

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CASIANO ALBERTO DHEIN

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS
PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM BIOESTIMULANTES
LÍQUIDOS COMERCIAIS**

Porto Alegre
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CASIANO ALBERTO DHEIN

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS
PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM BIOESTIMULANTES
LÍQUIDOS COMERCIAIS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de química industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Prof^a. Dr^a. Deborah Pinheiro Dick
Orientadora

Porto Alegre
2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai, Guia e Protetor de Luz que me acompanha.

A minha orientadora, professora Doutora Deborah Pinheiro Dick, pelo profissionalismo, dedicação, empenho e pela disponibilidade em ouvir, analisar e me aceitar como orientando.

Aos meus pais Selmira Weiss e Valdir Romeu Dhein que sempre me ensinaram e incentivaram a vencer obstáculos, norteando com afeto e competência minha vida profissional.

Agradeço à minha esposa Viviane de Fátima Oliveira pelo carinho, paciência e companheirismo durante este período de minha vida.

Agradeço a todos os professores que, de um modo geral, contribuíram para a minha formação acadêmica.

Agradeço a todos meus amigos que estiveram comigo durante esta longa caminhada. A Vanessa Lima e a Ana Paula Zanatta pela amizade e o companheirismo desde o primeiro dia de aula e sempre permaneceram ao meu lado. Aos colegas do Laboratório K110 em especial a Andressa Classer Bender e a Luana Bottezini por todo apoio neste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de poder ter uma formação de qualidade.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade.

Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo é tentar mais uma vez.

Thomas Edison

RESUMO

O efeito benéfico das substâncias húmicas (SH) no desenvolvimento de culturas agrícolas tem sido evidenciado na última década, levando à comercialização de produtos húmicos com propriedades bioestimulantes. Nesse cenário é importante a quantificação dos ácidos fúlvicos (AF) e húmicos (AH), os quais compõem as SH para a recomendação da dose adequada a ser empregada nas culturas. Atualmente, três métodos são mais utilizados para esse fim: (i) método de manual de métodos do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); (ii) método empregado pela Associação de Comércio de Produtos Húmicos (HPTA) dos Estados Unidos (“Lamar”) e (iii) método utilizado para determinação e substâncias húmicos em solos (“Solos”). No Brasil, os produtos comerciais não adotam método de quantificação comum e as informações nos rótulos são discrepantes. Esse estudo tem como objetivo geral avaliar os três métodos de quantificação de SH em bioestimulante líquidos comerciais acima mencionados e comparar os resultados. Para os bioestimulantes ricos em AH as metodologias estudadas apresentaram valores próximos para os teores de AH e AF. Já para os produtos ricos em AF, as metodologias que utilizam dicromato para oxidar o carbono orgânico superestimaram os resultados de AF, tomando-se como base o “método Lamar” que determina gravimetricamente as SH purificadas. O tempo de análise variou entre as metodologias estudadas, bem como o tipo e volume de resíduo gerado. Baseando-se no princípio químico de determinação de SH do método e no impacto ambiental do resíduo gerado, o método mais adequado para determinação de SH em bioestimulantes líquidos é o de “Lamar”.

Palavras-chave: Substâncias húmicas; Métodos; Bioestimulantes.

ABSTRACT

The beneficial effect of humic substances (HS) on crop development has been evidenced in the last decade, leading to the commercialization of humic products with biostimulating properties. In this scenario, it is important to quantify fulvic (FA) and humic acids (HA), the two components of HS, to recommend the appropriate dose to be used in the cultures. Currently, three methods are most commonly used for this purpose: (i) a method described in the methods manual of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA); (ii) method employed by the United States Humic Trade Association (HPTA) (“Lamar”) and (iii) method used for the determination of soil humic substances (“Soil”). In Brazil, commercial biostimulants do not adopt a common quantification method and information on labels is discrepant among products. The main objective of this study is to evaluate the three methods of quantification of humic substances in commercial liquid biostimulants, mentioned above, and to compare the results. For the HA-rich biostimulants the studied methodologies presented values close to the HA and FA contents informed in the labels. For products rich in FA, the methodologies that use dichromate to oxidize organic carbon overestimated the results of FA, based on the “Lamar method”, that determines gravimetrically the purified FA and HA. The time of analysis varied between the methodologies studied, as well as the type and volume of waste generated. Based on the chemical principle of HS determination of the method and the environmental impact of the waste generated, we concluded that the most appropriate method for determination of HS in liquid biostimulants is that of “Lamar”.

Keywords: Humic substances; Methods; Biostimulants.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores de AF, AH e carbono orgânico total fornecidos no rótulo dos bioestimulantes comerciais.....	19
Tabela 2 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método Lamar.....	21
Tabela 3 - Concentração de sólidos dos bioestimulantes determinados por secagem em estufa e em liofilizador.....	29
Tabela 4 - Composição elementar, relação carbono: nitrogênio (C/N) e teor de cinzas dos bioestimulantes determinados em amostras liofilizadas.....	30
Tabela 5 - Teores de AH e de AF determinados pelos métodos MAPA 2006 e MAPA 2017, nos bioestimulantes.	31
Tabela 6 - Teores de ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) dos bioestimulantes nos diferentes métodos de quantificação.....	33
Tabela 7 - Quantidade de insumos utilizada e respectivo custo e volume de resíduo gerado para cada método estudado.....	37
Tabela 8: Lista de equipamento utilizada por análise.....	38
Tabela 9: Custo médio estimado para a análise de uma amostra em triplicata dos bioestimulantes.....	39

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

LD – LIMITE DE DETECÇÃO

LQ – Limite de quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mf – Massa de fertilizante após a secagem

mol L⁻¹ – Mol por litro

p.a. – Para análise

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

v/v – Volume-volume

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	10
2. ESTADO DA ARTE	12
2.1. Substâncias húmicas	12
2.2. Bioestimulantes	13
3. SITUAÇÃO ATUAL	15
4. OBJETIVOS.....	18
5. PROPOSTA TECNOLÓGICA.....	19
6. METODOLOGIA	20
6.1. Bioestimulantes comerciais.....	20
6.2. Métodos.....	20
6.2.1. Caracterização dos produtos.....	20
6.2.1.1. Concentração de sólidos suspensos.....	20
6.2.1.2. Teor de cinzas	22
6.2.1.3. Composição elementar	22
6.2.2 Quantificação das SH	22
6.2.2.1. Método HTPA “Lamar”	22
6.2.2.2 Método “MAPA 2006” e “MAPA 2017”	24
B.1 MAPA 2006	24
B.1.1. Determinação da concentração de EHT.	25
B.1.2. Determinação da concentração de AH	26
B.1.3. Determinação da concentração de AF.....	26
B.2. MAPA 2017	26
6.2.2.3. Método para solos (“Dick”) (Dick <i>et al</i> , 1998)	28
C.1. Extração das SH	28
C.2. Quantificação das SH.....	29
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
7.1. CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS	30
7.2. TEOR DE CINZAS E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR.....	31

7.3. TEORES DE AH E AF: COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS MAPA 2006 E MAPA 2017.	32
7.4. TEORES DE AH E AF: COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS MAPA 2006, Lamar E DICK.	33
7.5. TEORES DE AH E AF: COMPARAÇÃO COM OS DADOS FORNECIDOS NOS RÓTULOS DOS BIOESTIMULANTES	36
8. CONSUMO DE INSUMOS E RESÍDUOS GERADOS	38
9. CONCLUSÕES	42
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. APRESENTAÇÃO

Segundo a ONU, até 2050 a população mundial chegará a 9,6 bilhões, um crescimento de aproximadamente 26% em relação aos 7,2 bilhões atuais (ONU 2019). Juntamente ao aumento da população mundial a produção de alimentos deve aumentar e conseqüentemente o uso de insumos químicos para a produção desses alimentos. Atualmente os insumos químicos são essenciais na agricultura para produção em grandes quantidades de alimentos, porém, o uso indiscriminado e de forma não consciente desses produtos causa danos graves ao meio ambiente (Santos e Paes, 2016).

Nas últimas décadas, inúmeros casos de contaminação do solo em virtude da intensa utilização de fertilizantes vêm sendo relatados o que tem gerado preocupações para os ambientalistas. Estes afirmam que o problema atinge não somente o solo em si, mas o ambiente global da área afetada (vegetação, ar, fauna, águas superficiais e subterrâneas), podendo resultar em problemas de saúde pública (Santos e Paes, 2016).

