

FRACIONAMENTO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DO SOLO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM COLUNA¹

Pedro Luiz O. de Almeida Machado²

Beáta E. Madari³

Martin H. Gerzabek⁴

A cromatografia por exclusão em coluna originou-se na década de sessenta e sua utilização no fracionamento da matéria orgânica do solo se tornou bastante difundida em muitos laboratórios, dentro de estudos sobre a interação da matéria orgânica com metais, melhoria da estrutura do solo e problemas de nutrição de plantas (De Nobili et al., 1989). Este tipo de cromatografia possui diferentes nomes, como cromatografia em gel, filtração em gel (Porath & Flodin, 1959) e cromatografia de difusão restrita (Steele & Ackers, 1962) e é uma técnica de separação, na qual as moléculas são separadas de acordo com seu tamanho molecular. É uma técnica diferente da cromatografia "clássica" que se baseia em diferenças na interação entre vários solutos e a superfície do meio cromatográfico.

A matriz cromatográfica é porosa e atua como uma peneira molecular dentro de uma coluna hermética contendo uma solução aquosa (solução eluente), que passa através da coluna e da matriz por gravidade ou por bombeamento (por exemplo, bombas peristálticas). A matriz mais comumente utilizada é um polímero gelatinoso denominado Sephadex. É provável que Mehta et al. (1963) tenham sido os primeiros a utilizar a cromatografia em Sephadex para caracterizar as substâncias húmicas.

Segundo De Nobili et al. (1989), a teoria de exclusão se baseia na hipótese de que uma molécula não pode entrar em todas as regiões da fase gel se a molécula for maior que um determinado tamanho. O esquema apresentado na Figura 1 permite uma melhor compreensão do mecanismo de separação. Os grânulos da matriz, por serem porosos, permitem que moléculas minúsculas passem livremente, tanto internamente (através dos poros) como externamente a eles. Assim, as moléculas que são transportadas pela solução aquosa fluindo externamente aos grânulos (fase móvel) fluem através da coluna mais rapidamente que as moléculas menores que tomam muito mais tempo dentro da fase estacionária, ou seja, na solução aquosa imóvel dentro dos grânulos da matriz.

¹ Palestra apresentada no III Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. 24 a 26 de novembro de 1999.

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

³ Professora Assistente, Ph.D., Gödöllő University of Agricultural Sciences, Department of Soil Science and Agricultural Chemistry, 2103 Gödöllő, Hungria.

⁴ Pesquisador, Ph.D., Austrian Research Centre Seibersdorf, A-2444 Seibersdorf, Austria.

