

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

CÉLIA MARA FAVORETTO

CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA HUMIFICADA DE UM LATOSSOLO
VERMELHO DISTRÓFICO ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA
INDUZIDA POR LASER

PONTA GROSSA
2007

CÉLIA MARA FAVORETTO

CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA HUMIFICADA DE UM LATOSSOLO
VERMELHO DISTRÓFICO ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA
INDUZIDA POR LASER

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre na Universidade Estadual de Ponta
Grossa, Área Química Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab

PONTA GROSSA
2007

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

F275 Favoretto, Célia Mara
Caracterização da matéria orgânica humificada de um
latossolo vermelho distrófico através da espectroscopia de
fluorescência induzida por laser. / Célia Mara Favoretto.
Ponta Grossa, 2007
96 f. Dissertação (Mestrado na área de Química aplicada),
Universidade Estadual de Ponta Grossa – Pr.
Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab

.I. Matéria orgânica do solo. 2. Fluorescência induzida por
laser. 3. Sistemas de manejo do solo. I. Saab, Sérgio da Costa. .
II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. III. T.

CDD: 631.45

TERMO DE APROVAÇÃO

CÉLIA MARA FAVORETTO

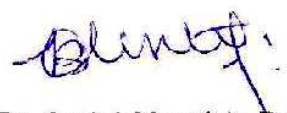
"CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA HUMIFICADA DE UM LATOSSOLO VERMELHO DISTRÓFICO ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER."

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:


Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab
Departamento de Física, UEPG/PR


Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires
Departamento de Ciências do Solo e Engenharia Agrícola, UEPG/PR


Prof. Dr. André Maurício Brinatti
Departamento de Física, UEPG/PR

Ponta Grossa, 30 de julho de 2007.

“O homem que venceu na vida é aquele que viveu bem, riu muitas vezes e amou muito. Que conquistou o respeito dos homens inteligentes e o amor das crianças. Que preencheu um lugar e cumpriu uma missão. Que deixou o mundo melhor do que encontrou, seja com uma flor, um poema perfeito ou o salvamento de uma alma. Que procurou o melhor dos outros e deu o melhor de si”.

Jaime Rolemberg de Lima

RESUMO

A matéria orgânica é essencial para a qualidade e produtividade do solo, sendo seu processo de humificação afetado pelo clima, tipo de solo e sistemas de manejo do solo, resultando na formação de grupos fluorescentes que podem ser avaliados por espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL), uma técnica recente que tem se mostrado eficiente para análise da matéria orgânica (MO) de solos inteiros, isto é, solos sem nenhum tratamento físico ou químico. Esta técnica foi utilizada para determinar a humificação da MO de um Latossolo inteiro, como também o fracionamento físico por tamanho de partículas e relacionar os resultados da quantificação da MO humificada com a profundidade do solo e sistemas de manejo. Na superfície do solo, o plantio direto possui a menor humificação em comparação com o preparo convencional e o preparo mínimo, enquanto que as frações da camada superficial do solo (0-20 cm) indicaram maior humificação na fração (20-53 μm) e a menor na fração (<2 μm), em todos os sistemas de manejo.

Palavras-chave: Matéria orgânica do solo, Fluorescência Induzida por Laser, Sistemas de manejo do solo.

ABSTRACT

Soil organic matter is essential for its quality and productivity, being its process of humification affected by the climate, soil type and soil management, resulting in the formation of fluorescent groups that can be measured through Laser- Induced Fluorescence Spectroscopy, a recent technique that has been showing efficient for analysis of whole soil, that is, soil without any physical or chemical treatment. This technique was used to determine the humification degree of the Organic Matter of a whole soil, as well as the physical fraction for particle size. It can also be used to relate the results of the quantification of the humification organic matter with the depth of the soil and planting systems. On the surface of the soil, No-Tillage got the smallest humification in comparison with the conventional tillage and the reduced tillage, whereas the fractions of the superficial layer of the soil (0-20 cm), indicated larger humification in the fraction (20-53 μm) and the smallest in the fraction (<2 μm), in all treatments.

Keywords: humification, LIF, whole soil

AGRADECIMENTOS

A Deus, que do alto de sua infinita bondade, amor e sabedoria, nos permitiu a vida e nos chamou a contribuir junto a sua obra, evoluindo no caminho do bem e do amor. E por ter colocado sempre as pessoas certas em nosso caminho.

Ao Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab agradeço profundamente pela orientação, pelo estímulo, esclarecimentos, sugestões e correções oportunamente apresentadas, a permanente disponibilidade e o voto de confiança e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Matilde e Amilton, a quem nenhuma palavra é capaz de descrever o muito que têm feito por mim. Que Deus os abençoe.

Aos meus filhos, Thiago, Lucas, pelo apoio constante e, em especial, a Saulo e Matheus, pela paciência e pelo auxílio durante a realização deste trabalho, obrigada por tudo.

A minha irmã Sueli, sempre pronta a me auxiliar em todos os momentos de minha vida.

Ao meu sobrinho Vilson pela ajuda nas traduções de inglês e apoio.

Às minhas amigas, Daniele e Viviane, cuja bondade, carinho e paciência me propiciaram a conclusão deste curso.

Ao amigo Welington, pela preciosa ajuda no laboratório de solos.

Aos amigos Larissa e Alfredo, pela inestimável ajuda e apoio para a realização deste trabalho.

À Dra. Débora Millori pelo auxílio nas medidas de fluorescência.

Ao IAPAR de Ponta Grossa, que forneceu as amostras de solo para análise.

Ao Dr. Jadir A. Rosa, sempre pronto a nos atender e auxiliar neste trabalho de pesquisa.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária de São Carlos, pela acolhida e realização das medidas de fluorescência.

Em especial, ao Prof. Dr. Jorge Iulek, um grande amigo, que acreditou em nossas possibilidades e sempre nos apoiou em nossa caminhada.

Aos colegas de Pós-Graduação pela colaboração nos trabalhos, nos estudos e pelo companheirismo.

Ao departamento de Química, pela oportunidade de ingresso no curso de Pós-Graduação.

