

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Solos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Manual de Métodos de Análise de Solo

3ª edição revista e ampliada

*Paulo César Teixeira
Guilherme Kangussu Donagemma
Ademir Fontana
Wenceslau Geraldes Teixeira*
Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Solos

Endereço: Rua Jardim Botânico, 1024. Jardim Botânico

CEP: 22460-000 - Rio de Janeiro, RJ

Fone: + 55 (21) 2179-4500

Fax: + 55 (21) 2179-5291

<https://www.embrapa.br>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Solos

Comitê de Publicações da Embrapa Solos

Presidente: *José Carlos Polidoro*

Secretária-Executiva: *Jacqueline Silva Rezende Mattos*

Membros: *Ademar Barros da Silva, Adriana Vieira de C. de Moraes, Alba Leonor da Silva Martins, Enyomara Lourenço Silva, Evaldo de Paiva Lima, Joyce Maria Guimarães Monteiro, Luciana Sampaio de Araujo, Maria Regina Laforet, Maurício Rizzato Coelho, Moema de Almeida Batista, Wenceslau Geraldes Teixeira*

Supervisão editorial: *Jacqueline Silva Rezende Mattos*

Normalização bibliográfica: *Luciana Sampaio de Araujo*

Editoração eletrônica: *Jacqueline Silva Rezende Mattos*

Capa: *Eduardo Guedes de Godoy*

Revisão de texto: *André Luiz da Silva Lopes e
Marcos Antônio Nakayama*

3ª edição

Publicação digitalizada (2017)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Solos

Manual de métodos de análise de solo / Paulo César Teixeira ... [et al.], editores técnicos. – 3. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2017.

574 p. : il. color.

ISBN 978-85-7035-771-7

1. Análise do solo. 2. Física do solo. 3. Química do solo. 4. Matéria orgânica. 5. Mineralogia. I. Teixeira, Paulo César. II. Donagemma, Guilherme Kangussu. III. Fontana, Ademir. IV. Teixeira, Wenceslau Geraldes. V. Embrapa Solos.

CDD 631.40202

— Capítulo 6 —

FRACIONAMENTO QUÍMICO DA MATÉRIA ORGÂNICA

Vinícius de Melo Benites

Pedro Luiz Oliveira de Almeida Machado

Beata Eموke Madari

Ademir Fontana

6.1 Introdução

Tradicionalmente, o húmus foi dividido em três frações: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e huminas, como frações operacionalmente definidas da matéria orgânica do solo, com base nas características de solubilidade dos compostos orgânicos. A cada uma dessas frações foram atribuídas características físico-químicas que definiriam sua qualidade e função no solo. Pesquisas mais recentes, incluindo o desenvolvimento de novas técnicas moleculares e analíticas (Simpson et al., 2007), contribuíram para o avanço do conhecimento sobre a composição da matéria orgânica do solo. A maioria do material húmico definido operacionalmente nos solos, tanto nas frações extraíveis (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos) quanto nas huminas, é uma mistura muito complexa de biopolímeros microbianos e vegetais e seus produtos de degradação, mas não são categorias químicas distintas (Kelleher e Simpson, 2006; Simpson et al., 2007). As proporções das várias classes de compostos e estruturas individuais dentro dessas classes refletem, em grande medida,

a composição química dentro do microambiente específico do solo (Simpson et al., 2007).

O fracionamento em base de solubilidade das soluções aquosas oferece informação útil sobre a matéria orgânica, entretanto, a interpretação dos resultados deve ser feita levando em consideração os avanços recentes na caracterização da matéria orgânica. Assim, as avaliações e estudos das frações húmicas têm sido utilizados na avaliação da mudança de manejo, uso ou da qualidade do ambiente (Cunha et al., 2005) ou, ainda, como proposta para a classificação taxonômica dos solos brasileiros como característica diferencial (Fontana et al., 2010; Valladares et al., 2007). Essas avaliações têm por base a distribuição das frações húmicas a partir do teor de carbono das frações (absoluto), ou ainda derivado o percentual em relação ao carbono orgânico (participativo) e as razões entre frações.

6.2 Princípio

O fracionamento consiste na obtenção de três frações, as quais são definidas operacionalmente em relação à solubilidade em função do pH da solução extratora (base ou ácido) e os resíduos: fração ácidos fúlvicos, fração ácidos húmicos e fração humina (Kononova, 1966; Schnitzer, 1978; Stevenson, 1994).

