel, L.M. (1988) Caracterização e algumas relações pedogenéticas da matéria orgânica de uma toposseqüência de solos em região de clima semi-árido de Itaberaba-BA. Tese (mestrado em geociências). Salvador - BA, UFBA, 87p.
- Santos, G. de A., Camargo, F.A.O. (eds.) (1999) *Fundamentos da matéria orgânica: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, 491 p.
- Sarwar M, Arshad M, Martens Da, Frankenberger, W.T. (2002) Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant and Soil*, 147 (2): 207-215.
- Sarwar M, Kremer R.J. (1995) Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology* 20 (5): 282-285.
- Schnitzer, M., Gupta, U.C. (1965) Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Am. Soc. Proc.*, 29: 274-277.
- Schnitzer, M.; Khan, S.U. (eds.) (1978) *Soil organic matter*. Amsterdam: Elsevier, 319p.
- Schnitzer, M. (1991) Soil organic matter-the next 75 years. *Soil Sci.* 151: 41-58.
- Schofield, R. K. (1949) Effect of pH on electric charges carried by clay particles. *J. Soil Sci.*, 1: 1-8.

- Scott, D.T., Mcknight, D.M., Harris, E., Kolesar, S., Lovley D. (1998) Quinone moieties act as electron acceptors in the reducing of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol*, 32: 2984-2989.
- Senesi N., Miano, T.M., Provenzano, M.R., Brunetti, G. (1991) Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.*, 152: 259-271.
- Sillen, L.G., Martell, A.E. (eds.) (1964). *Stability constants of metal-ion complexes*. 2. ed., London: Chemical Society Special Publication 17, 754p.
- Silva, M.L.N.; Curi, N.; Marques, J. J. G. De S. E M.; Guilherme, L. R. G. & Lima, J.M.de. (1996) Ponto de efeito salino nulo e suas relações com propriedades mineralógicas e químicas de Latossolos brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31: 663-671.
- Simpson, A.J. (2002) Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organica matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Res. Chem.*, 40: 572-582.
- Sparks, D.L. (2001) Elucidating the fundamental chemistry of soils: past and recent achievements and future frontiers. *Geoderma*, 100: 303-319.
- Siqueira, C. (1985) *Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: efeitos da matéria orgânica*. Tese (Doutorado em Ciências – área de Ciência do Solo) Itaguaí – RJ, UFRRJ, 113 p.
- Siqueira, C., Leal, J.R., Velloso, A.C.X., Santos, G.A. (1990a) Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: I. Influência da matéria orgânica no tempo de equilíbrio para a determinação das curvas de titulação potenciométrica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 14: 7-11.
- Siqueira, C., Leal, J.R., Velloso, A.C.X., Santos, G.A. (1990b) Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: II. Quantificação do efeito da matéria orgânica sobre o ponto de carga zero. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 14: 13-17.
- Siqueira, C., Leal, J.R., Velloso, A.C.X. (1990c) Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: III. Erros na avaliação das cargas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 14: 19-24.
- Skorgerboe, R.K., Wilson, S.A. (1981) Reduction of ionic species by fulvic acid. *Anal. Chem.*, 53: 228-232.
- Sommerville, C.R., Meyerowitz, E.M. (eds.) (2002) *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists, 320p.
- Sondergaard, T.E., Schulz, A., Palmgren, M.G. (2004) Energization of Transport Processes in Plants. Roles of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 136: 2475-2482.

- Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G. (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. *Plant Cell*, 17: 1343-1359.
- Sposito, G. (1981) The operational definition of the zero point of charge in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45: 292-297.
- Sposito, G. (ed.) (1989a) *The Chemistry of Soil*. New York: Oxford Univ. Press, 277 p.
- Sposito, G. (1989b) Surface reactions in natural aqueous colloidal systems. *Chimia*, 43: 169-176.
- Sposito, G. (1998) On points of zero charge. *Environ. Sci. & Technol.*, 32: 2815-2819.
- Stern, O. (1924) Zur theorie der elektrolytischen doppelschicht. *Z. Electrochem.*, 30: 508-516.
- Stevenson, J.F. (ed.) (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed., New York: John Wiley & Sons INC., 496p.
- Struyk, Z.; Sposito, G. (2001) Redox properties of standard humic acids. *Geoderma*, 102: 329-346.
- Stumm, W. (1992) *Chemistry of the solid-water interface*. John Wiley & Sons, INC., New York: W. Stumm ed., 428 p.
- Sunda, W.G., Kieber, D.J. (1994) Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low molecular-weight organic substrates. *Nature*, 367: 62-65.
- Sutton, R., Sposito, G. (2005) Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental science and technology*, 39 (23): 9009-9015.
- Szilágyi, M. (1971) Reduction of Fe³⁺ ion by humic acid preparations. *Soil Sci.*, 111: 233-235.
- Szilágyi, M. (1973) The redox properties and the determination of the normal potential of the peat-water system. *Soil Sci.*, 115: 434-437.
- Szilágyi, M. (1974) Valency changes of metal ions in the interaction with humic acids. *Fuel*, 53: 26-28.
- Tan, K.H. (2003) *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies*. New York basel, New York: Marcel Dekker, INC., 386p.
- Thompson, M.L., Zhang, H., Kazemi, M., Sandor, J.A. (1989) Contribution of organic matter to cation exchange capacity and specific surface area of fractionated soil materials. *Soil Sci.* 148: 250-257.