Às pessoas especiais que fazem parte das nossas vidas através de pequenos gestos de carinho e ajuda e que colaboraram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Representação de uma possível estrutura-tipo para as substâncias húmicas-----	24
Figura 2.2	Modelo proposto para a estrutura do ácido húmico -----	25
Figura 2.3	Modelos conceituais propostos pela teoria macromolecular -----	26
Figura 2.4	Esquema de estrutura das substâncias húmicas -----	27
Figura 2.5	Classificação e propriedades das SH -----	30
Figura 2.6	Modelo da estrutura do ácido fúlvico-----	31
Figura 2.7	Alguns grupos cromóforos responsáveis pela cor escura das substâncias húmicas.-----	32
Figura 3.1	Diagrama energético de fluorescência -----	42
Figura 3.2	Diagrama energético de fosforescência -----	43
Figura 3.3	Espectro de fluorescência de emissão, excitação e sincronizada-excitação de um ácido húmico (AH) e um ácido fúlvico (AF) de um mesmo solo ----	49
Figura 4.1	Vista geral das três macro-parcelas (área de ensaio) -----	52
Figura 4.2	Solos cultivados sob sistema de preparo convencional -----	54
Figura 4.3	Solos cultivados sob sistema preparo mínimo -----	54
Figura 4.4	Solos cultivados sob sistema plantio direto -----	55
Figura 4.5	Perfil do solo analisado -----	56
Figura 4.6	Detalhes da montagem experimental de FIL.-----	62
Figura 4.7	Sistema para medida de FIL -----	63
Figura 5.2	Espectros das amostras dos solos intactos em diferentes sistemas de plantio e profundidade -----	73
Figura 5.3	Valores de H_{FIL} obtidos para todas as amostras de solo sob diferentes sistemas de cultivo-----	76

Figura 5.4	Diagrama representativo da emissão de FIL das frações de solo. -----	79
Figura 5.5	Diagrama representativo dos índices de humificação obtido por FIL para frações por tamanho de partículas do solo. -----	80
Figura 5.6	Espectros de fluorescência das frações do solo -----	81
Figura 5.7	Espectro de FIL para amostras de solo inteiro, lavado com H ₂ O ₂ e calcinado, sob sistema plantio direto na camada de 0-20 cm. -----	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Sistemas de manejo e profundidades do solo Latossolo-----	57
Tabela 5.1	Teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e razão elementar C/N das camadas de solo analisadas.	65
Tabela 5.2	Valores de C_{total} das frações do solo, em diferentes sistemas de cultivo e profundidade de 0-20 cm. -----	71
Tabela 5.3	Valores de emissão de Fluorescência Induzida por Laser -----	73
Tabela 5.4	Área do sinal de fluorescência dividido pelo teor de carbono total-----	75
Tabela 5.5	Valores de FIL para frações do solo na camada de 0-20 cm -----	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Área do espectro de emissão de FIL
Cfb	Subtropical úmido mesotérmico
COT	Carbono orgânico total
CP	Espectrometria de plasma
CP/MAS RMN 13C	Cross Polarization Magic Angle Spinning Technique NMR
CT	Carbono Total
CTC	Capacidade de troca de cátions
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agronômica
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
ETAR	Estação de Tratamento de Esgoto do Aeroporto Internacional do Rio de Janeiro
FIL	Fluorescência Induzida por Laser
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GMG	Departamento de Mineralogia e Geotectônica
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
ICP	<i>Inductively coupled plasma</i>
IGC	Instituto de Geociências
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
LVd	Latossolo Vermelho distrófico
PC	Preparo convencional
PD	Plantio direto
PM	Preparo mínimo
RLS	Radical livre semiquinona
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN 13C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
USP	Universidade de São Paulo
ACF	Área do espectro de emissão de FIL
Cfb	Subtropical úmido mesotérmico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	MATÉRIA ORGÂNICA	15
2.2	COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	16
2.3	CARBONO DO SOLO	17
2.4	CONTEÚDO DE MATÉRIA ORGÂNICA NO SOLO	19
2.5	MINERALIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	20
2.6	FRACIONAMENTO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	21
2.7	SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	22
2.8	IMPORTÂNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	27
2.9.	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	27
2.10	ÁCIDOS HÚMICOS	30
2.11	ÁCIDOS FÚLVICOS	31
2.12	ANÁLISE ELEMENTAR	32
2.13	RAZÃO ATÔMICA	33
2.14	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE ANÁLISE APLICADAS AO ESTUDO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	35
2.14.1	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica	36
2.14.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	37
2.14.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	38
2.14.4	Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível	39
CAPÍTULO 3	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	41

3.1	Fosforescência e Fluorescência-----	41
3.2	Conversão interna-----	44
3.3	Conversão externa-----	45
3.4	Cruzamento intersistema-----	46
3.5	Fatores que interferem na fluorescência-----	47
3.6	Modos de obtenção do espectro de Fluorescência-----	49
3.7	Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser-----	51
CAPÍTULO 4	MATERIAIS E MÉTODOS-----	54
4.1	COLETA DE AMOSTRAS-----	54
4.1.1	Localização e características do solo-----	54
4.2	SOLO-----	57
4.2.1	Procedimento de abertura das amostras de solo-----	58
4.2.2	Procedimento para fracionamento por granulometria das amostras de solo-----	59
4.3	ANÁLISE PARA DETERMINAÇÃO DO CARBONO (C), HIDROGÊNIO (H) E NITROGÊNIO (N)-----	60
4.4	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA-----	60
4.4.1	Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL) do solo intacto-----	61
4.4.2	Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser das frações do solo-----	62
CAPÍTULO 5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	64
5.1	RESULTADOS DA ANÁLISE DE CARBONO, HIDROGÊNIO, NITROGÊNIO E RELAÇÃO C/N-----	64
5.1.1	Resultado do carbono total-----	64
5.1.2	Resultado do nitrogênio total-----	68
5.1.3	Relação C/N-----	69

5.2	RESULTADOS DA ANÁLISE DE CARBONO TOTAL DAS FRAÇÕES DO SOLO-----	70
5.3	RESULTADOS DA ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER-----	72
5.3.1	Amostras de solo intacto-----	72
5.3.2	Resultado da análise de FIL das Frações do solo-----	77
CAPÍTULO 6	CONCLUSÃO-----	83
CAPÍTULO 7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA-----	84

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A matéria orgânica é um componente fundamental para a qualidade e a produtividade do solo, sendo importante na disponibilidade de nutrientes para as plantas e para o seqüestro de carbono da atmosfera (GLATZELA et al., 2003; BAYER et al., 2000a). Apresenta também estreita relação com as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, tendo efeito na atividade microbiana e na estabilidade de agregados (BALESDENT et al., 2000; KALBITZ et al., 2003), influenciando fatores como pH, capacidade de troca iônica e melhoria de sua estrutura (ZECH et al., 1997). Dessa forma, manter ou incrementar o estoque de matéria orgânica é fundamental para garantir a qualidade do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas.

A determinação precisa do teor de MO é importante sob o ponto de vista do estabelecimento de práticas adequadas de manejo para o cultivo de plantas. Assim, muitas técnicas espectroscópicas têm sido utilizadas para se avaliar o grau de humificação da matéria orgânica do solo. Entre as mais utilizadas atualmente podemos citar a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), que avalia o grau de humificação das substâncias húmicas através da quantificação de radicais livres do tipo semiquinonas (SENESI, 1990, MARTIN-NETO et al., 1994a, SAAB e MARTIN-NETO, 2004), a Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN), para avaliar a aromaticidade da matéria orgânica do solo (SAAB; MARTIN-NETO, 2007), fornecendo informações a respeito de algumas transformações químicas ocorridas durante o processo de humificação, a Absorção de Luz Ultravioleta-Visível (UV-Vis), que utiliza a razão E_4/E_6 , onde E_4 é a absorbância em 465 nm e E_6 é a absorbância em 655 nm (STEVENSON, 1994) e a Fluorescência de Luz em

amostras aquosas, que se apóia na presença de várias estruturas fluorescentes estáveis, intrínsecas à molécula húmica e a seus precursores.