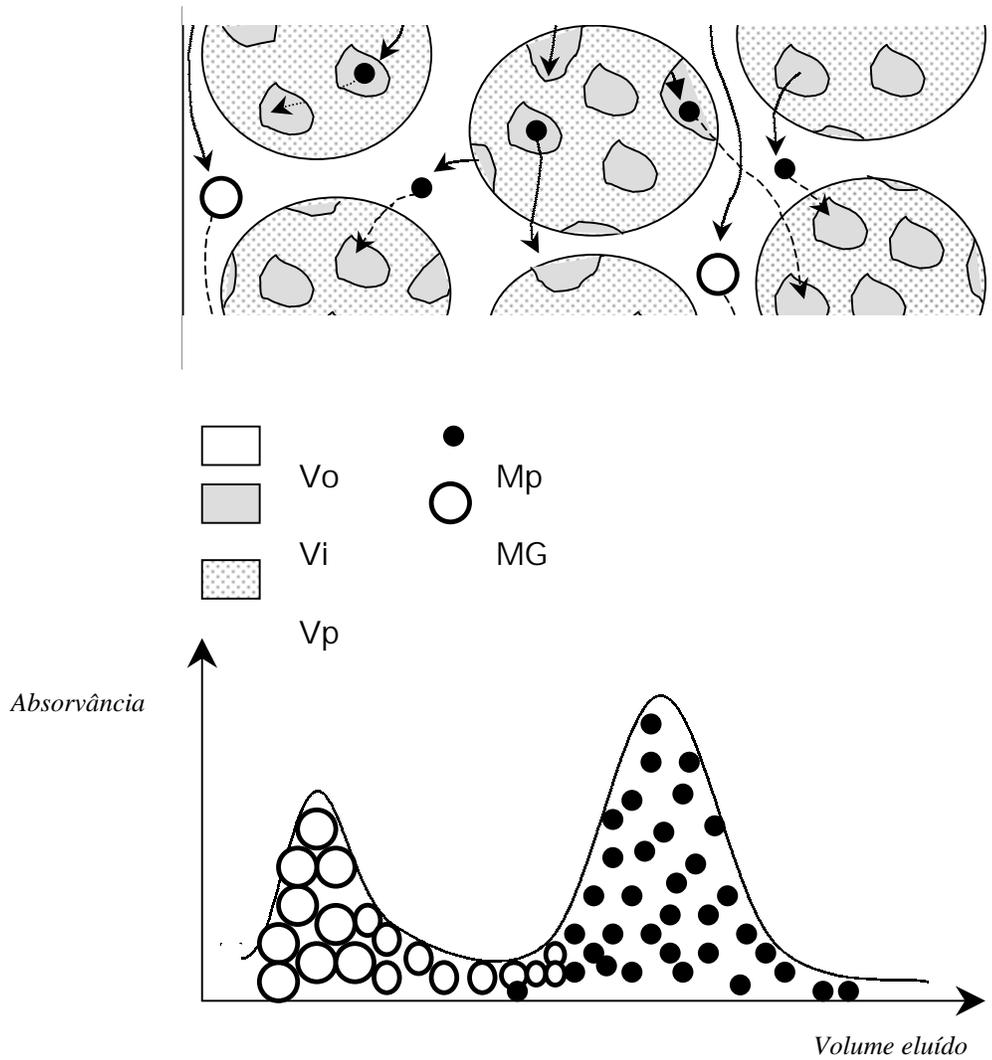


FIGURA 1. Representação esquemática do princípio da exclusão. Moléculas grandes (MG) somente se movem externamente ao grânulo ou matriz cromatográfica (volume morto = V_o), ao passo que moléculas pequenas (Mp) podem se mover também por dentro dos grânulos (volume interno = V_i). V_p indica volume ocupado pelos grânulos. Adaptada de De Nobili et al. (1989) e Tan (1993).

Cromatografia em grânulos porosos de vidro (*Controlled-Pore Glass*)

Como as matrizes gelatinosas têm a tendência de se compactarem, causando diminuição na resolução, ou não suportam esterilização sob altas temperaturas (600°C), procurou-se então por outras alternativas. Grânulos porosos de vidro ou vidro de porosidade controlada (*controlled-pore glass*) têm oferecido vantagens, pois são relativamente inertes ou menos sujeitos a reações de adsorção e podem ser esterilizados sob altas temperaturas. As vantagens do uso e características dos grânulos porosos de vidro foram inicialmente reportadas por Haller (1965) em estudos relacionados à virologia vegetal. Mais tarde, Danneberg (1977) utilizou-os na cromatografia de substâncias húmicas extraídas de um Chernossolo na Áustria. Segundo o autor, a cromatografia com grânulos de vidro não apresenta fenômeno de adsorção, uma séria limitação à técnica, devido ao fato dele ter obtido 100% de recuperação das substâncias húmicas após cromatografia. Entretanto, De Nobili et al. (1989) acreditam que cargas negativas podem se originar a partir da dissociação de grupos SiOH, vindo a causar adsorção. É um material rígido e, se utilizado apropriadamente, dificilmente precisa ser substituído por um novo.

Cromatografia em grânulos porosos de vidro de substâncias húmicas de um Latossolo Roxo de Londrina, PR.

Material e Métodos

Com o objetivo de investigar as alterações no teor e na configuração das substâncias húmicas de um Latossolo Vermelho distroférico (LVdf; teor de argila = 780g.kg⁻¹), após 21 anos sob plantio direto e convencional na sucessão soja-trigo, coletaram-se amostras de solos (0-5cm) de um experimento de campo do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em Londrina, PR (temperatura média anual = 20,7°C; precipitação média anual = 1.615mm). Os tratamentos, distribuídos em blocos casualizados com três repetições, consistiam de plantio convencional (PC - uma aração seguida de duas gradagens leves niveladoras) e plantio direto (PD) na sucessão soja-trigo. Para fins de referência, foram coletadas amostras do mesmo tipo de solo numa área adjacente sob Floresta Tropical Subperenifólia, em três áreas (20 x 20m), distanciadas 20m entre elas.

