



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Solos
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rua Jardim Botânico, 1.024 CEP 22460-000 Rio de Janeiro, RJ
Telefone (21) 274-4999 Fax (21) 274-5291
<http://www.cnps.embrapa.br>

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 1, dezembro 1999, p.1-4

ISSN 1517-5685



MÉTODO PARA A EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DO SOLO Ácido Húmico e Ácido Fúlvico ¹

Pedro L. O. de A. Machado ²

Vários métodos para a extração de substâncias húmicas dos solos utilizando a solução de hidróxido de sódio têm sido publicados. Esses métodos são bastante eficazes e produzem resultados comparáveis. Apresentamos aqui um método que tem sido considerado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) aceitável para a extração de substâncias húmicas de solos.

A IHSS enfatiza que o método a ser descrito aqui não é considerado recomendado ou aprovado, mas reconhece-o como adequado para os vários tipos de solos e que pode ser conduzido na maioria dos laboratórios. O método proporciona a extração de altas quantidades de substâncias húmicas e pode ser utilizado como padrão ("standard"), não no sentido de norma, para comparações entre laboratórios.

Um componente importante desse procedimento é o uso de uma resina adsorvente no processo de purificação. Esse passo pode ser substituído por uma diálise se a resina não estiver disponível (ver *Nota sobre diálise de ácidos fúlvicos*, no final deste artigo).

MATERIAIS

- Ácido clorídrico (HCl), 1 mol.L⁻¹ e 6 mol.L⁻¹
- Hidróxido de sódio (NaOH), 1 mol.L⁻¹ e 0,1 mol.L⁻¹
- Hidróxido de potássio (KOH), 0,1 mol.L⁻¹
- Cloreto de potássio (KCl)
- Ácido fluorídrico (HF) concentrado, 0,3 mol.L⁻¹
- Resina XAD-8 (Rohm & Haas Co., Philadelphia, PA, EUA)
- Tubo de diálise "Visking" (Visking Co., Chicago, IL) [MWCO (abertura molecular)] 10.000 dalton

¹ Tradução livre do inglês (Swift et al., 1996).

² Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Solos, Rua Jardim Botânico, 1.024, CEP 22460-000, Jardim Botânico, Rio de Janeiro, RJ.
E-mail: pedro@cnps.embrapa.br



PROCEDIMENTO

- Conduzir a extração em Terra Fina Seca ao Ar (TFSA).
- Ajustar o pH da amostra para 1-2 com a adição de HCl 1mol.L⁻¹, sob temperatura não superior a 25°C.
- Ajustar o volume da solução com HCl 0,1mol.L⁻¹ para atingir uma concentração final com uma relação de 10mL de líquido/1g de TFSA.
- Agitar a suspensão por 1 hora e, então, separar o sobrenadante do resíduo por decantação após deixar a solução em repouso, ou através de uma leve centrifugação.
- Separar o sobrenadante (**AF Extrato 1**) para extrair o ácido fúlvico através da XAD-8.
- Ajustar o pH do solo residual para 7,0 com NaOH 1mol.L⁻¹ e, após, adicionar NaOH 0,1mol.L⁻¹ sob atmosfera de N₂, resultando no final uma relação solo-solução 10:1.
- Proceder a extração sob N₂ com agitação intermitente por, no mínimo, 4 horas.
- Deixar a suspensão em repouso por 12 a 16 horas (uma noite) e isolar o sobrenadante através de decantação ou centrifugação.
- Acidificar o sobrenadante com HCl 6mol.L⁻¹ com agitação simultânea até atingir pH 1,0 e deixar novamente em repouso por 12 a 16 horas.
- Centrifugar para separar o ácido húmico (precipitado) e as frações de ácido fúlvico (sobrenadante - **AF Extrato 2**).
- Redissolver a **fração de ácido húmico** através da adição de um pequeno volume conhecido de KOH 0,1mol.L⁻¹ sob N₂.
- Adicionar KCl na forma sólida, visando atingir uma concentração de 0,3mol.L⁻¹ [K⁺] e, após, centrifugar sob alta velocidade para remover os sólidos suspensos.
- Reprecipitar o ácido húmico, adicionando HCl 6mol.L⁻¹ com agitação simultânea até atingir pH 1,0, e deixar em repouso por 12 a 16 horas.
- Centrifugar e descartar o sobrenadante.
- Dissolver o precipitado (ácido húmico) em solução HCl 0,1mol.L⁻¹ + HF 0,3mol.L⁻¹ num recipiente plástico e agitar por 12 a 16 horas (uma noite).
- Centrifugar e repetir o passo anterior (tratamento com HCl + HF) se necessário, até o teor de cinzas ficar abaixo de 1%.
- Transferir o precipitado para um tubo de diálise "Visking", utilizando água, e proceder a diálise contra água destilada até que a água da diálise apresente teste negativo de Cl⁻ com nitrato de prata.
- Liofilizar o **ácido húmico**.