Como definição geral, a fração ácidos fúlvicos apresenta cor amarelo-parda e é solúvel em qualquer valor de pH da solução; a fração ácidos húmicos, de cor castanho-escura, está solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido diluído, e a fração humina representa o resíduo insolúvel que permanece como precipitado (Kononova, 1966; Schnitzer, 1978; Stevenson, 1994).

A quantificação do carbono orgânico nas frações húmicas é feita em alíquotas ou no resíduo a partir da digestão com a solução de dicromato de potássio e o ácido sulfúrico

concentrado, seguindo com a titulação com o sulfato ferroso amoniacal (Yeomans; Bremmer, 1988).

Dentre os diversos métodos citados na literatura, é apresentado um procedimento simplificado e de fácil execução, o qual foi proposto anteriormente por Benites et al. (2003). Alguns ajustes em relação ao método foram feitos considerando o melhor desenvolvimento e rendimento laboratorial.

6.3 Material e Equipamentos

6.3.1 Fracionamento

- Centrífuga refrigerada de alta rotação (superior a 5.000 g) com rotor para tubos de 50 mL.
- Capela de fluxo contínuo.
- Geladeira.
- Sistema de filtragem a vácuo para filtros 47 mm de diâmetro ou maior.
- Bomba de vácuo.
- Filtros de membrana em éster de celulose, 0,45 mm de poro e 47 mm de diâmetro, lisa (ex.: Millipore HAWP04700).
- Balão volumétrico de 100,00 mL e 1 L.
- Balança com precisão de 0,001 g.
- Provetas de 25 mL, 50 mL e 100 mL.
- Potenciômetro.
- Tubos de centrífuga de 50 mL com tampa.
- Funil.
- Espátulas e conta gotas.

6.3.2 Determinação do teor de carbono nas frações

- Bloco digestor com, no mínimo, 40 posições.
- Chapa aquecedora com regulagem de temperatura (até 250 °C).
- Tubos de digestão.
- Bureta volumétrica ou digital.
- Provetas de 25 mL, 50 mL e 100 mL.
- Pipetas de 1,00 mL e 5,00 mL ou pipeta automática regulável de 1-5 mL.
- Erlenmeyer de 125 mL.
- Dedos frios para refluxo.

6.4 Reagentes e soluções

- **Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (96% de pureza), p.a.**
- **Solução de hidróxido de sódio ($NaOH$) 0,1 mol L⁻¹** – Dissolver 4,00 g de NaOH com água destilada ou deionizada e completar o volume do balão a 1 L com água.
- **Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 20% (v/v)** – Dissolver lentamente 200 mL de H_2SO_4 em 500 mL de água destilada ou deionizada e completar o volume do balão a 1 L com água.
- **Solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) 0,042 mol L⁻¹** – Dissolver 12,26 g de $K_2Cr_2O_7$ (pré-seco em estufa a 105 °C e conservado em dessecador) em água destilada e completar o volume do balão a 1 L com água destilada ou deionizada.
- **Solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) 0,167 mol L⁻¹** – Dissolver 49,04 g de $K_2Cr_2O_7$ (pré-seco em estufa a 105 °C e conservado em dessecador) em água destilada ou deionizada e completar o volume do balão a 1 L com água.

- **Indicador Ferroin 0,025 mol L⁻¹** – Dissolver 1,465 g de ortofenantrolina mono-hidratada e 0,985 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O em água destilada ou deionizada e completar o volume do balão a 100 mL.
- **Solução de sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O) 0,0125 mol L⁻¹** – Dissolver 4,902 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O em 500 mL de água destilada e adicionar 15,00 mL de H₂SO₄. Resfriar a solução e completar o volume do balão a 1 L com água destilada. Manter sob refrigeração e protegido da luminosidade.
- **Solução de sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O) 0,250 mol L⁻¹** – Dissolver 98,04 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O em 500 mL de água destilada ou deionizada e adicionar 15,00 mL de H₂SO₄. Resfriar a solução e completar o volume do balão a 1 L com água.

6.5 Procedimento

6.5.1 Extração e Fracionamento

- Pesar uma amostra de terra fina seca em estufa (TFSE) com teor de carbono orgânico (C org) de 0,03 g (30 mg). Massa de solo (g) = 30 mg / C org no solo (g kg⁻¹)⁽¹⁴⁾.
- Dispor em tubo de centrífuga de 50 mL.
- Adicionar 20 mL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, misturar com espátula e agitar manualmente.
- Deixar em repouso por 16 a 24 horas⁽¹⁵⁾.

⁽¹⁴⁾ Caso não tenha o teor de carbono, utilizar entre 0,5 g e 2 g de solo, sendo que a menor massa será para solo com cor mais escura e/ou expectativa de maiores teores de matéria orgânica.