Diante disso, a agricultura atual necessita encontrar estratégias tecnológicas que diminuam o uso de insumos químicos que prejudiquem o meio ambiente sem diminuir a produção de alimentos. Uma alternativa encontrada por diversas indústrias mundiais para este problema, é a utilização de bioestimulantes à base de substâncias húmicas (SH).

Substâncias húmicas são produtos da humificação de resíduos vegetais e animais, os quais interagem entre si por meio de forças não covalentes e de caráter hidrofóbico, formando supraestruturas moleculares (Piccolo *et al.*, 2016).

Uma fonte rica em SH são as minas de carvão de baixo *rank*, como as minas de leonardita. Essa fonte de SH é utilizada por diversas empresas, e já patentearam produtos à base de ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) obtidos dessas minas, tais como as existentes nos Estados Unidos, Austrália, China, entre outros. A maioria desses produtos são comercializados na forma líquida.

A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) recomenda que a determinação de AH e AF seja através da solubilização em meio básico, precipitação do AH em meio ácido e a purificação do AF realizada pelo método de adsorção de resina DAX-8 (Lamar *et al.*, 2014). Já o Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA), que é o órgão regulamentador dos produtos agrícolas comerciais no Brasil quantifica os teores de AH e AF pelo método de oxidação do carbono com solução ácida de dicromato, seguida de titulação com sulfato ferroso.

Em pesquisa, a quantificação das SH pode ser feita pela oxidação do carbono orgânico por dicromato em solução ácida preparada com ácido sulfocrômico, e sua determinação realizada pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm (Dick *et al.*, 1998). A curva de calibração é realizada com soluções de frutose na faixa de concentração de 0 a 300 ppm.

Os métodos acima mencionados diferem quanto aos princípios de quantificação das SH, quanto à quantidade e toxicidade de resíduos gerados, quanto ao custo operacional, e quanto ao tempo de execução para cada análise. Em função disso, para quantificação de substâncias húmicas em fertilizantes líquidos é necessário que se identifique um método que forneça resultados confiáveis no que diz respeito aos teores, com baixo custo e que gere a menor quantidade de resíduos possíveis.

Em vista do exposto, esse trabalho se propõe a testar três métodos na quantificação de SH em bioestimulantes líquidos comerciais e identificar o método que gere resultados coerentes e com menor impacto ambiental.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Substâncias húmicas

As SH, segundo Dick *et al.* (2011), compõem a fração coloidal da matéria orgânica do solo e são formadas por processo bióticos e abióticos em menor escala, contribuindo, em torno de 85 a 90% do teor total do carbono orgânico do solo.

Pesquisadores que trabalham com extratos húmicos geralmente dividem a matéria orgânica em três frações principais, as quais compõem as SH: AH, que é solubilizado em meio alcalino, mas se torna insolúvel em meio ácido; AF definido como o material solúvel em meio alcalino e ácido; e humina, que é a fração que não é extraída em meio alcalino. A IHSS definiu AF como o material solúvel em meio alcalino e ácido e que é adsorvido em uma resina não iônica, distinguindo-a da matéria orgânica que é muito hidrofílica, mesmo em pH baixo e que se não adsorve na resina (Swift, 1996). A etapa de sorção da resina para purificar o AF foi adotada a partir do procedimento de isolamento de HA e AF. Observamos que as frações de AH e AF são definidas operacionalmente e não pela sua composição química. (Olk *et al.* 2019)

Um a das fontes possíveis de SH é a leonardita. Esse tipo de matéria orgânica apresenta alto grau de oxidação, resulta do processo de formação de carvão, e não tem valor como combustível.

Segundo Piccolo (2001), as SH são formadas por agregados supramoleculares, o que vai de encontro ao o conceito de macromoléculas formulado anteriormente por Stevenson (1994). A teoria de Piccolo para a estrutura de SH tem sido a mais aceita ultimamente pelos pesquisadores. A teoria de Piccolo pressupõe que as supramoléculas de SH são formadas pela associação de moléculas orgânicas na forma de micelas onde, estruturas hidrofóbicas estão posicionadas no seu interior e, as estruturas contendo grupos hidrofílicos, ficam na parte externa. Estas moléculas são unidas por forças fracas, tipo Van der Wals, e por ligações de hidrogênio, as quais podem ser rompidas por meio dos ácidos

orgânicos exsudados pelas raízes de plantas ou por microrganismos do solo (Piccolo 2001).

As SH podem ser extraídas de várias fontes, como por exemplo de solos, produtos de compostagem, de leonardita, carvões e turfas (Passos *et al.* 2007)

A solubilidade das SH em diferentes níveis de pH se deve principalmente à proporção de grupos funcionais e tamanho da supramolécula (Piccolo, 2001). Tanto os AF como os AH apresentam grupos funcionais oxigenados, que em meio alcalino, se desprotonam gerando repulsão entre suas moléculas que permanecem em solução. O contra-íon Na^+ solvatado, ao neutralizar essas cargas por meio de interações eletrostáticas, expande a dupla camada elétrica e promove a solubilização.

Ao acidificar-se o meio, os AF protonados, por serem estruturas relativamente menores do que as dos AH, permanecem em solução. Já os AH, ao se protonarem em meio ácido, precipitam graças à atuação das ligações de hidrogênio, formando estruturas maiores que colapsam e precipitam. (Piccolo, 2001)

2.2. Bioestimulantes

Os bioestimulantes são substâncias que podem, mesmo não contendo elementos nutritivos em sua composição, estimular o crescimento das plantas, melhorar a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, aumentar a produtividade, mesmo sob condições de estresse ambiental. (Amador, Helen Veobides, *et al* 2018).

De acordo com Oliveira e Sousa (2016), os bioestimulantes são definidos como sendo uma mistura de “reguladores de crescimento, compostos por hormônios vegetais ou hormônios sintéticos que, quando aplicados na planta, agem diretamente na fisiologia do vegetal, potencializando o seu desenvolvimento”.

Segundo Canellas *et al.* (2015), as SH estimulam a produção de hormônios vegetais naturais que influenciam os mecanismos fisiológicos no desenvolvimento vegetal. Neste sentido, os autores explicam que os AH presentes nas SH, aperfeiçoam o processo de absorção da água e de nutrientes que se encontram presentes no solo, estimulado pelo aumento da síntese de H^+ -ATPase da membrana. H^+ -ATPase, funciona como uma bomba de prótons acionada pela hidrólise de ATP, sendo responsável pelo transporte primário de H^+ do interior da

célula para o apoplasma, formando um gradiente de H^+ gerado através da membrana plasmática. Esse gradiente de H^+ energiza o transporte secundário de íons e outros metabólitos contra um gradiente de concentração. O AH acidifica a parede celular causando uma ativação da bomba H^+ -ATPase na membrana plasmática. Essa ativação, estimula o crescimento ácido que está associado com a ação da auxina, um hormônio vegetal que também ativa a H^+ -ATPase (Baldotto e Baldotto, 2014).

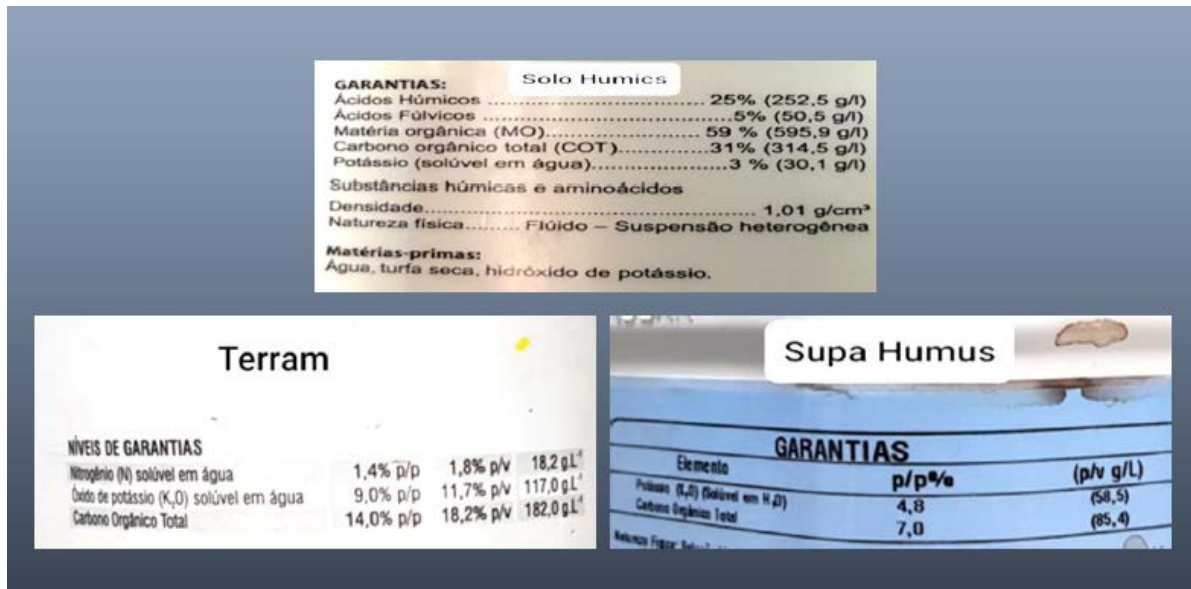
Os bioestimulantes podem ser formados por diferentes proporções de AF, AH, extratos de algas e aminoácidos. (Teixeira, 2018)