As amostras foram coletadas, secas à sombra por 24 horas, acondicionadas em sacos plásticos e transferidas para a Embrapa Solos, no Rio de Janeiro, RJ, onde foram secas ao ar forçado sob temperatura inferior a 30°C, moídas, passadas em peneira de 2mm e armazenadas em sacos plásticos para posteriores análises. A extração de substâncias húmicas do solo foi feita através de resina trocadora de íons saturada com sódio (CHELEX 100, Biorad, EUA), juntamente com água deionizada numa relação solo:resina:água de 10g: 25g: 50mL. Embora não seja o procedimento de extração mais adequado, adotou-se a resina para possibilitar-nos comparar com resultados obtidos por Machado & Gerzabek (1993). A suspensão foi agitada por 24 horas sob temperatura ambiente menor que 25°C, seguida de centrifugação refrigerada a 15.000rpm, durante 20 minutos, para facilitar a separação da suspensão contendo as substâncias húmicas do material de solo e resina. O sobrenadante, isolado e transferido para frascos de plástico, foi congelado, liofilizado e mantido sob refrigeração até o fracionamento em coluna cromatográfica.

A avaliação cromatográfica foi conduzida segundo método proposto por Danneberg (1981), onde, primeiramente, uma coluna de vidro (Pharmacia C16/100, Uppsala, Suécia) foi empacotada com grânulos porosos de vidro de granulometria entre 120 e 200 mesh e diâmetro de poro medindo 17nm (CPG Inc, Lincoln Park, NJ, EUA) e uma solução eluente contendo Na₂B₄O₇ 0,021M e NaCl 0,05M. Após alcançar o equilíbrio, a coluna foi calibrada utilizando-se Fenoltaleína alcoólica 0,01% (determinação do volume total; V_t), representando solutos de baixo peso molecular; e Azul Dextran 2000 (determinação do volume morto; V_o), representando solutos de alto peso molecular.

Após liofilização, o extrato húmico foi dissolvido em 10mL de solução eluente e uma alíquota de 2mL do extrato dissolvido foi injetada na coluna a uma vazão ou "taxa de fluxo" de 1,5mL.min⁻¹, utilizando-se uma bomba peristáltica. A absorvância foi medida na solução eluente através de espectrofotômetro a 400nm, contendo uma cubeta de fluxo (Novaspec II, Pharmacia, Uppsala, Suécia).

Através dos valores de calibração da coluna e da determinação do volume de cada fração, pode-se determinar para cada medição o coeficiente de distribuição ou partição (valor de K_d ; Tan & Giddens, 1972) pela seguinte relação:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}, \text{ onde:}$$

V_e = volume de eluição; V_o = volume vazio ou morto; e V_t = volume total.

O volume de eluição (V_e) é de uso limitado para a caracterização dos cromatogramas, pois depende da geometria da coluna, do comprimento da matriz cromatográfica e de diferenças na densidade de empacotamento. Por outro lado, o coeficiente de distribuição (valor de K_d) possibilita comparação direta de taxas de migração cromatográficas de diferentes extratos (solutos) de experimentos distintos (De Nobili et al., 1989).

Foi determinada também a densidade ótica por grama de solo (d.o. g^{-1} solo) através da integração da absorvância (d.o. = valor de absorvância x volume de cada fração). Finalmente, foi feita a medida de distribuição do peso molecular ($E1/E2\%$; Gerzabek e Ullah, 1989, modificado de Kononova, 1966) através da seguinte relação:

$$E1/E2\% = \frac{E_{\text{max 1}^\circ \text{ Pico}} \times 100}{E_{\text{max 2}^\circ \text{ Pico}}}, \text{ onde:}$$

E_{max} = absorvância máxima.

Finalmente, objetivando investigar as interações entre as substâncias húmicas de dois Latossolos e o alumínio presente nas frações húmicas durante a cromatografia por exclusão, foram selecionados um Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) de Ponta Grossa, PR, sob floresta de eucalipto, e um Latossolo Vermelho distrófico (LVd) de Campos Novos Paulista, SP, sob floresta de *Pinus sp.* (próxima a Assis, SP). As amostras de solos foram coletadas à profundidade de 0-20cm através de procedimento similar ao descrito anteriormente para o LVdf não-cultivado de Londrina, PR. Conforme já exposto, as substâncias húmicas foram extraídas e, em seguida, executou-se a cromatografia por exclusão em coluna contendo grânulos porosos de vidro (CPG). Entretanto, após a cromatografia, as frações eluídas foram acondicionadas num coletor de frações (Pharmacia, mod. RediFrac, Uppsala, Suécia) conectado ao registrador cromatográfico e à bomba peristáltica. Imediatamente, cada tubo de vidro contendo cada fração (solução eluente) foi levado a um espectrômetro de plasma (ICP-AES, Perkin Elmer II) para a determinação de alumínio associado a cada fração.

