



Fracionamento físico do solo por densidade e granulometria para a quantificação de compartimentos da matéria orgânica do solo - um procedimento para a estimativa pormenorizada do seqüestro de carbono pelo solo

Pedro Luiz Oliveira de Almeida Machado¹

Introdução

Normalmente a quantificação da matéria orgânica do solo (MOS) se faz pela determinação do carbono orgânico total, pois ele compõe de 48% a 58% da massa da matéria orgânica do solo (Nelson & Sommers, 1982). O procedimento de análise normalmente adotado pelos diversos laboratórios de análise de solo no Brasil envolve a combustão por via úmida (Embrapa, 1997; Silva et al., 1998). Todavia, como se pode observar na Figura 1, a matéria orgânica se associa com as partículas minerais do solo de diferentes maneiras resultando em diferentes velocidades de decomposição e, conseqüentemente, em diferentes potenciais de emissão de CO₂ para a atmosfera. A análise de carbono orgânico total pela combustão por via úmida quantifica todos os compartimentos apresentados na Figura 1, não oferecendo uma estimativa das proporções de carbono orgânico nos diferentes compartimentos do solo. A ilustração apresentada na Figura 1 demonstra que o solo, no que tange ao arranjo das componentes orgânica morta e mineral, é constituído por complexos organo-minerais secundários (COM-secundários) e matéria orgânica não complexada livre (MONC-livre). Os COM-secundários, por sua vez, resultam da união de COM primários, aprisionando matéria orgânica não-complexada oclusa (MONC-oclusa).

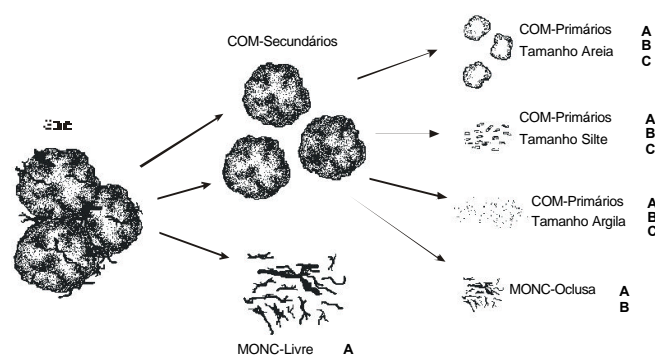


Fig. 1. Modelo descritivo do arranjo espacial de partículas minerais e orgânicas do solo. As letras próximas a cada fração representam os mecanismos de proteção contra a decomposição: A, recalcitrância; B, oclusão; e C, complexação/ligação com as partículas minerais. Roscoe et al. (dados não publicados), baseado em Christensen (1996a, b, 2000).

¹ Pesquisador da Embrapa Solos, PhD em Solos e Nutrição de Plantas, Rua Jardim Botânico 1024 - Jardim Botânico - Rio de Janeiro/RJ - pedro@cnpn.embrapa.br.

A extração e fracionamento químico das substâncias húmicas do solo, cujo procedimento analítico já foi apresentado por Machado (1999), quantifica os compartimentos da matéria orgânica ilustrados na Figura 1, principalmente os complexos organo-minerais primários (COM-Primários) e que, pelas características do método, são denominados de substâncias húmicas do solo.

A Embrapa Solos vem adotando também um procedimento analítico para avaliar os teores de carbono e nitrogênio totais de compartimentos da matéria orgânica do solo presentes tanto como COM-Primários na argila, silte e areia, onde estão presentes 90% das substâncias húmicas do solo, mas também como complexos organo-minerais secundários (COM-Secundários) e matéria orgânica não-complexada livre (MONC-Livre). Trata-se do fracionamento físico do solo por densidade e granulometria. A MONC-Livre também é denominada de Fração Leve-Livre da matéria orgânica do solo (FLL) e a MONC-oclusa pode ser denominada de Fração Leve Intra-agregado (FLI). Embora ambas sejam frações leves, a quantificação separada deve ser executada, principalmente se o objetivo do estudo da dinâmica da matéria orgânica do solo envolver modelos de simulação. Isto se justifica pelo fato de Pillon (2000), Sohí et al. (2001) e Freixo et al. (2002a), utilizando técnicas de espectroscopia, terem constatado diferenças quanto à composição estrutural da matéria orgânica das frações leves-livres e leves intra-agregados, que resultam em diferentes níveis de recalcitrância.