Considerando-se que, durante os anos 1992 a 2010, o Brasil duplicou a quantidade de fertilizantes importados (IBGE, 2012), o aumento do uso de SH na agricultura ocasionou um acentuado interesse entre produtores, consumidores e reguladores por se ter um método que fosse preciso e confiável a fim de se estimar o AH e o AF em minérios e produtos brutos.

3. SITUAÇÃO ATUAL

O tipo de informação que consta nos rótulos de bioestimulantes difere grandemente entre os produtos existentes no mercado. Por exemplo, alguns bioestimulantes informam o teor de ácidos húmicos e fúlvicos, porém não informam qual o método utilizado, enquanto outros informam apenas o teor de carbono orgânico total (Figura).

Figura 1: Informações dos rótulos dos produtos Solo humics, terram e Supa Humus.



Outros bioestimulantes apresentam em seus rótulos informações com até três metodologias, e cada metodologia com quantidades de AH e AF diferentes (Figura 2).

Figura 2: Informações dos rótulos dos produtos GrowMate Soil (GS) e GrowMate Plant (GP).

Contate-Nos



Soil

GROWMATE™ BULLETIN SOLO DOS PRODUTOS

FUNÇÃO
Soil potenciador

ANÁLISE GARANTIDA

Ácidos húmicos 16%
Componentes inertes 84%
(ácido húmico derivado da leonardita)
Método de análise: 4

ácidos húmicos reais 1,44%
(ácido húmico derivado da leonardita)
Método de análise: JAOAC 97 (3): 721-730 (2014)
Método de análise padrão aprovado pela HPTA.

Ácidos Húmicos 1,50%
(Ácido Húmico Derivado da Leonardita)
Método de análise: CDFA



GROWMATE™ PLANTA DO PRODUTO BULLETIN

FUNÇÃO

regulador de crescimento

Ácidos fúlvicos <0,05%
(ácido fúlvico derivado da leonardita)
Método de análise: CDFA

ANÁLISE GARANTIDA

Ácidos fúlvicos 36%
componentes inertes 64%
(ácido fúlvico derivado da leonardita)
Método de análise: 4

ácidos fúlvicos reais 1,35%
ácidos fúlvicos hidrofóbicos 2.300 ppm
(ácido fúlvico derivado da leonardita)
Método de análise: JAOAC 97 (3): 721 -730 (2014)

Para o adequado uso com fins agrônômicos e comparação da eficiência de produtos é necessário que as informações dos rótulos sejam compatíveis entre os diferentes produtos existentes no mercado.

A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e a Associação de Comércio de Produtos Húmicos (HPTA) dos USA, recomendam a utilização do método de Lamar *et al*, (2014), a ser denominado doravante de “método Lamar”. O “método Lamar” separa os AH dos AF por acidificação do meio. A seguir os AH são precipitados e secos enquanto a fração de AF é purificada por passagem em resina DAX-8 em Amberlite IR 120. As duas frações secas à 60 °C são quantificadas gravimetricamente, descontando-se o respectivo teor de cinzas determinado a 500°C.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) utiliza um método que se baseia na oxidação da matéria orgânica com dicromato e consta no Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos, e que será denominado doravante “método MAPA”. Nesse método, as frações de extrato húmico total, de AH e AF, são quantificados por oxidação do C no sobrenadante com solução ácida de dicromato e posterior titulação com sulfato ferroso amoniacal.

No laboratório de nosso grupo de pesquisa em Ciência do Solo, a quantificação do extrato húmico (SH) e dos AF também é realizada por oxidação da matéria orgânica com solução sulfocrômica ácida, medindo-se a absorbância em espectrofotômetro a 580 nm após 4 h de reação a 60°C. (Dick *et al*. 1998). A curva de calibração é feita com soluções de frutose na faixa de concentração de 0 a 300 ppm. Esse método será doravante denominado “método Dick”.

4. OBJETIVOS

O objetivo principal desse estudo é comparar três métodos de quantificação de SH em diferentes bioestimulantes líquidos comerciais e identificar entre os mesmos, o método que fornece resultados mais confiáveis e com menor impacto ambiental.

Os objetivos específicos são:

- Quantificar AH e AF em cinco bioestimulantes pelos métodos “MAPA”, “Lamar” e “Dick” e comparar os resultados obtidos;
- Determinar o volume de resíduos gerados por cada método por análise;
- Determinar os custos gerados por cada método por análise;
- Estabelecer a partir dos métodos estudados, aquele que forneça os resultados mais coerentes, e com menor volume de resíduos e menor custo.

5. PROPOSTA TECNOLÓGICA

Para quantificação de SH em Bioestimulantes é empregado no Brasil o método do Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizante e Corretivos utilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) enquanto nos Estados Unidos é empregado o “método Lamar” para esse fim. Em laboratórios de pesquisa, utiliza-se o método Dick *et al* (1998) para determinação de SH em amostras ambientais e de composto.

No presente trabalho, serão avaliados três métodos: i) método utilizado pelo Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento, a ser denominado “método MAPA” (ii) “Método Lamar” recomendado pela Associação de Comércio de Produtos Húmicos (HPTA) que é o mesmo recomendado pela International Humic Substances Society (IHSS) e III) “Método Dick”, utilizado em laboratórios de pesquisa

Com este trabalho espera-se otimizar o tempo, diminuir custos e quantidade de resíduos gerados na determinação de SH em Bioestimulantes líquidos comerciais, a partir das metodologias existentes.

6. METODOLOGIA

6.1. Bioestimulantes comerciais

Neste trabalho foram analisados cinco bioestimulantes líquidos comerciais vendidos no Brasil. A Tabela 1 apresenta o que cada um dos cinco produtos comerciais (Bioestimulantes) apresenta em seus respectivos rótulos com relação às SH.

Tabela 1: Teores de AF, AH e carbono orgânico total fornecidos no rótulo dos bioestimulantes comerciais.

Bioestimulante	Concentração de AF	Concentração de AH	Carbono orgânico total
Solo Humics	5% (50,5 g L ⁻¹)	25% (252,5 g L ⁻¹)	31% (314,5 g L ⁻¹)
Terram (lote:259/18)	-----	-----	182 g L ⁻¹
Supa Humus (lote:1711-11843)	-----	-----	85,4 g L ⁻¹
Growmate Soil (lote:30082016T6)	-----	1,44% (HPTA)*	-----
	-----	1,50% (CDFA)**	-----
	-----	16% (4 Real)***	-----
Growmate Plant (lote:30082016T6)	1,35% (HPTA)*	-----	-----
	<0,05% (CDFA)**	-----	-----
	36% (4 Real)***	-----	-----

*Associação Comercial de Produtos Húmicos

** Departamento de Alimentos e Agricultura da Califórnia

*** método sem referência na literatura

Fonte: autor

6.2. Métodos

6.2.1. Caracterização dos produtos

6.2.1.1. Concentração de sólidos suspensos

A determinação da concentração de sólidos suspensos nas amostras foi realizada gravimetricamente, empregando-se três replicatas coletadas do frasco do bioestimulante imediatamente após vigorosa agitação manual.

Uma amostra entre 10 a 20 g do bioestimulante líquido foi pesada (precisão 0,001 g) e colocada para secagem em frasco pré-pesado. Após secagem, o sistema foi pesado novamente e a concentração de sólidos em suspensão (CS) foi então calculada pela equação 1:

$$CS (\%) = \frac{M_f}{M_0} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

M_f = massa do fertilizante após secagem (g);

M_0 = massa inicial amostra líquida (g).