Recentemente, foi proposto a Fluorescência Induzida por Laser (FIL), uma metodologia nova que, além de ser simples e eficiente na análise de matéria orgânica de solos inteiros, tem a vantagem de poder ser aplicada a amostras de solo com alto teor de ferro, incluindo os Latossolos, pois estes constituem uma limitação para os estudos qualitativos da matéria orgânica. Também permite o estudo das frações granulométricas do solo (agregados organo-minerais) secas ao ar, sem as possíveis alterações provocadas por tratamentos químicos. Esta técnica fornece resultados de maneira ágil, limpa e em condições próximas às naturais, pois as amostras não necessitam ser submetidas a nenhum tratamento prévio para extração e fracionamento químico das substâncias húmicas (MILORI, 2003).

Este trabalho teve como objetivo utilizar a técnica da FIL para determinar o grau de humificação da matéria orgânica de um solo (Latossolo) inteiro, isto é, solo sem nenhum tipo de tratamento físico ou químico, como também esse solo submetido a fracionamento físico por tamanho de partículas e relacionar os resultados obtidos com a profundidade do solo e sistemas de manejo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo traz, através da revisão bibliográfica, os trabalhos desenvolvidos por vários pesquisadores sobre a matéria orgânica do solo, seus constituintes e as várias técnicas utilizadas para a caracterização qualitativa e quantitativa do seu grau de humificação.

2.1 MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO E SUA IMPORTÂNCIA

A matéria orgânica do solo consiste de uma mistura de compostos em vários estágios de decomposição, que resultam da degradação biológica de resíduos de plantas e animais, e da atividade sintética de microorganismos (STEVENSON, 1994). Segundo Reeves (1997) e Moreira e Siqueira (2003) a matéria orgânica, por exercer efeitos diretos e indiretos sobre as características do solo e sobre as plantas, é um componente essencial para a qualidade e produtividade dos solos agrícolas. Isto se deve ao fato de que seu conteúdo e sua qualidade são os mais importantes fatores que mantêm a fertilidade dos solos e a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Stevenson (1994), Bayer e Melniczuk (1999) ressaltam a importância da matéria orgânica como um componente chave na capacidade produtiva dos solos tropicais e subtropicais altamente intemperizados. Por isso sua degradação gera efeitos negativos principalmente na retenção de cátions, disponibilidade de nutrientes, estabilidade de agregados e atividade microbiana. Sendo assim, o incremento de matéria orgânica em solos degradados é agronomicamente muito importante porque a fertilidade do solo é restaurada,

retardando sua erosão e constituindo, entre outros efeitos, uma melhor agregação do solo (Piccolo, 1996).

A incorporação de matéria orgânica ao solo melhora a sua estrutura física e biológica, proporcionando maior eficiência na capacidade das plantas em assimilar os nutrientes. Também traz benefício ao meio ambiente, pela capacidade de adsorver traços de elementos poluentes como Pb, Cd e Cu, reduzindo a chance de contaminação da água de superfície e subterrânea (PRIMAVESI, 1987). Outra vantagem se refere à adsorção de pesticidas e outros elementos químicos orgânicos, o que reduz a possibilidade de carreamento desses compostos, prevenindo a contaminação e a degradação do meio ambiente (PIERZYNSKI et al., 1994). Em solos minerais, a matéria orgânica representa menos de 5% dos componentes sólidos (SILVA et al., 2000). Entretanto, ela é responsável por cerca de 70-80% da capacidade de troca de cátions (CTC) em solos tropicais. A alta CTC da matéria orgânica é originada pela quantidade elevada de carga negativa dos grupos carboxílicos e fenólicos presentes nos ácidos húmicos e fúlvicos (MALAVOLTA, 1967; OADES, 1989).

2.2 COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

O termo matéria orgânica do solo designa um conjunto de substâncias altamente heterogêneas que inclui numerosos compostos de carbono, variando de açúcares, proteínas e outros constituintes biológicos, ácidos orgânicos de baixas massas moleculares, como os ácidos acético e oxálico, quase todos facilmente mineralizáveis, até o conjunto complexo de produtos recalcitrantes resultantes de transformações químicas e microbianas da matéria orgânica do solo, as substâncias húmicas.

A matéria orgânica consiste de 98% do COT da matéria morta, raramente ultrapassando 4% da matéria viva proveniente de plantas, microorganismos, da meso e macrofauna morta, e de resíduos de animais e microorganismos do solo. (ZECH et al., 1997).

Os principais constituintes da matéria orgânica são: o carbono (52-58%), oxigênio (34-39%), hidrogênio (3,3-4,8%) e nitrogênio (3,7-4,15%) (SILVA et al., 2004).

O CO é obtido pelas plantas através da fixação fotossintética do CO₂ da atmosfera. O oxigênio e o hidrogênio acompanham o metabolismo do carbono e são obtidos da água também no processo de fotossíntese das plantas. Porém, o nitrogênio, essencial às plantas é requerido em grandes quantidades pela maioria das culturas. Como não faz parte do material de origem do solo, o conteúdo de nitrogênio mineral encontrado em solução é produto, ou da adição de fertilizantes, ou de transformações do nitrogênio orgânico em formas inorgânicas através da mineralização da matéria orgânica, sendo encontrado em solução e absorvido do solo pelas plantas principalmente na forma mineral, nítrica (NO₃²⁻) ou amoniacal (NH⁴⁺) e, excepcionalmente em outras formas orgânicas como ácidos aminados e vitaminas. De todos os elementos que circulam no sistema solo-planta-atmosfera, o nitrogênio é o que apresenta maior número de transformações bioquímicas no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2003).

2.3 CARBONO DO SOLO

O carbono presente na matéria orgânica dos solos do planeta representa um componente fundamental do ciclo do carbono. Segundo estimativas, o solo é o maior compartimento terrestre deste elemento (KERN et al., 1993).

Mais de 90% do carbono orgânico se encontra presente nas frações menores que 50 µm, o que indica um alto grau de humificação (TISDALL e OADES, 1982). As diferentes frações de carbono orgânico humificado do solo apresentam características químicas, físicas e

morfológicas diferenciadas entre si, e a distribuição destas frações no solo pode indicar a qualidade da matéria orgânica (CANELLAS et al., 2003). Quanto menor o tamanho da partícula, maior a quantidade de carbono orgânico (NKEDI-KISSA et al. 1983).