- Torrey, J.G. (1986) Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. *Developments in plant and soil sciences*, Kluwer, 20: 31-66.
- Uehara, G. (1978) The chemistry and physics of low acidity clays. *In: International Soil Classification Workshop*, Rio de Janeiro: EMBRAPA-SNLCS, p. 21-26.
- Uehara, G., Gillman, G. (1980) Charge characteristics of soils with variable and permanent charge minerals I. Theory. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 250-252.
- Uehara, G., Gillman, G.P. (1981) *The mineralogy, chemistry and physics of tropical soils with variable charge clays*. Boulder: Westview Press, 170p.
- Vaughan, D., Malcolm, R. E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological processes. *In: Vaughan, D. & Malcolm, R. E. (eds.) Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Martins Nijhoff Dr W. Junk Publisher, p.37-75.
- Velloso, A.C.X., Leal, J.R., Oliveira, C. de. (1993) Propriedades redox em Glei Húmico do Estado do Rio de Janeiro: II. Avaliação pelo parâmetro $p_e + pH$. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 17: p. 23-26.
- Velloso, A.C.X. (2002) *Mineralogia e química de superfície*. Apostila de lecionação do curso Mineralogia e Química de Superfície. UENF, 122p.
- Visser, S.A. (1982) Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Rev. Fr. Sci. Eau*, 1: 285-295.
- Volkoff, B., Cerri, C.C., Melfi, A.J. (1984) Húmus e mineralogia dos horizontes superficiais de três solos de campos de altitude dos estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 8: 277-283.
- Volkoff, B., Cerri, C.C. (1988) L'humus des sols du Brésil: nature et relation avec l'environnement. *Cah. ORSTOM, Ser. Ped.* 24 (2): 83-95.
- Wershaw, R.L. (1993) Model for humus in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 27:814-816
- Wilson, S.A., Weber, J.H. (1979) An EPR study of the reduction of vanadium (V) to vanadium (IV) by fulvic acid. *Chem. Geol.*, 26: 335-345.
- Yagi, R., Ferreira, M.E., Cruz, M.C.P. da., Barbosa, J.C. (2003) Organic matter fractions and soil fertility under the influence of liming, vermicompost and cattle manure. *Sci. Agric.*, 60: 549-557.
- Yeomans, J.C., Bremner, J.M. (1988) A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 19: 1467-1476.

- Zandonadi, D.B. (2006) *Bioatividade de Substâncias Húmicas: Promoção do desenvolvimento radicular e Atividade das Bombas de H⁺*. Tese (mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, UENF, 160p.
- Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A., Schroth, G. (1997) Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79: 117-161.
- Zhang, F.S., Zhang, X.N., Yu, T.R. (1991) Reactions of hydrogen ions with variable charge soils: I. mechanisms of reaction. *Soil Sci.*, 151: 436-443.

APÊNDICE

Quadro 11: Principais atributos químicos dos Latossolos estudados

Solos	Complexo sortivo (cmol.kg ⁻¹)								Ataque por H ₂ SO ₄ e Na ₂ CO ₃ (%)											
	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Valor S	Al ⁺⁺⁺	H ⁺	Valor V	P (ppm)	C (%)	N(%)	C/N	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	P ₂ O ₅	MnO	Kr	Al ₂ O ₃ /Fe ₂ O ₃
LAe	0,95	0,22	0,03	0,01	1,21	0,13	1,90	58,50	3,00	0,86	0,09	9,56	14,25	11,80	2,95	0,61		0,07	1,80	4,00
LBdf	1,00	0,20	0,48	0,06	1,70	3,90	3,00	15,50	1,50	4,30	0,39	11,02	21,75	20,95	18,40	3,03	0,18	0,09	1,13	1,14
LVj	0,65	0,35	0,08	0,03	1,10	0,15	0,88	11,00	-	1,28	0,18	7,11	1,00	14,40	54,85	2,12	-	-	0,04	0,26
LVA_d	0,40	0,30	0,07	0,06	0,83	1,20	0,97	4,00	8,00	2,95	0,33	8,94	16,60	18,50	10,00	2,36	-	-	1,13	1,85
LVwf	0,85	0,25	0,55	0,08	1,73	1,10	4,70	14,50	1,50	1,07	0,20	5,35	26,40	20,60	19,80	1,35	0,20	0,08	1,53	1,04
LVA_{df}	1,20	0,70	0,14	0,04	1,68	1,30	3,10	17,00	-	1,25	0,16	7,80	15,50	17,20	18,50	1,18	-	-	1,25	0,93
LV_d	0,60	0,40	0,09	0,02	1,11	0,80	3,30	5,00	1,00	2,54	0,12	21,20	13,80	32,40	12,70	0,81	0,07	-	0,58	2,55