Para remoção da água, foram utilizados dois métodos: liofilização (VLP 200, Micro Modulyo) e secagem em estufa (SOC FABBE) por elevação da temperatura.

A secagem por temperatura foi realizada em estufa a 60°C, posteriormente a amostra foi colocada em dessecador para esfriar e em seguida foi pesada. A temperatura foi estabelecida em 60°C para que não ocorresse a perda de substâncias proveniente da decomposição de componentes orgânicos e volatilização de compostos de interesse. A secagem em estufa é o processo mais usual para determinação de umidade ou resíduo seco.

Na liofilização, o frasco utilizado no processo foi pesado sem a amostra, pesado com a amostra líquida e finalmente após a sublimação. O processo de liofilização para remoção de água, consiste na desidratação das amostras, que passam por um procedimento de congelamento prévio, onde a água é removida pelo processo de sublimação, devido à redução de pressão do meio.

A partir dos valores obtidos nesses ensaios, foi definida a massa inicial a ser utilizada na determinação de SH, baseando-se nas informações sobre teores de AH e AF indicadas no rótulo dos produtos comerciais. A determinação prévia dessa massa é necessária para que os valores de SH permaneçam dentro do limite de detecção (LD) de cada método, fornecido na literatura.

6.2.1.2. Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado segundo Lamar *et al.*, (2014). Amostras liofilizadas foram pesadas em cadinhos pré-pesados e levados ao forno mufla (Quimis) durante 4 horas na temperatura de 500°C. Após, os mesmos foram removidos da mufla e colocados em dessecador para resfriar. Depois de frio, os cadinhos com as cinzas foram pesados e então calculado o teor de cinzas.

6.2.1.3. Composição elementar

A composição elementar foi determinada em amostras liofilizadas, moídas previamente em gral de ágata, em analisador elementar (Perkin Elmer CHN/S modelo 2400). A partir dos resultados desta análise, a razão C:N foi calculada.

6.2.2 Quantificação das SH

6.2.2.1. Método HTPA “Lamar”

O método estabelecido por Lamar *et al.* (2014), é o adotado pela Associação de Comércio de Produtos Húmicos (HTPA) dos Estados Unidos da América (USA) e pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS).

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do “método Lamar”

	AH (mg L ⁻¹)	AF (mg L ⁻¹)
LD	4,62	4,80
LQ	14,70	15,30

Fonte: Lamar *et al.*, (2014).

333

Para as amostras líquidas, recomenda-se que a concentração máxima na alíquota analisada seja de 500 mg L⁻¹ de AF + AH.

As análises foram realizadas em triplicata para cada produto. Alíquotas de 5,001 a 30,455 g, determinadas a partir das informações do fabricante, foram avolumadas a 1 Litro com NaOH 0,1 mol L⁻¹ em um béquer plástico. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada por agitação magnética (0,8 a 1,2 cm), velocidade 200-300 rpm.

A solução foi centrifugada por 10 minutos (1118 g) em tubos de centrífuga de 50 mL tipo Falcon. Os precipitados insolúveis foram separados e o sobrenadante alcalino, que contém AF e AH, foi coletado em um béquer plástico de 1 Litro.

A seguir, a suspensão foi acidificada até pH 1,00 ± 0,05 com HCl 4 mol L⁻¹, sob agitação magnética monitorando-se com eletrodo de pH. Depois de atingido pH 1, o frasco contendo a suspensão foi coberto com filme plástico e mantido sob agitação magnética por 1 hora.

A solução resultante foi mantida em repouso por 12 horas para que a fração contendo AH precipitasse, separando-se o AF por decantação e centrifugação por 10 minutos (1118 g).

O sobrenadante ácido contendo AF foi passado em resina amberlite DAX-8 (SUPELITE™) na forma ácida, acondicionada em coluna de vidro de 40x250 mm, usando-se uma bomba peristáltica. Os compostos hidrofílicos de baixo peso molecular não são adsorvidos em DAX-8 e percolam pela coluna, enquanto os AF ficam adsorvidos. Deve-se ter cuidado para que o topo da resina da coluna permaneça sempre coberto com solução.

A seguir foram passados 50 mL de água deionizada pela coluna para remoção de excesso de sais e de compostos orgânicos de baixo peso molecular que não tenham sido devidamente percolados. Após os AF foram eluídos com solução NaOH 0,1 mol L⁻¹ em volume suficiente para a remoção de todo o AF (aproximadamente 25 mL). A seguir a coluna foi lavada com 100 mL de água deionizada e depois foram passados 50 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ para o seu acondicionamento e uso da próxima amostra.

Por fim a solução de AF na forma básica foi passada em resina de permuta catiônica Amberlite IR120 na forma ácida, para remover os cátions contaminantes.

O AH precipitado em tubo de centrífuga foi pré-pesado e secado em estufa à 60°C. Da mesma forma, a solução contendo AF foi seca em estufa em becker de vidro a 60°C. Após a secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador à temperatura ambiente e pesadas.

As amostras secas de AH e de AF foram transferidas quantitativamente para cadinhos de porcelana previamente pesados. Os cadinhos haviam sido previamente secos em estufa a 90°C por 30 minutos e resfriados em dessecador à temperatura ambiente.

As amostras foram aquecidas em mufla durante 4 horas na temperatura de 500°C e a seguir resfriadas em dessecador. As amostras contendo as cinzas foram pesadas e o teor de cinzas calculado gravimetricamente pela equação 2:

$$Rel. \text{ cinzas} = \frac{(M1-M2)}{(M1-M3)} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

Rel. cinzas= Relação de cinzas

M1= Massa do cadinho com amostra (g)

M2= Massa do cadinho com cinzas (g)

M3= Massa do cadinho (g)

O teor de AH e de AF foi calculado após descontar-se respectivamente o teor de cinzas das amostras pela equação 3:

$$AH (mg L^{-1}) = \frac{M_{AH}}{(1-Rel. \text{ cinzas}).V_i} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,

M_{AH} = Massa seca de AH extraída (g)

V_i = Volume da Alíquota (L)

Analogamente é calculado para o teor de AF.

6.2.2.2 Método “MAPA 2006” e “MAPA 2017”

B.1 MAPA 2006

Neste método, para a análise da amostra líquida, recomenda-se que, após diluição com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, a quantidade máxima de AH+AF na alíquota seja de 300 mg de carbono orgânico provável.

A partir das informações fornecidas pelo fabricante, foi pesada com precisão de 0,1 mg uma quantidade da amostra líquida contendo até 300 mg de carbono

orgânico provável. A essa alíquota foram adicionados 50 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ e a suspensão foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume com água destilada. Essa solução foi denominada de extrato húmico total (EHT).

B.1.1. Determinação da concentração de EHT.

Para determinação do teor de carbono no EHT, foram transferidos 25 mL dessa solução com pipeta volumétrica para um Erlenmeyer de 250-300 mL. Essa alíquota foi seca em estufa 85-90°C. A seguir foram adicionados 10 mL de K₂Cr₂O₇ 0,20 mol L⁻¹ e, em seguida, com cuidado, 20 mL de H₂SO₄ concentrado, agitando-se suavemente a suspensão. O erlenmeyer foi coberto com vidro de relógio e deixado em repouso por 30 minutos, para esfriar. O erlenmeyer tampado com o vidro de relógio foi colocado sobre chapa aquecedora ajustada para temperatura de 140°C e a solução fervida por 30 minutos.

Terminado o tempo de reação, o erlenmeyer foi retirado da chapa e deixado esfriar, sempre coberto com o vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com pisseta, recolhendo-se a água no erlenmeyer. A seguir foram acrescentados aproximadamente 100 mL de água destilada, 10 mL de H₃PO₄ (85% P.A.) e a solução foi deixada esfriar. Em seguida, foi acrescentado 0,5-1 mL da solução indicadora de difenilamina e a solução foi titulada com a solução de sulfato ferroso amoniacal 0,5 mol L⁻¹ (SFA). Foram conduzidas, simultaneamente, pelo menos duas provas em branco, omitindo-se a presença do extrato-amostra. A solução de SFA foi padronizada com solução K₂Cr₂O₇ 0,2 mol L⁻¹, a qual foi preparada após secagem do reagente a 105°C. A padronização da solução de SFA é feita imediatamente anterior à sua utilização.