A matéria orgânica representa a principal fonte do total da reserva de carbono terrestre, nela excedendo drasticamente a quantidade de carbono estocada (ZECH et al., 1997), por isso tem um papel fundamental nas funções que a matéria orgânica exerce sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, sendo também um constituinte de importantes gases causadores do efeito estufa, como CO_2 e CH_4 (DIECKOW et al, 2004). Esse reservatório, que excede em quantidade todos os demais reservatórios superficiais, interage com a atmosfera e afeta seu conteúdo em CO_2 . Dessa forma, a estabilidade da matéria orgânica do solo e os efeitos da atividade humana sobre ela devem ser considerados ao se pensar na elevação da concentração de CO_2 atmosférico. Conhecendo melhor a relação entre o manejo e o ciclo do carbono é possível estabelecer sistemas de manejo que minimizem esses efeitos, garantindo, assim, a melhoria da qualidade do solo.

Segundo Silva e Machado (2000), práticas de uso e manejo do solo, como plantio direto, controle da erosão, diminuição do desmatamento, melhoria da fertilidade do solo como fator essencial ao aumento da produção de resíduo cultural e a revegetação de solos degradados poderia contribuir para o seqüestro e estoque de carbono no solo. Seqüestro de carbono no solo significa transformar o carbono presente na atmosfera (na forma de CO_2) em carbono estocado no solo, compondo a matéria orgânica. Os três principais processos responsáveis pelo seqüestro de carbono nos solos são: a humificação, a agregação e a sedimentação. Ao mesmo tempo, os processos responsáveis pelas perdas de carbono no solo são: a erosão, a decomposição, a volatilização e a lixiviação. Assim, a adoção de sistemas de manejo sem revolvimento do solo e a permanência de restos de culturas nas áreas de plantio, favorecem o contínuo aporte de carbono orgânico, o que é fundamental para a manutenção de

uma estrutura de boa qualidade (CARPENEDO e MIELNICZUK, 1990). O plantio direto apresenta-se como um sistema de manejo conservacionista, pois, além de não revolver o solo, mantém os resíduos vegetais na superfície, preservando e/ou aumentando o teor de matéria orgânica (BAYER; MIELNICZUK, 1997; CASTRO FILHO et al., 1998).

2.4 CONTEÚDO DE MATÉRIA ORGÂNICA NO SOLO

A vegetação é a principal responsável pela deposição de materiais orgânicos no solo. O tipo de vegetação e as condições ambientais são os fatores determinantes da quantidade e qualidade do material que cai no solo, determinando heterogeneidade e taxa de decomposição do material depositado na superfície.

Em função do grau de concentração de certos componentes, o material degrada mais ou menos rapidamente. A fração ativa, representada pelas substâncias não húmicas (aminoácidos, proteínas, carboidratos, ácidos orgânicos, etc.), é decomposta em menos de um ano, enquanto outras frações, representadas pelas substâncias húmicas, são muito resistentes a degradação e seu tempo de existência pode ser de séculos ou até de milênios (SCHNITZER e KHAN, 1978).

Outros tipos de materiais orgânicos são depositados no solo, onde são incorporados em seu perfil ou são transformados em sua superfície, constituindo-se na matéria orgânica do solo.

O conteúdo de matéria orgânica pode ser uma consequência do manejo dado ao solo. Práticas de manejo inadequadas são responsáveis pela diminuição da matéria orgânica, alterando suas propriedades, facilitando a erosão com conseqüente decréscimo da produção das culturas promovendo, assim, poluição ambiental (PEIXOTO, 1997).

2.5 MINERALIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A mineralização é de grande interesse para a fertilidade do solo e à nutrição vegetal, pois converte elementos (C, N, S, P) ligados organicamente para a forma mineral de compostos inorgânicos (CO_2 , NO_3^- , NH_3 , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}). Os componentes minerais do solo constituem a principal fonte de nutrientes, sendo a sua liberação relacionada com a decomposição e a mineralização, a qual afeta as diferentes fontes de matéria orgânica do solo, como as fontes primárias acima e abaixo do solo, as secundárias, os compostos húmicos e também a matéria orgânica dissolvida. A velocidade de mineralização e a quantidade de nutrientes liberadas diferem grandemente entre estas frações de matéria orgânica do solo (ZECH et al. 1997).

Os principais tipos de reações que ocorrem durante o processo de mineralização são: *aminização*, que consiste na decomposição de materiais orgânicos complexos em materiais mais simples, como aminoácidos, amins e açúcares aminados; *amonificação*, que consiste na formação de compostos amoniacais a partir dos aminoácidos e amins; e *nitrificação*, que consiste na oxidação biológica do NH_4^+ a NO_3^- (TISDALE et al., 1985; MENGEL; KIRKBY, 1987; SANTOS, 1991).

As duas primeiras envolvem microrganismos heterotróficos e a terceira envolve, principalmente, bactérias autotróficas do solo, designadamente do gênero *nitrosomonas* (responsáveis pela conversão do NH_4^+ a NO_2^-) e *nitrobacter* (que convertem o NO_2^- a NO_3^-).

A mineralização do nitrogênio orgânico do solo pode ser utilizada como um indicador potencial de sua disponibilidade às culturas, podendo este potencial e a respectiva taxa de mineralização serem utilizados na predição da disponibilidade de nitrogênio às plantas em um determinado período de tempo, o qual depende de fatores como temperatura, aeração, umidade, quantidade e natureza do material orgânico presente.

Alguns fatores influem na cinética de mineralização do nitrogênio como a textura, a estrutura, a fertilidade, o pH, a vegetação que modifica a temperatura do solo, a atividade biológica, a umidade do solo e a interação solo-planta (GONÇALVES et al., 2001).

2.6 FRACIONAMENTO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A matéria orgânica influencia os principais processos químicos, físicos e biológicos do solo. Por isso, é fundamental quantificar as frações que a compõem para a compreensão dos processos que regulam ou determinam as propriedades do solo (PEIXOTO, 1997). Assim, a matéria orgânica pode ser dividida em dois grandes compartimentos: um composto pela fração não-humificada, lábil (biodegradável, leve), representada pelos restos vegetais e animais pouco decompostos e pelos compostos orgânicos com categoria bioquímica definida (proteínas, açúcares, ceras, graxas, resinas), representando 1/3 do carbono orgânico do solo, com alta taxa de decomposição e curto período de permanência nos solos e sedimentos (THENG et al., 1989; ANDRIULO et al., 1990); e outro compartimento formado pela fração humificada (estável, de maior massa molecular), sendo os maiores constituintes da fração orgânica dos solos, sedimentos e águas, ocorrendo praticamente em todos os sítios terrestres e aquáticos (SCHNITZER; KHAN, 1978; SANTOS; CAMARGO, 1999).