⁽¹⁵⁾ Caso exceder o tempo de 24 horas, eliminar e reiniciar o processo.

- Balancear o peso dos tubos e centrifugar por 30 minutos a 5.000 g.
- Recolher o sobrenadante (extrato alcalino) em outro tubo de centrífuga de 50 mL.
- Adicionar ao precipitado do tubo de centrífuga 20 mL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.
- Solubilizar com espátula, agitar manualmente e deixar em repouso por uma hora.
- Balancear o peso dos tubos e centrifugar por 30 minutos a 5.000 g.
- Recolher o sobrenadante (extrato alcalino) juntamente com o obtido na primeira centrifugação.
- Ajustar o pH do extrato alcalino para 1 a 2 com H₂SO₄ 20%⁽¹⁶⁾.
- Acondicionar o extrato alcalino (pH 1 a 2) por uma noite em geladeira.
- Reservar o precipitado em placa e secar em estufa a 45 °C. Guardar para determinação do carbono orgânico na fração humina.

6.5.2 Separação dos ácidos fúlvicos e húmicos por centrifugação

- Balancear o peso dos tubos contendo o extrato alcalino ao pH 1 a 2.
- Centrifugar por 15 minutos a 5.000 g⁽¹⁷⁾.

⁽¹⁶⁾ Medir o volume de H₂SO₄ gasto em três amostras e fazer a média para posterior diminuição do pH das demais amostras sem uso do eletrodo. Baixar o pH imediatamente após a soma dos extratos.

⁽¹⁷⁾ A separação pode ser feita por filtração conforme apresentado no item 6.5.3.

- Recolher o sobrenadante (ácidos fúlvicos) em tubo de centrífuga de 50 mL e completar o volume com NaOH 0,1 mol L⁻¹ ou água destilada.
- Solubilizar o precipitado (ácidos húmicos) no tubo de centrífuga de 50 mL e completar o volume com NaOH 0,1 mol L⁻¹ ou água destilada⁽¹⁸⁾.

6.5.3 Separação dos ácidos fúlvicos e húmicos por filtração

- Verter dos tubos o extrato alcalino (pH 1 a 2) em filtro de membrana de 0,45 mm sob vácuo. Pode ser feito diretamente sob filtro e funil disposto em tubo de centrífuga de 50 mL.
- Retirar o filtro com os ácidos húmicos e lavar com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ para retirar os ácidos húmicos retidos em tubo de centrífuga de 50 mL.
- Completar o volume dos ácidos fúlvicos e húmicos a 50 mL com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ ou água (destilada ou deionizada). Armazenar em até no máximo 5 dias para determinação do teor de carbono orgânico.

6.5.4 Oxidação do carbono orgânico nas frações

6.5.4.1 Ácidos fúlvicos e húmicos

- Preparar dois brancos frios e dois aquecidos: em tubos de digestão adicionar 5 mL de água destilada, 1,00 mL de solução de K₂Cr₂O₇ 0,042 mol L⁻¹ e 5 mL de H₂SO₄ concentrado.
- Pipetar 5,00 mL do extrato de cada fração e dispor em tubo de digestão⁽¹⁹⁾.

⁽¹⁸⁾ Armazenar em até no máximo 5 dias para determinação do teor de carbono orgânico.

- Adicionar 1,00 mL de solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,042 mol L⁻¹ e 5 mL de H_2SO_4 concentrado.
- Aquecer dois tubos do branco e os tubos com as frações em bloco digestor com dedos frios (máximo 150 °C) por 30 minutos e/ou até obter a oxidação do C_{org} (cor amarela-castanha)⁽²⁰⁾.
- Deixar esfriar.
- Transferir a solução dos brancos e das frações para Erlenmeyer de 125 mL.
- Adicionar três gotas de indicador Ferrouin.
- Titular⁽²¹⁾ com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,0125 mol L⁻¹ (viragem do verde para o vermelho bordô).

6.5.4.2 *Humina*

- Preparar dois brancos frios e dois aquecidos: em tubos de digestão, adicionar 5,00 mL de solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,167 mol L⁻¹ e 10 mL de H_2SO_4 concentrado.
- Pesar o precipitado seco a 50 °C (anotar a massa), macerar e dispor no tubo de digestão.
- Adicionar 5,00 mL de solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,167 mol L⁻¹ e 10 mL de H_2SO_4 concentrado.

⁽¹⁹⁾ Amostras concentradas (muito amarelas ou escuras) podem ser diluídas com água destilada (sugestão, 1:5). Considerar o valor da diluição (número de vezes) multiplicando o teor de carbono orgânico.