No Brasil, alguns estudos envolvendo o fracionamento físico do solo para estudos da MOS já foram apresentados, mas o procedimento adotado compreendia apenas a quantificação de matéria orgânica associada às partículas de argila, silte e areia, ou seja, os COM-Primários (Silva et al., 1999; Freitas et al., 2000). Recentemente, Sohí et al. (2001) propuseram um procedimento laboratorial de fracionamento do solo para a modelagem da dinâmica da MOS, que extrai seqüencialmente a matéria orgânica entre e dentro de agregados e a associada às partículas de argila, silte e areia do solo. Na Embrapa Solos o procedimento de Sohí et al. (2001) foi parcialmente adaptado, ou seja, a segunda parte do procedimento, o fracionamento granulométrico para a quantificação do carbono e nitrogênio de COM-Primários, vem sendo feita com base no método da alíquota sugerido por Gavinelli et al. (1995). Normalmente, para se referir aos COM-Primários, utiliza-se também a expressão Fração Pesada. O procedimento adaptado já foi testado com sucesso em estudos da MOS de Latossolos argilosos de Passo Fundo, RS e Santo Antônio de Goiás, GO, sob floresta secundária e sob cultivo convencional (aração seguida de gradagem leve) e plantio direto (Freixo et al., 2002b; 2002c).

Basicamente, as frações leves-livres e leves intra-agregados são obtidas por separações seqüenciais em líquido denso, antes e após dispersão de agregados estáveis com ultra-som. Em seguida, através de peneiramento úmido e sedimentação, as frações associadas à areia, silte e argila são separadas. Este artigo visa apresentar detalhadamente o procedimento laboratorial para o fracionamento físico do solo para estudos da matéria orgânica atualmente empregado na Embrapa Solos. O líquido denso normalmente utilizado é uma solução de iodeto de sódio (NaI), que é tóxico. Ele pode ser substituído por politungstato de sódio ($\text{Na}_6(\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40})$), não tóxico, mas, embora possa ser recuperado para uso sucessivo (Six et al., 1998), é de altíssimo custo.

Princípio do Método

A matéria orgânica “leve” ou o “débris vegetal” é removida por flotação em solução densa de iodeto de sódio (NaI) antes e após aplicação de ultra-som com o auxílio de centrifugação. O fracionamento granulométrico da fração “pesada” ou organo-mineral (complexos organo-argiloso, organo-siltoso e organo-arenoso) é conduzido por peneiramento úmido (areia) e sedimentação gravitacional (silte e argila).

No fracionamento por densidade há necessidade de se utilizar três repetições, uma vez que a fração leve é bastante variável. O procedimento pode ser conduzido em Terra Fina Seca ao Ar (5g TFSA: 35mL NaI).

Para material de solo fresco o procedimento é conduzido em amostras de 15 gramas de solo parcialmente seco a 10% para minimizar efeito de diluição do agente de densidade. Solo fresco coletado três dias após chuva e transportados para laboratório praticamente não oferece problema de efeito de diluição. Assim, após coleta as amostras devem ficar armazenadas em refrigerador (4°C) e, caso não sejam analisadas em uma semana, devem ser congeladas.

O procedimento a ser descrito aqui enfocará apenas para o fracionamento de material de solo de amostras de TFSA. As marcas de produtos aqui apresentadas ou descritas não são recomendações e nem refletem propaganda comercial, mas significam apenas orientação para o leitor.