As frações da matéria orgânica estão continuamente sendo decompostas e também renovadas, com a adição de materiais orgânicos no solo, sendo que o tempo de reciclagem dessas frações varia de poucos meses a vários séculos. Assim, a elevada estabilidade química apresentada por determinadas frações orgânicas resulta da recalcitrância das substâncias que as compõem, das transformações que elas sofrem e de mecanismos de proteção contra a decomposição, como a formação de complexos com argilo-minerais. Isto explica os teores

mais elevados de matéria orgânica observados em solos mais argilosos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2003).

O teor de matéria orgânica do solo está intimamente relacionado ao manejo adotado e, por esta razão, é utilizada para monitorar a qualidade do solo em sistemas agrícolas. Os termos frações lábeis e frações estáveis são conceitos relativos baseados na taxa de decomposição no solo de um constituinte orgânico em particular.

Os constituintes lábeis se decompõem dentro de poucas semanas ou meses, enquanto que os constituintes estáveis podem persistir por anos ou décadas no solo (THENG et al., 1989) ou até mesmo por séculos ou milênios no solo (ZECH et al., 1997). As taxas de decomposição variam muito, mesmo para substratos simples como a glicose. Polímeros, tais como polifenóis, celulose e proteínas (pela interação com polifenóis) são decompostos mais lentamente e sua resistência para a decomposição aumenta de acordo com a sua complexidade.

2.7 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

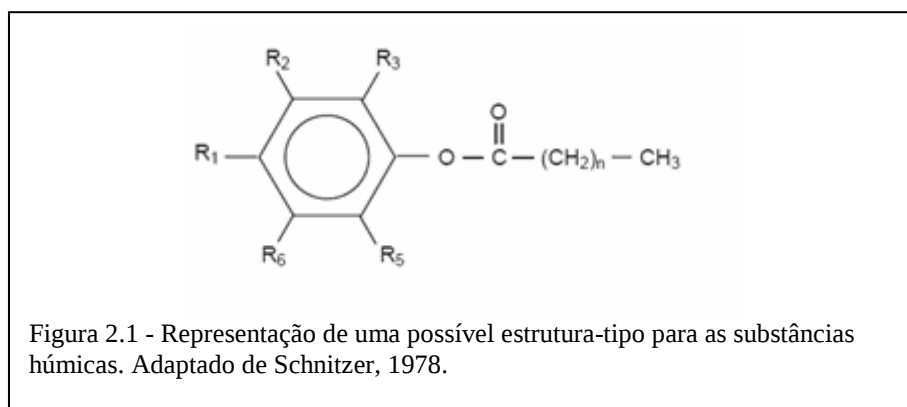
As substâncias húmicas constituem, em conjunto, um componente essencial produzido pelo solo. Elas surgem da degradação de resíduos de plantas e animais e da atividade sintética de microorganismos, sendo produto da intensa transformação dos resíduos orgânicos pela biomassa e polimerização dos compostos orgânicos (principalmente através de reações de condensação, de metilação e oxidação) até macromoléculas resistentes a degradação biológica (SCHNITZER; KHAN, 1978; SANTOS ;CAMARGO, 1999). São substâncias amorfas, constituídas por um biomaterial do solo marrom escuro, parcialmente aromáticas, principalmente hidrofílicas e quimicamente complexas, por isso pouco se sabe sobre sua origem, síntese, estrutura química e funções.

As substâncias húmicas são consideradas o estágio final da evolução dos compostos de carbono no solo, como também os componentes mais recalcitrantes da matéria orgânica do solo, sendo constituídas por uma mistura heterogênea de compostos orgânicos naturais com alta massa molecular (STEVENSON, 1994). Ainda, segundo esse mesmo autor, as diversas frações húmicas acima referidas representam, na verdade, um sistema de polímeros que variam de uma forma sistemática no que respeita a análise elementar, acidez, grau de polimerização e peso molecular. A estes polímeros estão ligados diversos grupos funcionais e cadeias alifáticas, de acordo com os resultados de processos de análise química, sempre à base da digestão de amostras seguida da identificação de fragmentos (JENKINSON, 1988).

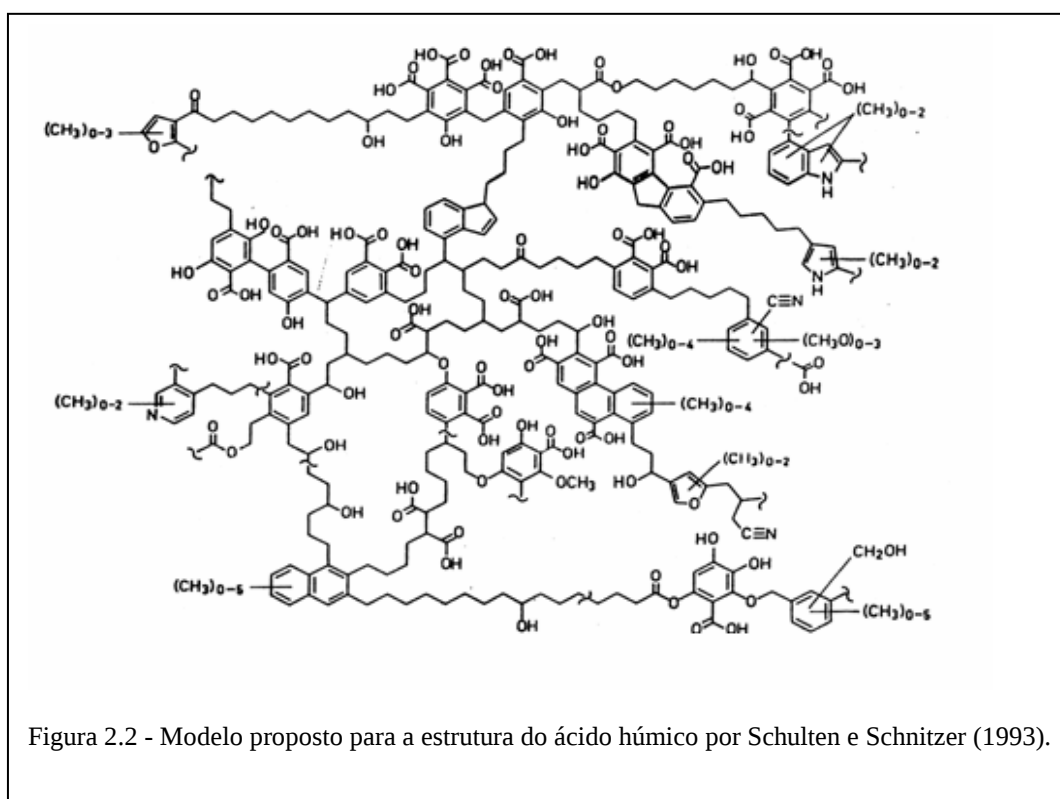
Em geral, as substâncias húmicas são os componentes mais estáveis da matéria orgânica, representando até 80% do carbono presente nos solos. A estrutura e a composição das substâncias húmicas parecem ser influenciadas, dentre outros parâmetros, pelo material de origem, pelo pH, pela vegetação e pelo sistema de manejo do solo (DICK et al., 1999). Senesi e Lofreddo (1999) estimam que as substâncias húmicas perfaçam em média 65% da matéria orgânica dos solos, sendo o restante dividido entre carboidratos (10%), grupos contendo N (10%) e lipídeos (15%). Estes valores, no entanto, variam em função do tipo de solo e da adição de material orgânico.