O teor de carbono orgânico (m/m) é dado pela equação 4:

$$C_{org.(\%)} = \frac{36C.(Vb-Va)}{G} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

C_{org.}(%)= carbono orgânico

C = concentração da solução de sulfato ferroso amoniacal

C = concentração da solução de SFA padronizada.

Va = volume da solução de SFA gasto na titulação da amostra (mL).

V_b = volume da solução de SFA gasto na titulação da prova em branco (mL)

G = massa inicial da amostra (g).

O cálculo de teor de carbono orgânico é efetuado com base na premissa de que cada mol de $K_2Cr_2O_7$ consumido reagiu com 1,5 mol de carbono orgânico.

O teor de EHT (%) é dado pela equação 5:

$$EHT(\%) = 1,724 \cdot C_{org.}(\%) \quad (\text{Equação 5})$$

B.1.2. Determinação da concentração de AH

Para separação do AH, utilizou-se 50 mL da solução do EHT acrescentando-se H_2SO_4 a 20% (v/v) sob agitação manual lenta até atingir-se pH 1, monitorado com pH-metro. A solução foi deixada em repouso durante a noite, para precipitação do AH. A seguir a suspensão foi centrifugada por 20 minutos (1118 g) e o AH (precipitado) separado do AF (sobrenadante). O AH foi re-solubilizado com volume suficiente de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e a solução básica transferida para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com água destilada. Esta solução resultante foi denominada solução de AH.

Para determinação da concentração de AH, 25 mL da solução de AH foi transferida para um erlenmeyer de 250-300 mL, e evaporados em estufa a $85-90^\circ\text{C}$. O teor de AH foi determinado segundo procedimento empregado para EHT (item B.1.1)

O teor de AH foi calculado pela equação 6:

$$AH(\%) = 1,724 \cdot C_{org.}(\%) \quad (\text{Equação 6})$$

B.1.3. Determinação da concentração de AF

O teor de AF foi calculado pela diferença na equação 7:

$$AF(\%) = EHT(\%) - AH(\%) \quad (\text{Equação 7})$$

B.2. MAPA 2017

Para o método MAPA 2017, foi pesada uma massa que corresponde de 30 a 60 mg L⁻¹ de carbono orgânico total provável, baseando-se nas informações do fabricante. Esta massa foi transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL e foram adicionados 20 mL de solução mista de Na₄P₂O₇ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH 0,1 mol L⁻¹. A suspensão foi agitada manualmente até homogeneização e deixada em repouso por uma hora. A seguir, o sobrenadante foi separado por centrifugação por 15 minutos (1118 g), recolhido em tubo de centrífuga de 50 mL e reservado. Ao precipitado foram adicionados novamente 20 mL de solução mista de Na₄P₂O₇ 0,1 mol L⁻¹ + NaOH 0,1 mol L⁻¹ e o procedimento de separação do sobrenadante foi repetido. O sobrenadante foi recolhido junto ao previamente reservado no tubo de centrífuga de 50 mL, e assim obteve-se a solução de EHT.

O EHT foi fracionado em AH e AF adicionando-se H₂SO₄ 20% (v/v) até atingir pH 1 e deixando-se decantar por 18 horas. A suspensão foi então centrifugada por 15 minutos (1118 g), o sobrenadante foi recolhido e avolumado com H₂O deionizada até 100 mL obtendo-se a fração AF.

No precipitado (AH) foi adicionado NaOH 0,1 mol L⁻¹ até a dissolução completa do mesmo e a solução resultante foi avolumada com H₂O deionizada até 100 mL, obtendo-se a fração AH.

Para a determinação do teor de carbono orgânico total foi retirada uma alíquota de 10 mL da solução de AH e 10 mL da solução de AF. Essas alíquotas, separadamente, foram transferidas para um erlenmeyer com 2 mL de solução de K₂Cr₂O₇ 0,33 mol L⁻¹. Essa solução foi agitada em banho de água com gelo, e foram adicionados 16 mL de H₂SO₄ concentrado contendo Ag₂SO₄ na concentração de 10 g L⁻¹.

Foi preparada, simultaneamente, uma prova em branco, repetindo-se o procedimento anterior com omissão da adição de amostra. Os frascos de reação foram aquecidos em chapa aquecedora ajustada na temperatura de 140°C, até fervura durante 10 minutos. Após resfriamento da solução, o conteúdo do frasco de reação foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e avolumado com H₂O deionizada. Uma alíquota de 20 mL foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL onde foram acrescentados 5 mL de solução H₃PO₄ 3,75 mol L⁻¹, 4 gotas de solução de indicador difenilamina e água deionizada para que o volume total atingisse cerca de 50 mL. A solução foi titulada com solução de SFA 0,05 mol L⁻¹ e

simultaneamente, uma prova em branco foi conduzida omitindo-se a presença da amostra.

A partir do valor obtido de carbono orgânico na equação 8, foram calculados os teores dos AH e AF.

$$C_{org.}(\%) = \frac{15C.(Vb-Va)}{G} \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde:

$C_{org.}(\%)$ = carbono orgânico

C = concentração da solução de SFA padronizada.

Va = volume da solução de SFA gasto na titulação da amostra (mL).

Vb = volume da solução de SFA gasto na titulação da prova em branco (mL)

G = massa inicial da amostra (g).

O cálculo de teor de carbono orgânico é efetuado com base na premissa de que cada mol de $K_2Cr_2O_7$ consumido reagiu com 1,5 mol de carbono orgânico.

Para obtenção do teor de AH e AF empregou-se as equações 6 e 9:

$$AF(\%) = 1,724.C_{org.}(\%) \quad \text{(Equação 9)}$$

6.2.2.3. Método para solos ("Dick") (Dick *et al*, 1998)

C.1. Extração das SH

A uma massa em torno de 200 mg, exatamente pesada, de amostra liofilizada, foram adicionados 30 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e a suspensão agitada mecanicamente em agitador horizontal por 3 horas. O sobrenadante foi separado por centrifugação durante 10 minutos (1118 g) e reservado. O processo foi repetido por mais duas vezes, quando então o sobrenadante tornou-se incolor indicando que as SH haviam sido completamente extraídas.

O volume do extrato húmico (EHT) foi completado a 100 mL em um balão volumétrico com NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Uma alíquota de 10 mL do EHT foi separada para a quantificação posterior. Ao restante da solução, foi adicionado HCL 4 mol L⁻¹ até atingir pH 1,00 +/- 0,05 e a suspensão foi deixada em repouso por 12 horas.

Após esse período, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante contendo os AF foi separado do precipitado contendo AH por centrifugação. O volume do extrato contendo AF foi medido.

C.2. Quantificação das SH

Nos extratos de SH e de AF, foi determinado o teor de carbono, medindo-se a absorvância da solução a 580 nm (UV-Visible Spectrophotometer, VARIAN) após reação durante 4 h a 60°C com solução ácida de dicromato de potássio (2 ml:2ml). A curva-padrão foi construída com frutose de 0 a 300 mg L⁻¹. As quantidades de SH e AF extraídas foram estimadas em função dos teores de carbono determinados nos respectivos sobrenadantes, considerando ser o carbono em solução em cada extrato parte integrante exclusivamente de SH (CSH) e de AF (CAF), respectivamente. Os valores determinados em solução foram reportados à massa inicial de fertilizante liofilizada: CSH = mg C na forma de SH/g de solo; CAF=mg C na forma de AF/g de solo.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS

A concentração de sólidos suspensos nos bioestimulantes variou de 1,78% a 52% (Tabela 3) e, com exceção do produto TERRAM, o método de secagem não afetou o resultado. Para o bioestimulante TERRAM, a concentração de sólidos foi de 51,99% para a amostra seca em estufa e de 47,19% para a amostra liofilizada (Tabela 3). Possivelmente a temperatura de 60°C não foi suficiente para eliminar toda a água de hidratação das fibras de SH, levando a um valor maior do que aquele obtido no processo de liofilização. De fato, a amostra seca a 60° C apresentou superfície selada no recipiente (dado não mostrado), o que pode ter levado à contenção da água de hidratação nas fibras.

Tabela 3: Concentração de sólidos dos bioestimulantes determinados por secagem em estufa e em liofilizador (n=3).