Fracionamento por densidade

Reagentes

- Iodeto de sódio comercial ou industrial (NaI);
- carvão ativado.

Vidrarias

- 6 x frascos de centrífuga NALGENE - policarbonato de 50mL com tampa rosqueável;
- hidrômetro ou densímetro pequeno (30cm de comprimento);
- proveta de plástico pequena para aferição da densidade do Nal;
- frasco de vidro ou plástico para armazenagem de solução de Nal;
- 2 recipientes ou béqueres de 500mL;
- frasco de vidro de 100mL para armazenagem da suspensão solo/água deionizada, visando posterior fracionamento por granulometria;
- 6 recipientes ou béqueres de vidro de 100mL;

Equipamentos

- Centrífuga de alta rotação;
- aparelho de sucção (Figura 2):
 - bureta com ponta recortada ou ponta de plástico rígido;
 - mangueira de borracha de silicone (comprimento: 1000mm; diâmetro interno: 6mm; diâmetro externo: 10mm);
 - bomba de vácuo;
 - sistema de filtragem - pode-se adotar o Sistema Asséptico 'Sterifil', cap. 250mL (Millipore - N° Cat. 1104700) ou a alternativa apresentada na Figura 2;
 - filtros Whatman de fibra de vidro tipo GF/A (2 microns - N° Cat. 1820 047);
- aparelho ultra-som com ponta e plataforma (saída de energia = 400J min⁻¹);
- estufa com ar forçado.



Fig. 2. Aparelho de sucção de frações leves da MOS. A - Ponta de plástico rígido; B - Bomba de vácuo; C - Alternativa ao Sistema Filtragem 'Sterifil' - Filtro de vidro siterizado contendo filtro Whatman GF/A.

Procedimentos

Todos os passos descritos a seguir devem ser executados no mesmo dia.

1. Pesar 5,00g de TFSA num frasco de centrífuga. Separe uma alíquota da amostra para determinar o teor de umidade atual, visando posterior apresentação dos resultados em relação ao solo seco. Importante frisar que TFSA pode conter de 3 a 8% de umidade;
2. utilizando uma proveta, adicione 35mL de solução de Nal (densidade igual a 1,80g cm⁻³, determinada com hidrômetro) a cada frasco. Tolerar-se variação na densidade de, no máximo, $\pm 0,1$ g cm⁻³, pois variações superiores resultam em problemas na dispersão da argila. Adicione mais Nal a cada frasco até o peso se igualar para a centrifugação. Agite manualmente e sutilmente (aproximadamente 100rpm) por 30 segundos visando dispersar os agregados instáveis e permitir que a fração leve-livre atinja a superfície da suspensão;
3. centrifugar por 30 minutos a 8.000 x *g*. Remova e transfira os frascos para o laboratório, passando rapidamente para o passo seguinte, pois os "pelets" da fração "pesada" podem rapidamente iniciar resuspensão;
4. com o auxílio de uma bureta de 25mL acoplada a uma pequena mangueira de borracha de silicone, conectada a uma bomba de vácuo, succione a solução de Nal e material orgânico flutuante (FLL) da garrafa de centrífuga girando vagarosamente a garrafa em seu eixo para retirar material orgânico aderido na parede do frasco e na superfície da suspensão. Cuidado para não resuspender o "pelet". A FLL aspirada juntamente com solução de Nal é imediatamente separada por filtração a vácuo (Sistema Asséptico Sterifil, 47mm – Millipore) contendo um filtro de fibra de vidro previamente tarado (secos em estufa a 40°C, anotando o peso com precisão de quatro casas decimais). A solução de Nal coletada no frasco receptor da filtragem é retornada para a garrafa de centrífuga contendo a amostra de solo remanescente. Visando eliminar o excesso de Nal, as amostras de FLL retidas nos filtros são copiosamente lavadas com água destilada. Para esta lavagem, deve-se trocar o frasco receptor do sistema asséptico. Após lavagem e antes de passar à próxima amostra, seque bem o receptor e os componentes do filtro com papel toalha. Qualquer resíduo de água no sistema pode contaminar a solução de Nal, alterando a densidade;
5. o filtro contendo a FLL é transferido para uma estufa para secagem a 60°C. Em seguida, é pesado com precisão de quatro casas decimais e finalmente moído (granulometria < 0,177mm ou 80mesh) para posterior determinação do teor de carbono e nitrogênio totais;