⁽²⁰⁾ Quando observar a cor verde, adicionar mais 1,00 mL de dicromato (ou quantas vezes for necessário). Quando titular em buretas comuns (50,00 mL), dividir o volume do extrato no Erlenmeyer pelas vezes de dicromato totais e pipetar uma alíquota para a titulação. Em buretas automáticas, a etapa de divisão do volume do extrato no Erlenmeyer não se faz necessária, todavia, o volume de sulfato ferroso amoniacal deverá ser dividido pelo número total de adições de dicromato. Para o cálculo do teor de carbono orgânico, considerar o número de adições totais de dicromato multiplicando na fórmula.

⁽²¹⁾ Recolher toda solução após a titulação das amostras e do branco em embalagem especial para posterior tratamento como resíduo químico.

- Aquecer dois tubos do branco e tubos com fração em bloco digestor com dedos frios (máximo 150 °C) por 30 minutos e até obter a oxidação do carbono orgânico (cor amarela-castanha)⁽²²⁾.
- Deixar esfriar.
- Transferir a solução dos brancos e da fração para Erlenmeyer de 125 mL.
- Titular⁽²³⁾ com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,25 mol L⁻¹ até viragem da cor verde para o vermelho bordô.

Recolher toda solução após a titulação das amostras e do branco em embalagem especial para posterior tratamento como resíduo químico ou destinação adequada.

6.6 Cálculos

6.6.1 Frações ácidos fúlvicos e húmicos

$$C_{\text{org}} = \frac{\left[\frac{(V_{\text{ba}} - V_{\text{a}}) \cdot (V_{\text{bs}} - V_{\text{ba}})}{V_{\text{bs}}} + (V_{\text{ba}} - V_{\text{a}}) \right] \cdot 3 \cdot M_{\text{SFA}} \cdot \left(\frac{50}{V_{\text{e}}} \right)}{m}$$

²² Quando observar a cor verde, adicionar mais 5,00 mL de dicromato (ou quantas vezes for necessário). Quanto for titular em buretas comuns (50 mL), dividir o volume do extrato no Erlenmeyer pelas vezes de dicromato totais e pipetar uma alíquota para a titulação. Em buretas automáticas, a etapa de divisão do volume do extrato no Erlenmeyer não se faz necessária, todavia, o volume de sulfato ferroso amoniacal deverá ser dividido pelo número de total de adições de dicromato. Considerar o número de adições totais de dicromato multiplicando o teor de carbono orgânico. O aquecimento pode ser feito dispondo os brancos e frações diretamente em Erlenmeyer de 125 mL sobre chapa aquecedora. O tempo será de 5 minutos e até a oxidação do carbono orgânico (cor amarela-castanha).

⁽²³⁾ A cor da viragem poderá ser mascarada dificultando a visualização em solo com alto teor de matéria orgânica e/ou escuro. Nesse caso, recomenda-se diluir com água destilada para facilitar a leitura.

Em que:

C_{org} – concentração de carbono orgânico nas frações, em $g\ kg^{-1}$.

V_{ba} – volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do branco aquecido, em mL.

V_a – volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra, em mL.

V_{bs} – volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do branco sem aquecimento, em mL.

M_{SFA} – concentração da solução do sulfato ferroso amoniacal, em $mol\ L^{-1}$.

V_e – volume da alíquota do extrato, em mL.

m – massa da amostra de solo inicial, em g.

6.6.2 Fração humina

$$C_{org} = \frac{\left[\frac{(V_{ba} - V_a) \cdot (V_{bs} - V_{ba})}{V_{bs}} + (V_{ba} - V_a) \right] \cdot 3 \cdot M_{SFA}}{m}$$

Em que:

C_{org} – concentração de carbono orgânico na fração humina, em $g\ kg^{-1}$.

V_{ba} – volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do branco aquecido, em mL.

V_a – volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra, em mL.

V_{bs} – volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do branco sem aquecimento, em mL.

M_{SFA} – concentração da solução do sulfato ferroso amoniacal, em $mol\ L^{-1}$.

m – massa da amostra de precipitado (humina), em g.

6.6.3 Razões com o carbono orgânico e entre frações

A obtenção dessas razões possibilita fazer comparações quantitativas e inferir sobre a qualidade da matéria orgânica do solo. É possível avaliar os padrões entre amostras de solo e também dentro de um solo em profundidade.

- **Valores participativos:** concentração de carbono de cada fração húmica pelo C_{org} obtido no item 1.5.
- **Razões entre frações:** ácidos húmicos / ácidos fúlvicos e extrato alcalino (ácidos húmicos + ácidos fúlvicos) / humina.