Resultados e Discussão

Os cromatogramas dos extratos de substâncias húmicas do solo podem ser observados na Figura 2. As moléculas maiores, como por exemplo ácidos húmicos cinza, resultam no primeiro pico com um valor de K_d próximo de zero e as frações de baixo peso molecular (ácidos húmicos brunos e principalmente ácidos fúlvicos) resultam no segundo pico com valor de K_d próximo de 0,6. Semelhante distribuição também foi observada por Danneberg & Ullah (1982) e Machado & Gerzabek (1993).

O cromatograma dos extratos de substâncias húmicas do solo sob PD apresenta configuração similar ao observado no solo sob floresta secundária, onde os teores de ácidos húmicos cinza, ácidos húmicos brunos e ácidos fúlvicos não diferem significativamente. Semelhante comportamento também se observa no cromatograma das substâncias húmicas do solo sob PC, exceto para algumas frações de menor peso molecular (ácidos húmicos brunos e principalmente ácidos fúlvicos) com teores mais baixos (Figura 2). Quanto aos teores totais de substâncias húmicas extraídas, observou-se uma tendência do solo sob floresta em apresentar as maiores quantidades, seguido do solo sob PD e, finalmente, sob PC (Figura 3). Na Figura 4 são apresentadas as medidas de distribuição do peso molecular ($E1/E2\%$), onde os

solos cultivados apresentam os maiores valores indicando, em relação ao solo sob floresta, maior predominância de moléculas de alto peso molecular (ácidos húmicos cinza). Machado & Gerzabek (1993), utilizando o mesmo procedimento para o mesmo solo, também obtiveram semelhante resultado, mas os teores foram bem menores devido provavelmente à profundidade amostrada (0-20cm). Estes autores também observaram o efeito de 8 anos do preparo do solo na diminuição de frações de baixo peso molecular causada pelo plantio convencional.

Na Figura 5 são apresentados os cromatogramas das substâncias húmicas extraídas de dois Latossolos com diferentes características químicas e físicas e o comportamento do alumínio presente na matéria orgânica durante a cromatografia. Pode-se observar que o alumínio coincidiu com todos os principais picos, exceto para o segundo pico obtido no extrato referente ao LVd. A cromatografia por exclusão em coluna pode se constituir num procedimento útil na identificação de complexação orgânica de metais. No nosso estudo houve, todavia, baixa recuperação do alumínio após cromatografia (37,2% para LVef e 48,0% para o LVd) devido, possivelmente, ao alto valor de pH da solução eluente ($\text{pH} \cong 9,0$). Constata-se que há uma maior afinidade do alumínio em se associar a substâncias húmicas de menor peso molecular. A maior quantidade de alumínio está coincidindo com o segundo pico principal da substância húmica, que se refere a ácidos húmicos brunos e principalmente a ácidos fúlvicos (Figura 5A). Por outro lado, na Figura 5B, observa-se que a maior concentração de alumínio do extrato húmico do LVd foi eluída também no segundo pico, mas numa posição diferente, que poderia ser referente a substâncias não-húmicas, ou seja, ácidos orgânicos de baixo peso molecular (por exemplo, ácido cítrico), que comprovadamente têm alta afinidade para se associar com alumínio.