6. para extrair a fração leve intra-agregados (FLI), aplique ultra-som na suspensão contendo NaI e solo residual dentro dos frascos de centrífuga na intensidade de 400J min^{-1} . Visando minimizar o aumento brusco da temperatura da suspensão, a garrafa de centrífuga contendo a suspensão deve ficar contida em recipientes contendo gelo. A plataforma do ultra-som deve ser erguida para que a ponta do ultra-som fique submersa a 19mm da superfície da suspensão. Após sonificação, remova as garrafas dos recipientes e seque-os externamente;
7. proceda o rebalanceamento dos frascos adicionando mais solução de NaI com subsequente centrifugação e remoção da FLI como descrito nos tópicos 3, 4 e 5. O material de solo remanescente na garrafa de centrífuga será utilizado para o fracionamento granulométrico. Não descarte o filtrado contendo solução de NaI. Esta será armazenada num frasco de plástico. Visando remover carbono solúvel para a reutilização da solução de NaI, adiciona-se 25g de carvão ativado à solução de NaI usada e, após agitação por 30 minutos, a solução é filtrada em filtro de fluxo rápido e, em seguida, filtração a vácuo com filtro de fibra de vidro. Após checagem da densidade com mais adição de NaI ou água, a solução pode ser reutilizada;
8. através de pipete com água destilada, transfira o material de solo remanescente no fundo da garrafa de centrífuga para um recipiente de vidro de 100mL (caso o procedimento seja conduzido com 3 repetições no laboratório, transferir o material de solo remanescente de todas as garrafas com o mínimo volume de água possível) e armazene no laboratório para passar para o próximo passo. Devido à centrifugação, a amostra de solo estará compactada no fundo da garrafa de centrífuga. Assim, adicione um pouco de água destilada, tampe o frasco e agite vigorosamente para remover o material de solo. Em seguida, tente transferir o "pelet" inteiro para o frasco. Para solos muito argilosos, antes de adicionar água, remova o "pelet" com uma espátula e transfira-o para o frasco com cuidado. Após, lave bem a garrafa com água deionizada visando remover totalmente o material de solo presente. Este esmero é importante principalmente se o fracionamento granulométrico envolver quantificação total das partículas de argila, silte e areia.

Obs.: quando a solução de NaI apresentar variação de $\pm 0,2\text{g cm}^{-3}$ na solução estoque, transferir uma alíquota de 800mL para um béquer de plástico ou vidro e, com o auxílio de um agitador automático com "peixinho", adicionar mais NaI ou água destilada para ajustar a densidade para $1,8\text{g cm}^{-3}$.

Fracionamento por granulometria

Reagentes

- Hexametáfosfato.

Vidraria

- Provetas de 1.000mL (vidro ou plástico) marcadas de 0 a 25cm, iniciando a 3cm acima da indicação de volume 0 na proveta;
- Béquer de 250mL (vidro ou plástico);
- frascos de 2.000mL.

Equipamentos

- Centrífuga de alta rotação.
- Agitador horizontal para 250rpm.