PRODUTO	MÉTODO			
	Estufa		Liofilizador	
	massa seca (%)	σ	massa seca (%)	σ
Solo Humics	2,15	0,01	2,18	0,02
Terram	51,99	0,31	47,19	0,54
Supa Humus	27,18	0,14	27,24	0,33
GP	1,78	0,01	2,08	0,01
GS	2,47	0,02	2,55	0,02

σ : desvio padrão

Fonte: autor

Dominguez D.X. (2007), ao comparar os dois métodos de secagem para determinação de sólidos em suspensão dos bioestimulantes organominerais também observou diferença nos resultados obtidos pelas duas metodologias. Essa diferença encontrada entre os dois métodos pode ser atribuída à presença de compostos voláteis a 65°C em estufa, por esse motivo, utilizou-se as amostras liofilizadas neste.

7.2. TEOR DE CINZAS E COMPOSIÇÃO ELEMENTAR

O teor de cinzas variou de 26 a 56% (Tabela 4). O teor de cinzas é um indicador da quantidade de material inorgânico nos bioestimulantes. Assim, o bioestimulante Solo Humics, por possuir maior teor de cinzas, apresentou maior quantidade de material inorgânico em sua composição, em comparação aos demais. Os outros bioestimulantes apresentaram teor de cinzas em torno de 26 a 30%. Alguns bioestimulantes apresentam no rótulo a utilização de K_2O , nos teores de 30,1 g L^{-1} para o Solo Humics, 117 g L^{-1} para o Terram e 58,5 g L^{-1} para o Supa Humus. O K_2O é solúvel em água, e compõe a massa das cinzas como parte inorgânica.

Tabela 4: Composição elementar, relação carbono: nitrogênio (C/N) e teor de cinzas dos bioestimulantes determinados em amostras liofilizadas. (n=2)

Produto	C(%)	σ	H(%)	σ	N(%)	σ	C/N	σ	Cinzas(%)	σ
Solo Humics	39,6	1,21	4,1	0,39	2,1	0,06	18,9	0,06	56	1,4
Terram	27,3	0,33	3,0	0,29	4,6	0,45	5,9	0,45	27	0,4
Supa Humus	29,9	0,14	2,8	0,08	1,1	0,13	27,6	0,13	27	0,2
GS	36,7	0,47	2,1	1,06	1,3	0,06	27,5	0,06	30	0,4
GP	0,6	0,01	2,6	0,48	6,6	0,91	0,1	0,01	26	0,3

σ : desvio padrão

Fonte: autor

Com exceção do GP, o teor de C da fase sólida dos fertilizantes variou entre 27 e 40% e a de N entre 1 e 4,6. A relação C/N variou entre 6 e 28 indicando uma grande heterogeneidade da proporção de N na fase orgânica. Os bioestimulantes que apresentaram a melhor relação C/N foram Solo Humics, Supa Humus e GS (Tabela 4) indicando que esses produtos possuem similaridades quanto ao grau de humificação. Já o produto Terram apresentou relação C/N em torno de 6, o que indica um produto mais rico em N do que os três anteriormente citados. Esse baixo valor pode representar presença de compostos nitrogenados oriundos de outras fontes não-húmicas e, portanto, de fácil decomposição.

O produto GP diferencia-se dos demais pelo baixíssimo teor de C e alto teor de N, o que leva a uma razão C/N de 0,1 (Tabela 4). Esses resultados indicam que a fase orgânica desse produto é constituída em grande parte por N e H, o que não é característico de SH. De fato, ao abriremos o recipiente o dor exalado era característico de esterco suíno.

7.3. TEORES DE AH E AF: COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS MAPA 2006 E MAPA 2017.

O teste comparativo entre as duas metodologias propostos pelo MAPA (2006 e 2017) foi realizada apenas com duas amostras (Tabela 5). A principal diferença entre os métodos diz respeito à quantidade de $K_2Cr_2O_7$ utilizada onde MAPA 2017 utiliza quantidade 3,4 vezes menor que MAPA 2006, (Tabela 7) reduzindo assim o impacto ambiental, que será discutido mais adiante.

Tabela 5: Teores de AH e de AF determinados pelos métodos MAPA 2006 e MAPA 2017, nos bioestimulantes.

Produto	MAPA 2006				MAPA 2017			
	AH g L ⁻¹	σ	AF g L ⁻¹	σ	AH g L ⁻¹	σ	AF g L ⁻¹	σ
Solo Humics	17,00	0,06	0,37	0,06	17,55	1,74	n.d*	-
Terram	24,75	1,04	277,47	2,68	n.d*	-	267,41	7,16

σ : desvio padrão; *n.d.: não detectado.

Fonte: autor

Quanto ao produto Solo Humics, o teor de AH determinado pelos dois métodos não diferiu e se situou na faixa de 17 a 17,6 g L⁻¹. Já para o AF, o valor obtido pelo MAPA 2006 foi 0,37 g L⁻¹, enquanto o método MAPA 2017 não detectou AF. Uma vez que o método MAPA 2017 utiliza quantidade de amostra quase 7 vezes menor do que o MAPA 2006 (3,02 mL e 20,13 mL respectivamente), provavelmente a quantidade de AF presente na alíquota analisada pelo MAPA 2017 foi muito pequena e por isso não detectada.

Em contrapartida, o inverso aconteceu com o produto Terram, onde o teor de AF determinado pelos dois métodos foi relativamente semelhante, porém o AH não foi detectado pelo método 2017 (Tabela 4). Ainda que o teor de AH determinado pelo MAPA 2006 no Terram seja maior do que no Solo Humics, o teor de AF no primeiro é aproximadamente 700 vezes maior do que no Solo Humics (Tabela 4). Conseqüentemente o teor de SH total no Terram é muito maior do que no Solo Humics e, conseqüentemente, a alíquota usada para MAPA 2017 é muito menor no Terram (0,29 mL) em comparação ao volume usado para Solo Humics (3,02 mL).

Esses resultados confirmam que o método MAPA 2017 é menos sensível à quantificação das SH em bioestimulantes.

Em função disso, optou-se pela utilização do método MAPA 2006, para comparação com outros métodos.

7.4. TEORES DE AH E AF: COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS MAPA 2006, Lamar E DICK.

Para o bioestimulante Solo Humics os teores de AH e AF foram semelhantes entre os três métodos analisados situando-se entre 16,9 e 17,7 g L⁻¹ (Tabela 6). Os teores de AF oscilaram entre 0,26 a 0,56 g L⁻¹, e aumentaram na ordem Lamar < MAPA 2006 < Dick (Tabela 6.)

O produto GS apresentou comportamento relativamente semelhante ao apresentado por Solo Humics: a amplitude de variação do teor de AH determinado pelos três métodos foi estreita (16,65 a 23,76 g L⁻¹), enquanto o de AF foi baixo (<1,61 g L⁻¹). Importante salientar que o “método Lamar” não detectou AF nessa amostra.

Os teores de AH encontrados para o bioestimulante Terram foram divergentes para os três métodos, decrescendo na ordem MAPA (24,75 g L⁻¹) >, Lamar (7,18 g L⁻¹) > Dick (1,83 g L⁻¹). Já para o AF, o valor obtido pelo “método Lamar” (90,30 g L⁻¹) foi aproximadamente 3x menor do que os valores observados para MAPA 2006 e Dick (277,47 a 308,15 g L⁻¹ respectivamente).

Para o produto Supa Humus rico em AF como o Terram, os valores obtidos tanto para o AH como para o AF aumentaram na ordem Lamar < MAPA < Dick (Tabela 6)

A superestimação de AF e AH observadas para Terram e Supa Humus pelos “métodos MAPA” e “Dick”, deve-se provavelmente ao fato desses métodos quantificarem EHT e AF pela oxidação do carbono nos respectivos extratos sem que haja purificação dos mesmos. Com isso compostos orgânicos não húmicos que permanecem nesses extratos são também oxidados pelo dicromato e quantificados como sendo húmicos. Já o Lamar purifica AH e AF e determina as frações gravimetricamente e elimina em parte essas interferências. Essa interferência ocorre para os bioestimulantes ricos em AF.

O produto GP apresentou baixos teores de SH pelos três métodos estudados (Tabela 6) confirmando que esse produto não é um bioestimulante à base de SH.