As substâncias húmicas têm sido objeto de vários estudos pelos cientistas. Assim, desde instrumentação até procedimentos químicos para o estudo de sua composição estão sendo realizados, pois um dos mais importantes interesses são os riscos para a saúde causados pelos trihalometanos, produto de cloração, formados com as substâncias húmicas na água e a emissão do gás carbônico à atmosfera, pois é sabido que as substâncias húmicas constituem um meio de se garantir o seqüestro de carbono no solo, armazenando-o e contribuindo para minimizar o aquecimento global (CARVALHO et al. 2004).

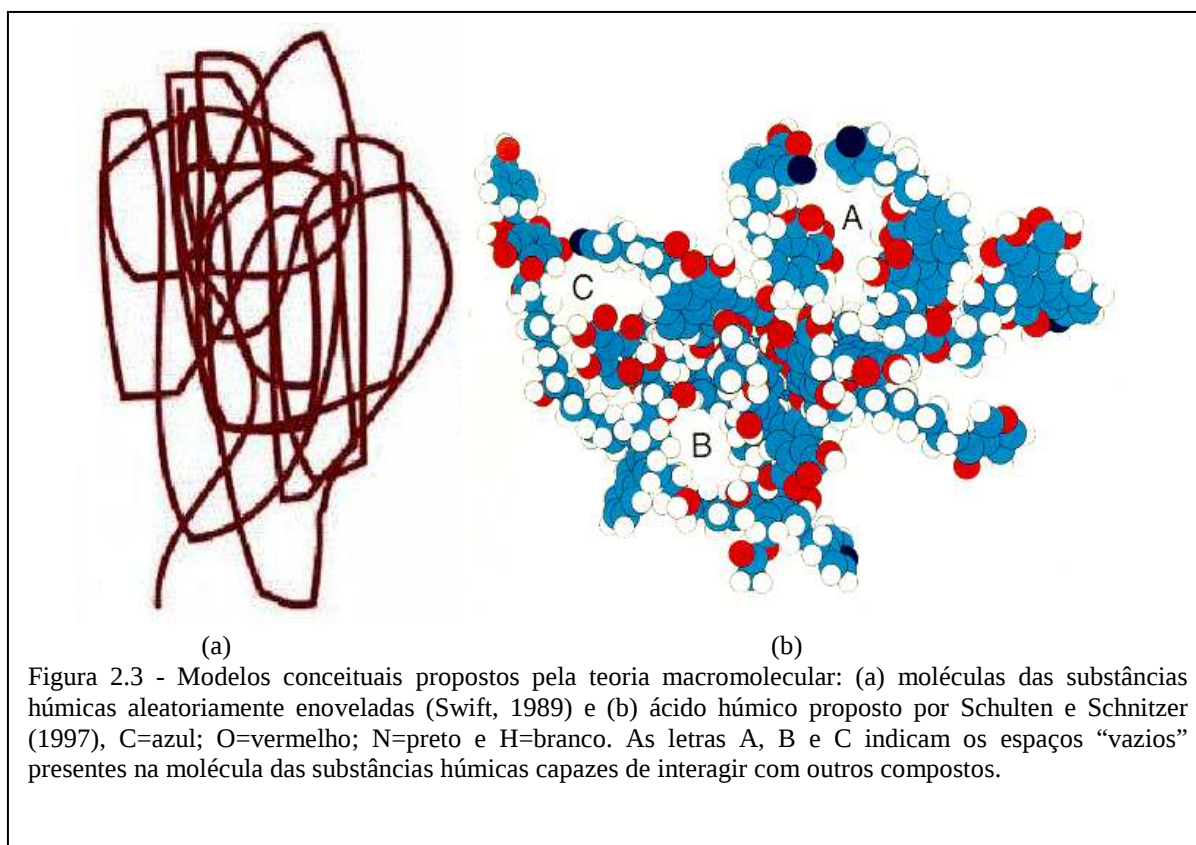
Várias investigações têm sido realizadas a fim de se propor uma estrutura básica para as substâncias húmicas, sem que se tenha obtido uma configuração definitiva bem aceita. Sabe-se hoje da existência nessas substâncias de grupos OH formando ligações de hidrogênio, ligações por amidas e, eventualmente, ligações C – C aromáticas, ligações alifáticas C – H, grupos carboxílicos ligados a carbonos alifáticos ou aromáticos (JENKINSON, 1988), podendo estes últimos estar esterificados com grupos OH de natureza fenólica (SCHNITZER, 1977 cit. por SCHNITZER 1978), conforme a figura 2.1 abaixo.



Baseados na técnica de ^{13}C -NMR, da pirólise e degradação oxidativa, pelo qual o ácido húmico é representado como uma macromolécula, isto é, os ácidos húmicos seriam estruturas formadas por longas cadeias alifáticas, grupos OH fenólicos, ligados e livres, além de estruturas de quinona, nitrogênio e oxigênio como ponte de ligação dos grupos de COOH localizados de diferentes formas nas cadeias aromáticas, Schulten e Schnitzer (1993) desenvolveram uma estrutura de ácido húmico (Fig. 2.2).



Essas citações foram baseadas na proposta de que as substâncias húmicas (Figura 2.3a) seriam macromoléculas orgânicas que teriam características similares às macromoléculas biológicas tais como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lignina (SHNITZER; KHAN, 1972; SCHULTEN; SCHNITZER, 1993). Mais tarde, Schulten e Schnitzer, (1997) propuseram a existência de vazios de diferentes tamanhos dentro das moléculas (Figura 2.3b), os quais poderiam alojar outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos como lipídios, carboidratos, agrotóxicos também poluentes inorgânicos como argilas e óxidos—hidróxidos. (SCHULTEN E SCHNITZER, 1997).