Procedimentos

1. Tarrar todos os béqueres ou recipientes de vidro;
2. transferir a suspensão contendo o material de solo residual obtida a partir do fracionamento por densidade para um recipiente de plástico e completar o volume até 300mL. Adicionar 0,5g de hexametáfosfato e deixar a suspensão em repouso no refrigerador (aproximadamente 4°C). No dia seguinte, iniciar agitação por 6 horas a 250rpm (solos com areia $> 500\text{g kg}^{-1}$: 2 horas). Em seguida, a suspensão é transferida para a peneira de 0,53 mm contendo abaixo um recipiente coletor de 2.000 mL. Iniciar peneiramento úmido para separar a fração areia, utilizando água destilada de pipete com parcimônia, pois não se deve exceder o volume de 800 mL no frasco receptor abaixo da peneira. Assim que a água que passa pela peneira se apresentar incolor, transfira o material retido na peneira (fração areia) para um béquer de vidro de 250mL e levar para estufa para secagem a 60°C e posterior pesagem. Na manhã seguinte, a suspensão retida no frasco receptor abaixo da peneira é transferida para a proveta de 1000mL;
3. a separação da fração argila se dá por sedimentação de modo similar ao método da pipeta para a análise granulométrica do solo. O procedimento deve ser executado em sala com temperatura controlada de 25°C . Após transferência da suspensão contendo argila + silte, completa-se o volume da proveta com água destilada até 1.000mL, cobrir a proveta com vidro de relógio ou similar e deixar a suspensão em repouso até aproximadamente 16h00min. Em seguida, faz-se a

homogeneização vigorosa da suspensão por 20 segundos com um bastão, tendo este, na sua extremidade inferior, um êmbolo de borracha contendo furos e de diâmetro um pouco menor do que o da proveta. A homogeneização se dá pelo movimento do bastão no sentido da boca para o fundo e vice-versa. Marcar o tempo após concluir a homogeneização e medir, anotando em seguida, a temperatura da suspensão. Se a temperatura da suspensão for de 25°C, decorridos 4'15" após a homogeneização, 100mL da suspensão são coletados (fração argila + silte) 15 segundos antes do tempo de 4'15" e inserindo a pipeta a 10cm abaixo da superfície da suspensão. A pipetagem deve ser feita com sucção contínua para evitar turbilhonamento. A suspensão pipetada é transferida para bquer de vidro de 250mL, levada para estufa para secagem a 60°C e posterior pesagem. Após 3 horas 33 minutos de repouso, nova coleta de 100mL da suspensão é executada (fração argila) e, de modo similar ao procedimento para coleta da fração argila + silte, mas com a pipeta inserida a 5cm abaixo da superfície da suspensão, a alíquota é transferida para bquer de vidro, secada e pesada. A Tabela 1 apresenta o tempo necessário para se iniciar a pipetagem a diferentes temperaturas da suspensão;

4. todas as frações coletadas, após pesagem, são finamente moídas (granulometria < 177µm ou 80mesh) para determinação do teor de carbono e nitrogênio por combustão via seca.

Tabela 1. Tempo necessário, sob diferentes temperaturas da suspensão, para a sedimentação de partículas de solo com peso específico de 2,65. Para a partícula de argila ($\theta < 0,002\text{mm}$) foi considerada uma profundidade de 5cm e para a argila + silte ($\theta < 0,02\text{mm}$) foi considerada uma profundidade de 10cm.

Temperatura (°C)	Argila (5cm)	Argila + Silte (10cm)
18	4h13min	5h03min
19	4h05min	4h55min
20	4h00min	4h48min
21	3h55min	4h41min
22	3h50min	4h34min
23	3h43min	4h28min
24	3h38min	4h22min
25	3h33min	4h15min
26	3h28min	4h10min
27	3h23min	4h04min

Fonte: adaptado de Camargo et al. (1986).