Tabela 6: Teores de ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) dos bioestimulantes nos diferentes métodos de quantificação. (n=3)

Produto	Método											
	Lamar				MAPA 2006				Dick			
	AH g L ⁻¹	σ	AF g L ⁻¹	σ	AH g L ⁻¹	σ	AF g L ⁻¹	σ	AH g L ⁻¹	σ	AF g L ⁻¹	σ
Solo Humics	17,71	0,33	0,26	0,03	17,00	0,06	0,37	0,06	16,89	0,26	0,56	0,05
Terram	7,18	0,47	90,30	5,19	24,75	1,04	277,47	2,68	1,83	0,01	308,15	12,79
Supa Humus	1,39	0,15	20,50	1,01	29,97	0,82	150,76	0,03	33,24	9,52	174,67	25,18
GS	23,76	0,15	0	0	16,65	0,15	1,61	0,10	22,40	1,03	0,60	0,10
GP	0,37	0,13	0,87	0,38	0	0	0,57	0,12	0	0	0	0

σ : desvio padrão;
Fonte: autor

7.5. TEORES DE AH E AF: COMPARAÇÃO COM OS DADOS FORNECIDOS NOS RÓTULOS DOS BIOESTIMULANTES

Na Tabela 1 constam os dados que cada fabricante fornece sobre o respectivo bioestimulante. O tipo de informação varia entre os produtos estudados: alguns informam sobre teores de AH e AF (Solo Humics, GS e GP) enquanto outros informam sobre teores de carbono orgânico total (Solo Humics, Terram e Supa Humus).

No presente trabalho, para o cálculo do teor de C orgânico total (COT) a partir dos teores de AF e AH, consideramos uma proporção média de 60% de C (m/m) no AH e de 40% de C (m/m) no AF (McBride, 1994), (Equações 10 e 11):

$$COT = AH/0,6 \quad \text{(Equação 10)}$$

$$COT = AF/0,4 \quad \text{(Equação 11)}$$

O produto Solo Humics, como já discutido, apresentou resultados de AH e AF semelhantes para os três métodos (Tabela 6). Para o AH o valor médio foi em torno de 17 g L⁻¹, enquanto no rótulo o valor é de 252,5 g L⁻¹. Para o AF, o mesmo comportamento se repetiu: os valores apresentados pelas três metodologias foram em torno de 0,5 g L⁻¹ enquanto no seu rótulo o valor foi de 50,5 g L⁻¹.

Para o Terram, os valores de COT calculados a partir dos teores de AH e AF pelas equações 10 e 11, foram: 40,43 g L⁻¹ (Lamar), 125,84 g L⁻¹ (MAPA) e 124,36 g L⁻¹ (Dick). No rótulo o valor informado é de 182 g L⁻¹ de COT.

Para o Supa Humus os valores de COT calculados a partir dos teores de AH e AF pelas equações 10 e 11, foram: 9,03 g L⁻¹ (Lamar), 78,30 g L⁻¹ (MAPA) e de 89,81 g L⁻¹ (Dick). No seu rótulo o valor informado é de 85,4 g L⁻¹.

Os bioestimulantes GP e GS apresentam nos seus respectivos rótulos três valores diferentes de AH e AF, determinados por três metodologias diferentes. Para o GS, os valores de teor de AH informados foram de 1,44% (Lamar); 1,50% (CDFA) e 16% (4 REAL). Convertendo-se os teores obtidos no presente estudo (Tabela 6) para base percentual, obtemos os seguintes valores: 2,38% (Lamar), 1,67% (MAPA) e 2,24% (Dick), que estão de acordo com o valor fornecido pelo fabricante segundo metodologia Lamar.

Para o GP, os valores de teor de AF informados foram de 1,35% (Lamar); <0,05% (CDFA) e 36% (4 REAL). Convertendo os teores obtidos no presente estudo (Tabela 6) para base percentual, obtemos os seguintes valores: 0,057% (Lamar) e 0,002% (MAPA); segundo “método Dick”, não foi detectado presença de AF.

As diferenças entre valores de SH determinados pelo presente estudo e os constantes nos rótulos não seguem um padrão, ou seja, para alguns bioestimulantes o resultado encontrado nesse estudo é maior, e para outros é menor. Isso provavelmente decorre do fato de a metodologia empregada pelos fabricantes ser diferente das empregadas no presente estudo. Os bioestimulantes Solo Humics, Terram e Supa Humus não informaram nos seus respectivos rótulos a metodologia de análise. Para o bioestimulante GS, a metodologia Lamar empregada pelo fabricante forneceu resultado coerente com o resultado obtido pela mesma metodologia no nosso laboratório. Já para o GP, o teor de AF aparentemente foi superestimado pelo fabricante.

8. CONSUMO DE INSUMOS E RESÍDUOS GERADOS

Os custos de cada método foram estimados a partir do respectivo consumo de reagentes sólidos/líquidos para a análise de cada bioestimulante em triplicata. Na Tabela 7 constam as quantidades de reagentes utilizadas por cada metodologia.

O consumo de dicromato decresce na ordem MAPA 2006 > MAPA 2017 ≈ Dick, sendo que o “método Lamar” não emprega esse reagente.

Miyazawa *et al.* (2019) destacam a importância de reduzir uso de reagentes tóxicos, principalmente dicromato, para a quantificação do carbono orgânico, sem comprometer qualidade analítica.

De acordo com CONAMA, Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011 (CONAMA, 2011), a concentração máxima permitida lançada em cursos d'água é 0,1 mg L⁻¹ de cromo hexavalente e 1,0 mg L⁻¹ de cromo trivalente. A concentração de cromo trivalente no resíduo do método MAPA 2006 é 630 mg L⁻¹, no resíduo de MAPA 2017 é 265 mg L⁻¹ e no resíduo de Dick é 1450 mg L⁻¹. Portanto esses resíduos devem ser devidamente tratados para seu descarte apropriado e isso gera um custo adicional ao método.

O cromo na forma Hexavalente é prejudicial à saúde pois, bioacumula e biomagnifica ao longo da cadeia alimentar (Nunes R. M., 2012). Já na sua forma trivalente, o cromo é estável, não gerando a forma hexavalente (SUSSULINI, 2006).

O uso do H₂SO₄ p.a. é associado a utilização do K₂Cr₂O₇. Os métodos MAPA 2017 (248 mL) e MAPA 2006 (197 mL) são os que mais utilizam esse reagente, enquanto o volume utilizado pelo “método Dick” é da ordem de 4 mL (Tabela 7)

Dos métodos estudados, o “método Lamar” é o que gera maior quantidade de resíduos (Tabela 7), porém é o de menor impacto ambiental, pois utiliza como reagentes, NaOH e HCl que geram NaCl e H₂O, O que diferencia esse método dos demais é a utilização da resina DAX-8 e da resina Amberlite IR120. A resina DAX-8 é cara (Tabela 7) e de difícil aquisição, sendo o ponto negativo no “método Lamar”.

O método MAPA 2006 gerou um volume de 3367 mL de resíduo e o MAPA 2017 2415 mL de resíduo (Tabela 7).

A Tabela 8 lista os equipamentos utilizados em cada metodologia. Alguns são de uso comum, por exemplo a balança analítica, estufa e centrífuga;

enquanto outros são específicos para um dado método, por exemplo a mufla para o “Lamar” e o espectrofotômetro para “Dick”. Também nessa tabela consta o tempo médio de análise para cada amostra em triplicata. O “método Dick” é o mais expedito (2 dias por amostra), porém requer o uso de espectrofotômetro. O “método Lamar” é o mais demorado, em relação aos demais, pelo fato de necessitar um grande período de centrifugação do volume inicial (1 L) para a separação do extrato húmico (~2 horas por amostra) e posterior centrifugação para a precipitação do AH (~2 horas), e por fim, a utilização da mufla (4 horas).

Tabela 7: Quantidade de insumos utilizada e respectivo custo e volume de resíduo gerado para cada método estudado.

INSUMO	QUANTIDADE/MÉTODO				CUSTO (R\$)**
	MAPA 2006	MAPA 2017	Lamar	Dick	
K ₂ Cr ₂ O ₇ , p.a. (g)	6	1,77	0	1,59	96
H ₂ SO ₄ p.a. (mL)	197	248	0	4,16	60
H ₃ PO ₄ p.a. (mL)	100	26,25	0	0	66
HCl p.a. (mL)	0	0	32,26	0,02	103
H ₂ O deion. (mL)	3000	2120	4000	400	12
Na ₄ P ₂ O ₇ .10H ₂ O, p.a. (g)	0	8,1	0	0	120
NaOH, p.a. (g)	14	0,72	15	1,2	20
Ag ₂ SO ₄ , p.a. (g)	0	2,5	0	0	300
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄)2.6H ₂ O, p.a. (g)	50	7,5	0	0	99
Frutose (g)	0	0	0	0,038	60
Resina DAX-8 (g)*	0	0	50	0	443
Resina Amberlite IR120 (g)*	0	0	50	0	531
RESÍDUO GERADO (mL)	3367	2415	4115	439	

*resinas são reutilizadas, diminuindo assim o custo das análises posteriores

** Custo de mercado

Fonte: Autor

O custo médio estimado para uma análise de cada metodologia em triplicata consta na Tabela 9. Para o cálculo do custo total por análise foi considerado o custo de insumo (por unidade de massa ou volume) obtido por análise de mercado ou diretamente no site dos fabricantes (Tabela 7), custo salarial diário de um técnico em

química (R\$ 81,79) e o custo do tratamento do resíduo. O custo salarial foi estimado segundo o salário mensal de um técnico em química obtido no site <https://www.salario.com.br/profissao/tecnico-quimico-cbo-311105/>, no valor de R\$ 2453,63. O custo do tratamento do resíduo gerado é R\$ 2,20 por litro (comunicação pessoal do CGTRQ-UFRGS).