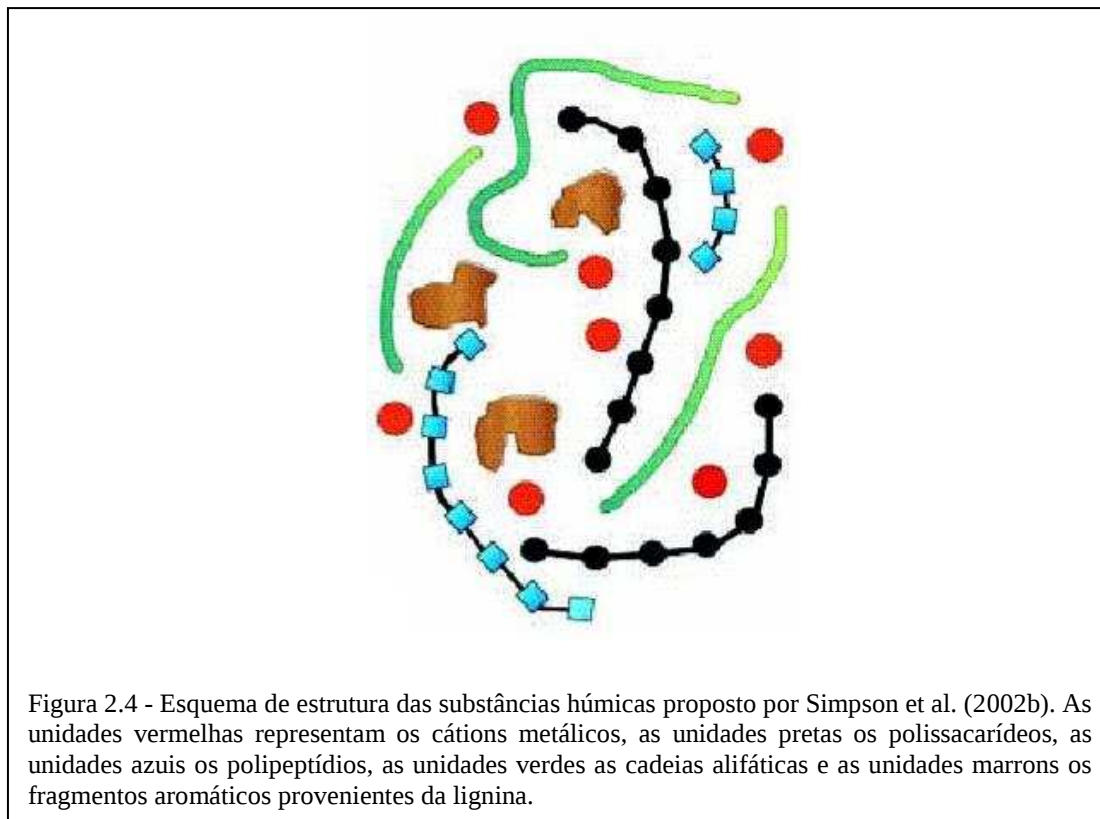


Recentemente foi proposto um novo modelo no qual as substâncias húmicas seriam formadas por estruturas supramoleculares (PICCOLO, 2001, 2002; PICCOLO; CONTE, 2000; CONTE; PICCOLO, 1999). Neste modelo propõe-se que as substâncias húmicas em solução formam grandes agregados húmicos estabilizados por ligações fracas, tais como, ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas.

O grande tamanho molecular aparente das substâncias húmicas, nesta teoria, é explicado pela auto-organização em conformações supramoleculares. Além disso, é proposto que as substâncias húmicas são provenientes de produtos de degradação enzimática de plantas e complexos de ligninas (WERSHAW, 1986, 1993).

O modelo supramolecular foi reforçado pelos resultados obtidos por Simpson, (2002a) e Simpson et al., (2002b). Estes autores demonstraram que as substâncias húmicas extraídas de solos são formadas por uma mistura de substâncias agregadas de baixa massa molecular. Assim, foi proposto um esquema de estrutura (Figura 2.4) para ilustrar como as principais

estruturas identificadas nas substâncias húmicas poderiam formar um agregado na presença de cátions metálicos de ocorrência natural nos ecossistemas terrestres.



As substâncias húmicas possuem alta capacidade de retenção e armazenamento de água para as culturas, tendo importante papel regulador para evitar processos erosivos. No solo, essas substâncias possuem grande capacidade de retenção de calor devido a sua coloração escura, beneficiando a germinação de sementes, desenvolvimento de raízes e tendo, também, papel importante no transporte de compostos orgânicos no ambiente. Possuem alta CTC, sendo a principal reguladora da CTC na maioria das situações; quando combinada com argilas forma agregados que facilitam a aeração e estruturam o solo; formam complexos com macro e micronutrientes influenciando, dessa maneira, a disponibilidade destes para as plantas, reagindo, também, com pesticidas e metais como chumbo e alumínio (SCHNITZER; KHAN, 1978).

2.8 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Devido a sua heterogeneidade, a matéria orgânica tem sido fracionada para estudos mais detalhados, podendo ser caracterizada através da análise de seus componentes lábeis (não húmicas) e não lábeis (húmicas) (ZECH et al., 1997). Christensen (2000) relata que diversos tipos de fracionamento são utilizados em estudos sobre a matéria orgânica do solo visando avaliar esta heterogeneidade, separando frações homogêneas quanto à natureza, dinâmica e função, mas ao mesmo tempo diferentes das outras frações do solo. Assim sendo, um dos procedimentos mais utilizado para estudos de matéria orgânica humificada em solos é o fracionamento químico baseado nas características de solubilidade das substâncias húmicas (SCHNITZER; KHAN, 1978; SWIFT, 1996).

Para estudos estruturais significativos, é desejável trabalhar-se com substâncias puras. No entanto, substâncias húmicas são misturas de compostos cuja separação em discretas substâncias é um desafio constante. Por exemplo, ao contrário de muitas outras classes de compostos orgânicos que ocorrem naturalmente, as substâncias húmicas não são definidas em termos de sua composição química total ou conteúdo de grupos funcionais. Em vez disso, elas são definidas em termos de seu comportamento com relação à solubilidade em sistemas aquosos. Esta definição, muitas vezes se torna insatisfatória porque pode incluir uma grande classe de compostos orgânicos que podem ou não ser substâncias húmicas. Isso torna o estudo e o entendimento das substâncias húmicas muito incerto. Um dos maiores problemas enfrentados para se estudar a matéria orgânica é a necessidade de sua extração do solo.

Em solos minerais, por exemplo, os componentes orgânicos e inorgânicos estão intimamente associados, sendo geralmente necessário primeiro separá-los a fim de estudá-los mais detalhadamente (SCHNITZER; KHAN, 1978).

Nos últimos anos, alguns métodos não destrutivos estão sendo usados a fim de fracionar a matéria orgânica do solo para o estudo de sua dinâmica no solo. Os métodos de fracionamento físico, por exemplo, têm sido utilizados de forma ampla em estudos sobre a matéria orgânica do solo pelo fato de causar menor modificação dos constituintes orgânicos que o fracionamento químico (BARRIUSO; KOSKINEN, 1996). O método físico separa as frações orgânicas com diferentes propriedades químicas de acordo com a sua associação com componentes minerais (ANDREUX et al., 1991; TURCHENEK; OADES, 1979) e a matéria orgânica do solo menos humificada (fração grosseira) da mais humificada (geralmente < 50 µm). A escolha do método de fracionamento depende da natureza do estudo, isto é, da caracterização química de componentes específicos da matéria orgânica do solo, ou quantificação, ou descrição dos compartimentos de matéria orgânica do solo (COLLINS et al., 1997).