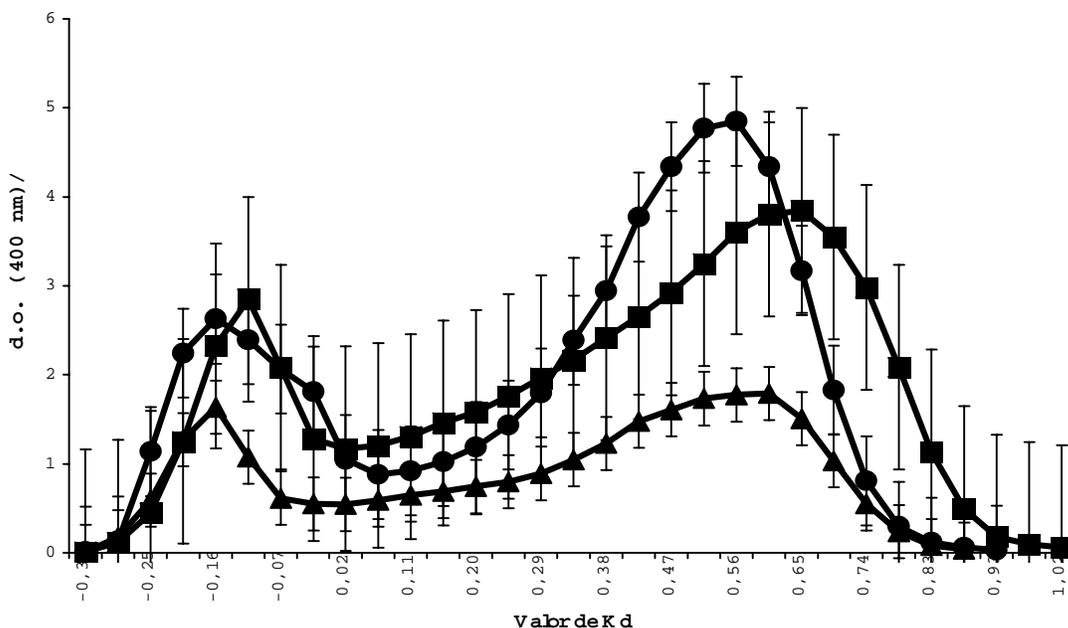


FIGURA 2. Cromatogramas dos extratos de substâncias húmicas de um Latossolo Vermelho distroférico de Londrina, PR. ● se refere ao solo sob floresta secundária; ■ se refere ao solo sob plantio direto; ▲ se refere ao solo sob plantio convencional (uma aração seguida de duas gradagens leves niveladoras). Barras verticais indicam o desvio padrão no campo ($n = 3$).

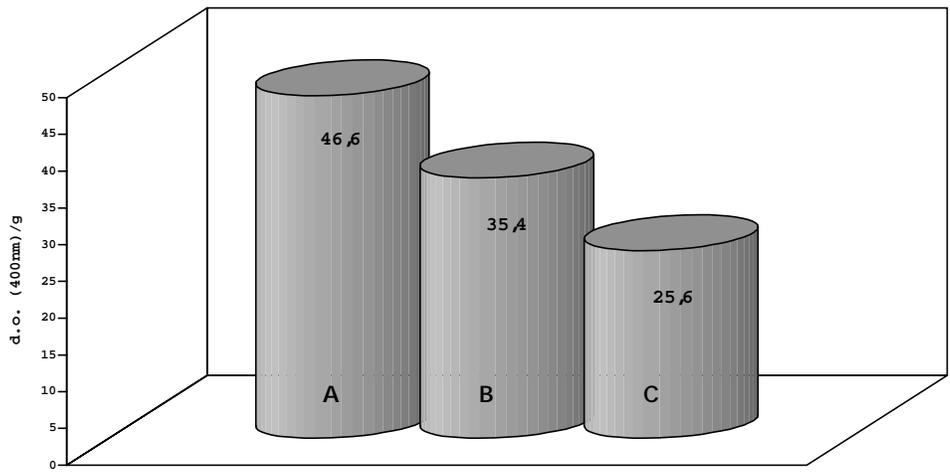


FIGURA 3. Teores totais de substâncias húmicas extraídas (d.o. = densidade ótica do extrato total a 400nm) de um Latossolo Vermelho eutroférico de Londrina, PR. A se refere ao solo sob floresta secundária; B se refere ao solo sob plantio direto e C se refere ao solo sob plantio convencional (uma aração seguida de duas gradagens leves niveladoras).