Tabela 8: Lista de equipamento utilizada por análise.

EQUIPAMENTO/ MATERIAIS	EQUIPAMENTO/MÉTODO			
	MAPA 2006	MAPA 2017	Lamar	Dick
Balança analítica	x	x	x	x
Forno de secagem	x	x	x	x
Centrífuga	x	x	x	x
Agitador magnético	-	-	x	-
Medidor de pH e eletrodo	x	x	x	x
Espectrofotômetro	-	-	-	x
Bomba peristáltica	-	-	x	-
Forno de mufla	-	-	x	-
Dessecador	-	-	x	x
Agitador	-	-	x	x
Vidraria	x	x	x	x
Banho-maria com controle de temperatura	x	-	-	-
Tempo de análise (dias)	3	3	4	2

Fonte: autor

O método que envolve maiores custos iniciais por análise de uma amostra é o Lamar por empregar as resinas DAX-8 e Amberlite IR-120. Porém as análises subsequentes reutilizam essas resinas e com isso o valor por análise diminui R\$ 577,72 por análise. Esse valor mais elevado se deve ao maior tempo de análise desse método.

Tabela 9: Custo médio estimado para a análise de uma amostra em triplicata dos bioestimulantes

	Custo / R\$			
	MAPA 2006	MAPA 2017	Lamar	Dick
Insumos	101,69	100,94	347,97	11,43
Mão de obra	245,36	245,36	327,15	163,58
Tratamento do resíduo	7,41	5,31	n.t*	1,17
Total	354,46	351,31	675,12	176,18

*n.t: não há custos

Fonte: autor

9. CONCLUSÕES

Para os bioestimulantes ricos em AH (Solo Humics e GS) as metodologias estudadas apresentaram valores próximos para os teores de AH e de AF. Já para os produtos ricos em AF (Terram e Supa Humus), as metodologias que utilizam dicromato para oxidar o carbono orgânico (MAPA e Dick), superestimaram os resultados de AF, tomando-se como base o “método Lamar”. Isso provavelmente ocorre pelo fato de compostos orgânicos não húmicos permanecerem nos extratos e terem sido oxidados pelo dicromato e quantificados como sendo húmicos.

O tempo de análise variou entre as metodologias estudadas, bem como o tipo e volume de resíduo gerado. Os métodos de desidratação de secagem por estufa e por liofilização se foram equivalentes para a determinação da concentração de sólidos em suspensão. Porém, o método de secagem por temperatura à 60°C é mais rápido e requer equipamentos mais baratos que a liofilização.

Baseando-se no princípio químico de determinação de SH do método e no impacto ambiental do resíduo gerado, o método mais adequado para determinação de SH em bioestimulantes líquidos é o de Lamar *et al.* (2014). Esse método se baseia na determinação gravimétrica de AH e AF purificados. Já nos outros dois métodos estudados, por se basearem na oxidação da matéria orgânica com dicromato, pode haver uma superestimação dos resultados devido à interferentes orgânicos, que oxidam o cromo juntamente às SH, AF e /ou AH. O “método Lamar” apresenta um custo inicial maior do que os outros métodos, porém as resinas adquiridas inicialmente podem ser reutilizadas, diminuindo assim o custo posterior de análises. Quanto ao tempo maior de análise desse método, esse pode ser otimizado pela realização simultânea de várias amostras conforme adequação do laboratório.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADOR, H. V. *et al.* Substâncias húmicas como bioestimulantes vegetais sob condições de estresse ambiental." *Colheitas Tropicais* , vol. 39, n. 4, 2018.

BALDOTTO, A. B. e BALDOTTO, L. E. B. Ácidos Húmicos. *Rev. ceres* vol. 61 p. 856 Viçosa, 2014.

BRASIL. Resolução CONAMA 357. Classificação de Corpos de Água e Padrões de Lançamento, 2005.

CANELLAS, L. P. *et al.* Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196. p.15–27. 2015.

DICK, D.P.; GOMES, J. & ROSINHA, P.B. Caracterização de substâncias húmicas extraídas de solos e de lodo orgânico. *R. Bras. Ci. Solo*, 22:603-611, 1998.

DICK D. P. *et al.* Ácidos húmicos de materiais carbonosos: extração e composição. in: III Congresso Brasileiro de Carvão Mineral 2011.

DOMINGUEZ, D. X. Caracterização de Fertilizantes Orgânicos e Organominerais. *Fluidos* 2007.

GROWMATE International LCC. Soil. Disponível em: <<http://growmateintl.com/products/agriculture/growmate-soil/>>. Acesso em 28 out. 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro, p. 1-271, 2012.

LAMAR, R. T. *et al.* A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products. *Journal of AOAC International* , v. 97, n. 3, p. 721-30, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos. Brasília, DF. 2006.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes e Corretivos. Brasília, 2014.

MCBRIDE, M. B. *Environmental chemistry of soils*. New York: Oxford University Press. 406 p, 1994.

MIYAZAWA, M. *et al.* 2019. Disponível em: <http://www.brazilianjournals.com/index.php/BJAER/article/view/3217>. Acesso em: 14 de nov. de 2019.

NUNES R. M., OLIVEIRA R. M. S., BENINI S.M., avaliação do risco do cromo presente no lodo de indústrias de curtume, VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista, v. 8, n. 12, 2012, p. 222-233.

OLIVEIRA, N. T.; SOUSA, S. M. Bioestimulantes à base de substâncias húmicas e aminoácidos promovem o aumento do crescimento de plântulas de milho. *Saberes*, n. 1, p. 78-83, 2016.

Olk, *et al* 2019. Environmental and Agricultural Relevance of Humic Fractions Extracted by Alkali from Soils and Natural Waters. *Journal of Environmental Quality*

ONU, População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU: Nações Unidas Brasil, 17 de jun. de 2019. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>> Acesso em 23 de set. de 2019.

PASSOS *et al*. Substâncias húmicas, atividade microbiana e carbono orgânico lábil em agregados de um latossolo vermelho distrófico sob duas coberturas vegetais. *R. Bras. Ci. Solo*, 31:1119-1129, 2007.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 2001, 166, 810-832.

PICCOLO, A. In memoriam Prof. F. J. Steveson and the question of humic substances in soil. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016.

SALÁRIO, Disponível em: <<https://www.salario.com.br/profissao/tecnico-quimico-cbo-311105/>> Acesso em 18 de nov. de 2019.

SANTOS, T. L.; PAES, L. W. Substâncias húmicas: um breve relato sobre sua importância e suas interações. *Educação Pública*. 2016. Disponível em: <<https://educacaopublica.cecierj.edu.br/artigos/16/13/substancias-hmicas-um-breve-relato-sobre-sua-importancia-e-suas-interaes>>. Acesso em: 24 out. 2019.

STEVENSON, F. J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, Inc. New York, NY. 1994.

SUSSULINI, A. e ARRUDA, A. Z. Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem. *Eclética Química* 31:1, p. 73-80. 2006.

SWIFT, R.S. (1996) Organic matter characterization. In: Sparks DL (ed) *Methods of soil analysis. Part 3—chemical methods*, Soil Science Society of America book series. Soil Science Society of America, Madison, pp. 1011–1070

TEIXEIRA, W. F. Uso de Bioestimulantes na agricultura: L-Bio Technology. *Canal Rural*. 2018. Disponível em: <<https://canalrural.uol.com.br/conteudo-patrocinado/uso-de-bioestimulantes-na-agricultura-l-bio-technology/>>. Acesso em: 21 out. 2019.