- Passar o sobrenadante designado **AF Extrato 1** através da coluna XAD-8 (0,15mL de resina por grama de amostra seca inicial, sob vazão de 15 volumes por hora). Descartar o efluente e lavar a coluna XAD-8 contendo ácido fúlvico sorvido com 0,65 volume da coluna com H₂O. Eluir a coluna XAD-8 com 1 volume (da coluna) de NaOH 0,1mol.L⁻¹, seguido de 2 a 3 volumes de água destilada. Acidificar a solução imediatamente com HCl 6mol.L⁻¹ até pH 1,0. Adicionar HF concentrado até uma concentração final de HF 0,3mol.L⁻¹. O volume da solução deve ser suficiente para manter o ácido fúlvico em solução.
- Passar o sobrenadante designado **AF Extrato 2** através de uma coluna XAD-8 (1,0mL de resina por grama de TFSA inicial). Repetir a eluição com NaOH 0,1mol.L⁻¹ e a acidificação como descrito para AF Extrato 1 acima.
- Misturar as soluções eluentes finais de cada um dos extratos FA e passar essa solução através da resina XAD-8 numa coluna de vidro (o volume da coluna deve ser 1/5 do volume da amostra).
- Lavar com 0,65 volume (da coluna) de água destilada.
- Passar o eluente através da resina trocadora de íon saturada com H⁺ [Bio Rad AG-MP-5 (Bio Agency, São Paulo, SP), utilizando três vezes a molaridade de íons sódio na solução].
- Liofilizar a solução eluente para recuperar o **ácido fúlvico saturado com H⁺**.

COMENTÁRIOS

- XAD-8 é uma resina não-iônica, macroporosa (0,25µm), contendo éster de metil metacrilato. Devido à dificuldade em obtê-la, será necessário utilizar uma resina alternativa tal como a Polyclar, que é uma resina PVP (polivinilpirrolidona cruzada) ou algo similar (De Nobili et al., 1990; Watanabe & Kuwatsuka, 1991).
- Procedimentos laboriosos de purificação de resinas são necessários antes do uso. Informações sobre tais métodos e procedimentos para armazenamento de resinas podem ser obtidos em Thurman & Malcolm (1981).
- Caso não seja possível purificar o ácido fúlvico utilizando resinas, a diálise contra água destilada pode ser uma alternativa, embora seja um método de purificação menos adequado (ver *Nota sobre diálise de ácidos fúlvicos*, no final do artigo). Se houver uma concentração significativa de cátions polivalentes (por exemplo, Al⁺³), eles podem formar complexos metálicos com humatos, assim que a solução for neutralizada. Logo, a diálise deverá ser conduzida inicialmente contra uma solução diluída de HCl, até que a concentração de qualquer cátion polivalente tenha sido bem diminuída para, após, finalizar a diálise contra água destilada. Em princípio, a fração obtida dessa maneira deve ser denominada de fração fúlvica e não ácido fúlvico, pois pode conter teores significativos de polissacarídeos.

Nota sobre o tratamento com HF: surgiu ultimamente um passo referente à filtração para a remoção de argilas de extratos de NaOH. Essa filtração remove cinzas sem usar HF, que é altamente tóxico. O extrato contendo NaOH é filtrado através de um filtro membrana de polietersulfona (Gelman Supor) sob pressão (gás de nitrogênio). O extrato deve ser filtrado duas vezes através da mesma membrana. Este procedimento auxilia na remoção de argila fina e elimina a necessidade de tratamentos com KOH-KCl e HF-HCl para reduzir o conteúdo de cinzas.

Nota sobre diálise de ácidos fúlvicos: foi observado que a diálise de ácido fúlvico resultou numa passagem de quantidades razoáveis de ácido fúlvico através de membranas de diálise comercialmente disponíveis. Assim, a diálise provavelmente pode não ser uma boa alternativa ao tratamento com resina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE NOBILI, M.; BRAGATO, G.; ALCANIZ, J.M.; PUIGBO, A.; COMELLAS, L. Characterization of electrophoretic fractions of humic substances with different electrofocusing behavior. **Soil Science**, Baltimore, v.150 n.5., p.763-770, 1990.
- SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D.L.; PAGE A.L.; HELMKE, P.A.; LOEPPERT, R.H.; SOLTANPOUR, P.N.; TABATABAI, M.A.; JOHNSTON, C. T.; SUMNER, M.E. ed. **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America / American Society of Agronomy, 1996. Part 3. Chemical methods. p.1011-1020. (Soil Science Society of America Book Series, 5).
- THURMAN, E.M.; MALCOLM, R.L. Preparative isolation of aquatic humic substances. **Environmental Science & Technology**, Washington D.C., v 15, p.463-466, 1981.
- WATANABE, A., KUWATSUKA, S. Fractionation of soil fulvic acids using polyvinyl-pyrrolidone and their ionization difference spectra. **Soil Science and Plant Nutrition**, Bunkyo-Ku, v.37, p.611-617, 1991.

Tiragem: 50 exemplares

Também disponível na Internet em <http://www.cnps.embrapa.br>

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO**

**GOVERNO
FEDERAL**

Produção editorial
Embrapa Solos
Área de Comunicação e Negócios (ACN)