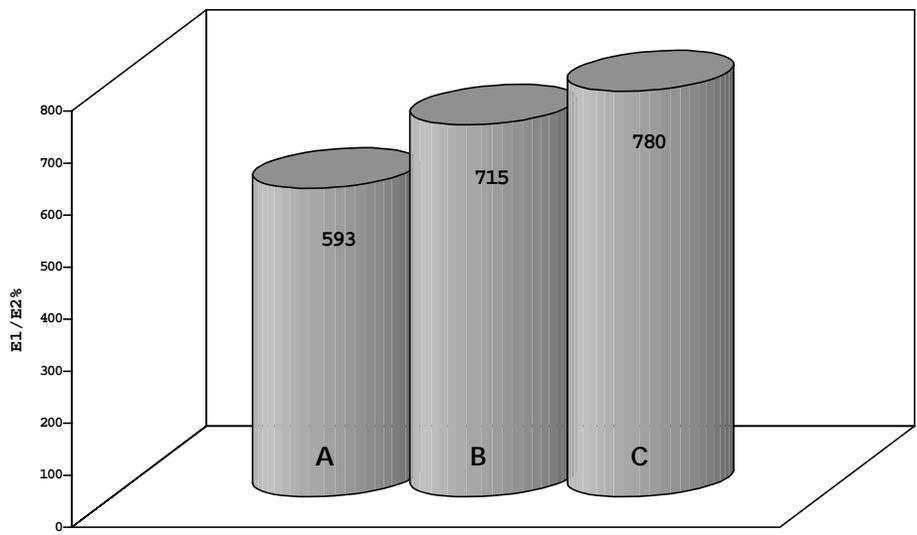


FIGURA 4. Medida da distribuição do peso molecular (E1/E2%) das substâncias húmicas de um Latossolo Vermelho eutroférico de Londrina, PR. A se refere ao solo sob floresta secundária; B se refere ao solo sob plantio direto e C se refere ao solo sob plantio convencional (uma aração seguida de duas gradagens leves niveladoras).