6.7 Observações

O uso dos termos “fração ácidos fúlvicos, fração ácidos húmicos e fração humina” se deve à necessidade de mostrar que o carbono determinado em cada fração não é exclusivamente formado por substâncias húmicas (Kononova, 1966). Os compostos orgânicos de baixo peso molecular são coextraídos como ácidos fúlvicos, e os não humificados são coextraídos como ácidos húmicos, além da matéria orgânica leve e carvões (particulada), que estarão como humina (Benites et al., 2003; Malcolm, 1990).

Para os solos de composição mineral, a soma das frações está entre 90% e 105% do teor de carbono orgânico (Benites et al., 2000; Fontana et al., 2010), enquanto, para os solos de composição orgânica, a soma das frações varia de 74% a 94% (Fontana et al., 2010; Valladares et al., 2007). Para solos que apresentam teor de C_{org} inferior a 5 g kg^{-1} , a soma das frações húmicas poderá variar substancialmente além dos valores apresentados anteriormente para os tipos de solo.

Para a fração humina, principalmente, quando da presença de materiais orgânicos muito reduzidos (por exemplo: ácidos

graxos de cadeia longa tais como cutina e suberina) ou materiais de difícil oxidação (por exemplo: carvão), variações podem ser observadas na quantidade de dicromato gasto.

A presença de interferentes minerais como o Fe^{2+} (ambientes hidromórficos) ou cloretos irá consumir dicromato, resultando numa superestimativa do teor de C_{org} . A secagem do material contendo Fe^{2+} e adição de Ag_2SO_4 em material contendo cloreto minimizam os efeitos. Entretanto, em solos que apresentam óxido de manganês, estes competem com o dicromato, acarretando subestimativa do teor de C_{org} (Guerra; Santos, 2008).

6.8 Referências

BENITES, V. M.; KER, J. C.; MENDONÇA, E. S. Fracionamento quantitativo de substâncias húmicas como auxiliar na identificação de diferentes solos da região sul do Brasil. In: REUNIÃO DE CLASSIFICAÇÃO, CORRELAÇÃO E APLICAÇÃO DE LEVANTAMENTOS DE SOLOS, 6., 2000, Colombo. **Guia de excursão de estudos de solos nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas; Rio de Janeiro: Embrapa Solos; Campinas: IAC, 2000. p. 184-192.

BENITES, V. M.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. de A. **Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo**: um procedimento simplificado de baixo custo. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2003. 7 p. (Embrapa Solos. Comunicado Técnico, 16).

CUNHA, T. J. F.; CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. de A.; RIBEIRO, L. P. Fracionamento da matéria orgânica humificada em solos brasileiros. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. de A. (Ed.). **Humosfera**: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes: Ed. do Autor, 2005. cap. 3, p. 54-80.

FONTANA, A.; PEREIRA, M. G.; ANJOS, L. H. C. dos; BENITES, V. de M. Quantificação e utilização das frações húmicas como característica diferencial em horizontes diagnósticos de solos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1241-1257, 2010.

GUERRA, J. G. M.; SANTOS, G. de A. Métodos químicos e físicos. In: SANTOS, G. de A.; SILVA, L. S. da; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais**. 2. ed. rev. e atual. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 185-199.

KELLEHER, B. P.; SIMPSON, A. J. Humic substances in soils: are they really chemically distinct? **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 15, p. 4605-4611, 2006.

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

MALCOLM, R. L. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 19-30, 1990.

SCHNITZER, M. Humic substances: chemistry and reactions. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. (Ed.). **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978. cap. 1, p. 1-64.

SIMPSON, A. J.; SONG, G.; SMITH, E.; LAM, B.; NOVOTNY, E. H.; HAYES, M. H. B. Unraveling the structural components of soil humin by use of solution-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 3, p. 876-883, 2007.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd ed. New York: J. Wiley and Sons, 1994. 512 p.

VALLADARES, G. S.; PEREIRA, M. G.; ANJOS, L. H. C. dos; BENITES, V. de M.; EBELING, A. G. MOUTA, R. de O. Humic substance fractions and attributes of Histosols and related high-organic-matter soils from Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 38, n. 5/6, p. 763-777, 2007.

YEOMANS, J. C.; BREMMER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil.

Communications in Soil Science and Plant Analysis, v. 19, n. 13, p. 1467-1476, 1988.

6.9 Literatura recomendada

WHITEHEAD, D. C.; TINSLEY, J. Extraction of soil organic matter with dimethylformamide. **Soil Science**, v. 97, n. 1, p. 34-42, 1964.