Referências Bibliográficas

- CAMARGO, O. A.; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A.; VALADARES, J. M. A. S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1986. 94 p. (IAC. Boletim Técnico, 106).
- CHRISTENSEN, B. T. Structure and organic matter storage in agricultural soils. In: CARTER, M. R.; STEWART, B. A. (Ed.) **Structure and organic matter storage in agricultural soils**. Boca Raton: CRC Press, 1996a. p. 97-165. (Advances in Soil Science).
- CHRISTENSEN, B. T. Matching measurable soil organic matter fractions with conceptual pools in simulation models of carbon turnover: revision of model structure. In: POWLSON, D. S.; SMITH, P.; SMITH, J. V., (Ed.) **Evaluation of soil organic matter models**. Berlin: Springer-Verlag, 1996b. p. 143-159. (NATO ASI Series, Volume I, 38).
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.
- FREITAS, P. L.; BLANCANEUX, P.; GAVINELLI, E.; LARRÉ-LARROUY, M. C.; FELLER, C. Nível e natureza do estoque orgânico de Latossolos sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.35, p.157-170, 2000.
- FREIXO, A. A.; CANELLAS, L. P.; MACHADO, P. L. O. A. Propriedades espectrais da matéria orgânica leve-livre e leve intra-agregados de dois Latossolos sob plantio direto e preparo convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 445-453, 2002a.
- FREIXO, A. A.; MACHADO, P. L. O. A.; SANTOS, H. P.; SILVA, C. A.; FADIGAS, F.S. Soil organic carbon and fractions of a Rhodic Ferralsol under the influence of tillage and crop rotation systems in Southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 64, p. 221-230, 2002b.
- FREIXO, A. A.; MACHADO, P. L. O. A.; GUIMARÃES, C. M.; SILVA, C. A.; FADIGAS, F. S. Estoques de carbono e nitrogênio e distribuição de frações orgânicas de Latossolo do Cerrado sob diferentes sistemas de cultivo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 425-434. 2002c.
- GAVINELLI, E.; FELLER, C.; LARRÉ-LARROUY, M. C.; BACYE, B.; DJEGUI, N.; NZILA, J. D. A routine method to study soil organic matter by particle-size fractionation: examples for tropical soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Athens, v. 26, n. 11-12, p. 749-1760. 1995.

MACHADO, P. L. O. A. **Método para a extração de substâncias húmicas do solo.** Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 4 p. (Embrapa Solos. Comunicado Técnico, 1).

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R., (Ed.) **Methods of soil analysis.** Madison: ASA Inc., 1982. p. 539-579.

PILLON, C. N. **Alterações no conteúdo e qualidade da matéria orgânica do solo induzidas por sistemas de cultura em plantio direto.** 2000. 232 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

SILVA, F. C.; EIRA, P. A.; BARRETO, W. O.; PÉREZ, D. V.; SILVA, C. A. **Manual de métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo.** Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1998. 56 p. (Embrapa Solos. Documentos, 3).

SILVA, C. A.; ANDERSON, S. J.; VALE, F. R. Carbono, nitrogênio e enxofre em frações granulométricas de dois Latossolos submetidos à calagem e adubação fosfatada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 593-602, 1999.

SIX, J.; ELLIOTT, E. T.; PAUSTIAN, K.; DORAN, J. W. Aggregation and soil organic matter accumulation in cultivated and native grassland soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 62, p. 1367-1377, 1998.

SOHI, S. P.; MAHIEU, N.; ARAH, J. R. M.; POWLSON, D. S., MADARI, B.; GAUNT, J. L. A procedure for isolating soil organic matter fractions suitable for modelling. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p.1121-1128, 2001.

Comunicado Técnico, 09

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Solos
Endereço: Rua Jardim Botânico, 1024 Jardim Botânico - Rio de Janeiro, RJ
Fone: (21) 2274.4999
Fax: (21)2274.5291
E-mail: sac@cnps.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2001): 100 exemplares

Expediente

Supervisor editorial: *Jacqueline Silva Rezende Mattos*
Revisão de Português: *André Luiz da Silva Lopes*
Tratamento editorial: *Jacqueline Silva R. Mattos*
Editoração eletrônica: *André Luiz da Silva Lopes*
Deborah Caroline da S. Vieira