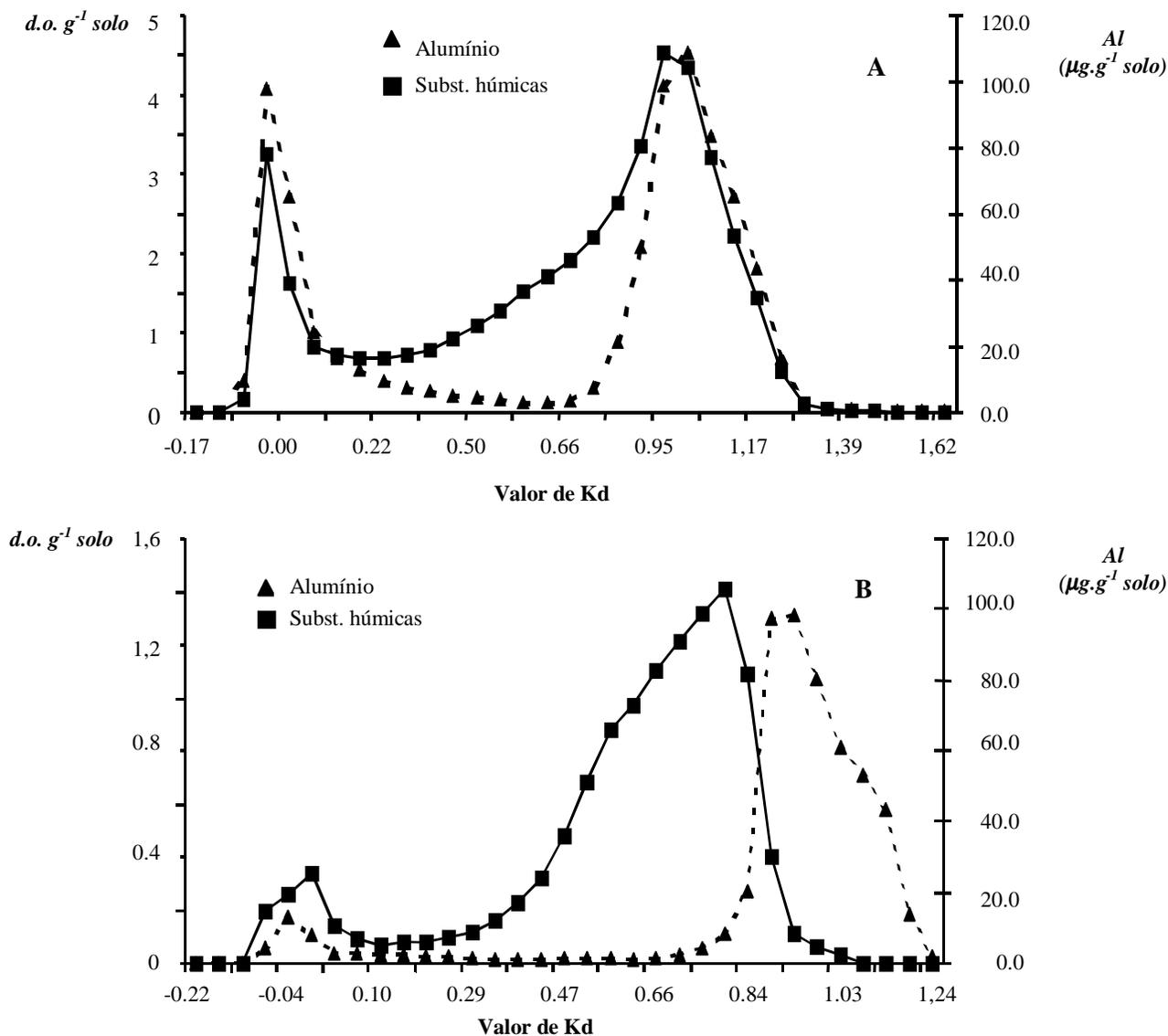


FIGURA 5. Cromatogramas de substâncias húmicas e teor de alumínio associado de Latossolo Vermelho eutroférico (A) sob floresta de eucalipto ($Al_{troc.} = 12mmolc.kg^{-1}$; $C_{org.} = 50,0g.kg^{-1}$; teor de argila = $700g.kg^{-1}$) e de Latossolo Vermelho distrófico (B) sob floresta de *Pinus sp.* ($Al_{troc.} = 19mmolc.kg^{-1}$; $C_{org} = 7g.kg^{-1}$; teor de argila = $130g.kg^{-1}$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DANNEBERG, O.H. Chromatography of humic substances of controlled pore glass. In: SOIL organic matter studies: proceedings of a symposium on soil organic matter Studies Jointly organized by the International Atomic Energy Agency and the Food and Agriculture Organization of the United Nations in co-operation with Agrochimica and held in Braunschweig, 6-10 september 1976. Vienna: IAEA, 1977. v.2. p.221-228.

DANNEBERG, O.H. Eine moeglichkeit zur trennung von huminstoffen und nichthuminstoffen. *Die Bodenkultur*, Vienna, n.32, p.93-104, 1981.

- DANNEBERG, O.H.; ULLAH, S.M. Chromatographische unterscheidung von huminstoffen und nichthuminstoffen aus schwarzerdehumus. **Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde**, Weinheim, v.145, p.526-538, 1982.
- DE NOBILI, M.; GJESSING, E.; SEQUI, P. Sizes and shapes of humic by gel chromatography. In: HAYES, M.H.B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S., ed. **Humic substances II: in search of structure**. New York: J. Wiley, 1989, p.561-591.
- GERZABEK, M.H.; ULLAH, S.M. Humic substances in soils from Bangladesh, Namibia and Canada. **International Agrophysics**, Budapest, v.5, n.3/4, p.197-203, 1989.
- HALLER, W. Chromatography on glass of controlled pore size. **Nature**, London, v.206, n.4985, p.693-696, 1965.
- KONONOVA, M.M. **Soil organic matter: its nature, its role in soil formation and in soil fertility**. 2.ed. New York: Pergamon Press, 1966. 544p.
- MACHADO, P.L.O. de A.; GERZABEK, M.H. Tillage and crop rotation interactions on Humic substances of a Typic Haplorthox from southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v.26, n.3, p.227-236, 1993.
- MEHTA, N.C.; DUBACH, P.; DEUEL, H. Investigation on the molecular weight distribution of humic substances by gel filtration through Sephadex. **Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung, Duengung, Bodenkunde**, Weinheim, v.102, p.128-137, 1963.
- PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. **Nature**, London, v.183, p.1657-1659, 1959.
- STEERE, R.L.; ACKERS, G.K. Restricted-diffusion chromatography through calibrated columns of granulated agar; a simple method for particle-size determination. **Nature**, London, v.196, n.4853, p.475-476, 1962.
- TAN, K.H. **Principles of soil chemistry**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. 362p.
- TAN, K.H.; GIDDENS, J.E. Molecular weights and spectral characteristics of humic and fulvic acids. **Geoderma**, Amsterdam, v.8, p.221-229, 1972.

Tiragem: 50 exemplares

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

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO**

**GOVERNO
FEDERAL**
Trabalhando em todo o Brasil

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