A técnica de fracionamento físico no estudo da matéria orgânica do solo tem-se mostrado promissora, pois possibilita a separação de diferentes compartimentos orgânicos, cada qual respondendo às práticas de manejo, de forma distinta (COLLINS et al., 1997; BARRIUSO; KOSKINEN, 1996).

De acordo com Stevenson (1994), o solvente ideal para extração das substâncias húmicas é aquele que permite o isolamento do material sem alteração de suas características físico-químicas, extrai as substâncias livre de contaminantes inorgânicos, como argilas e cátions polivalentes, e pode ser aplicado em todos os solos.

O método proposto pela IHSS – International Humic Substances Society é o de solubilização da matéria orgânica do solo em solução de hidróxido de sódio (NaOH) e seu fracionamento baseado nas características de solubilidade das substâncias húmicas. Da extração alcalina geralmente feita em solução de NaOH, a qual baseia-se no princípio da solubilidade das substâncias húmicas, obtém-se os ácidos fúlvicos, que apresentam grande

quantidade de grupamentos funcionais oxigenados e são solúveis tanto em meio ácido como básico, isto é, solúveis a qualquer pH, os ácidos húmicos, insolúveis em meio fortemente ácido, pois, com a protonação dos grupamentos funcionais ocorre o colapso da estrutura e precipitação das macromoléculas, representando a fração reativa mais estável da matéria orgânica humificada e as huminas, que representam a matéria orgânica intimamente ligada à fração mineral do solo, e por isso insolúveis a qualquer valor de pH (SAAB, 1999; SAAB; MARTIN-NETO, 2004).

A figura 2.5 apresenta algumas características das substâncias húmicas. Estruturalmente, há uma grande semelhança entre os ácidos húmicos e os ácidos fúlvicos, diferenciando-se apenas na massa molecular e no conteúdo de grupos funcionais. As huminas não são representadas na figura porque este componente consiste, segundo Stevenson (1982), em ácidos húmicos intimamente ligados à fração mineral que não podem ser separados e matéria húmica altamente condensada, com elevado conteúdo de carbono (> 60%) e, por isso, insolúvel em álcali.

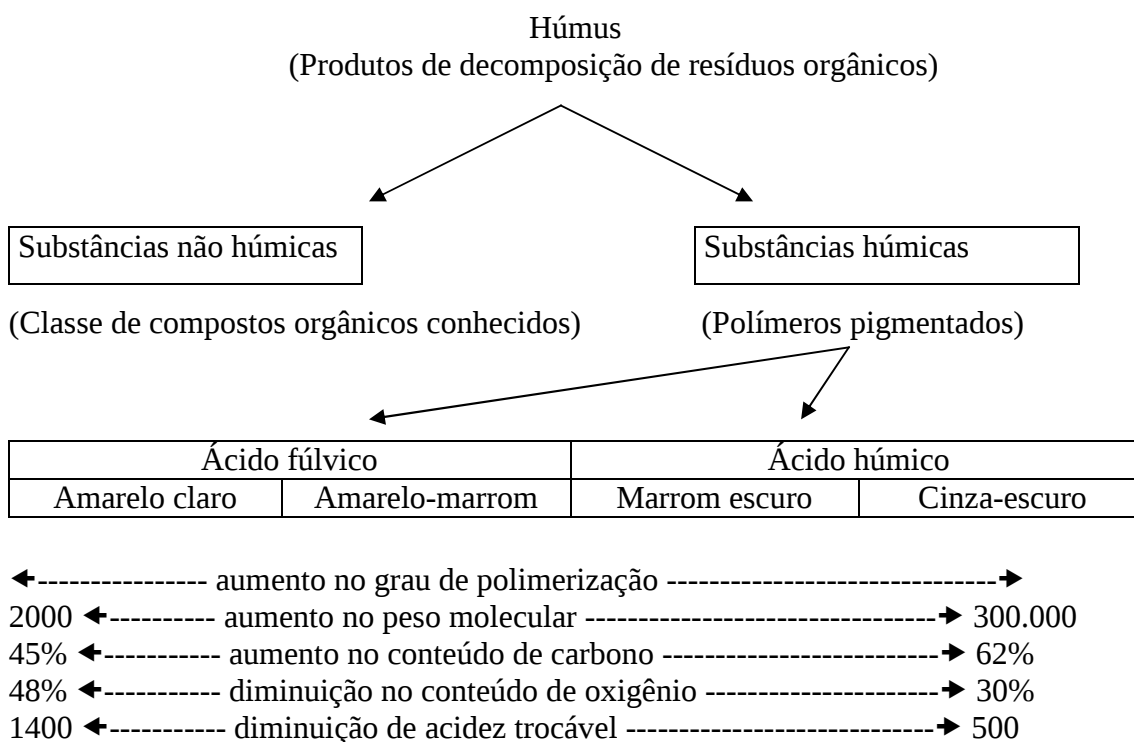


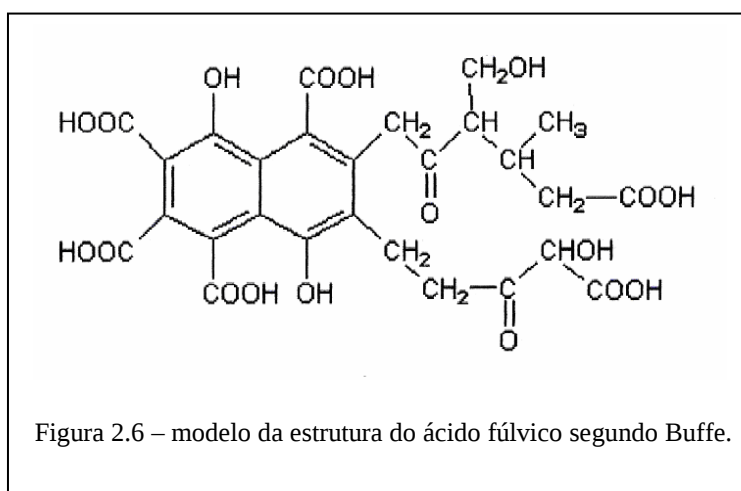
Figura 2.5 - Classificação e propriedades das SH (modificado por Stevenson, 1985).

2.10 ÁCIDOS HÚMICOS

Os ácidos húmicos são caracterizados por apresentarem uma maior massa molar, maior conteúdo de carbono e menores conteúdos de oxigênio em grupos funcionais fenólicos e carboxílicos. Eles afetam em maior grau as características do solo como agregação e retenção de água.

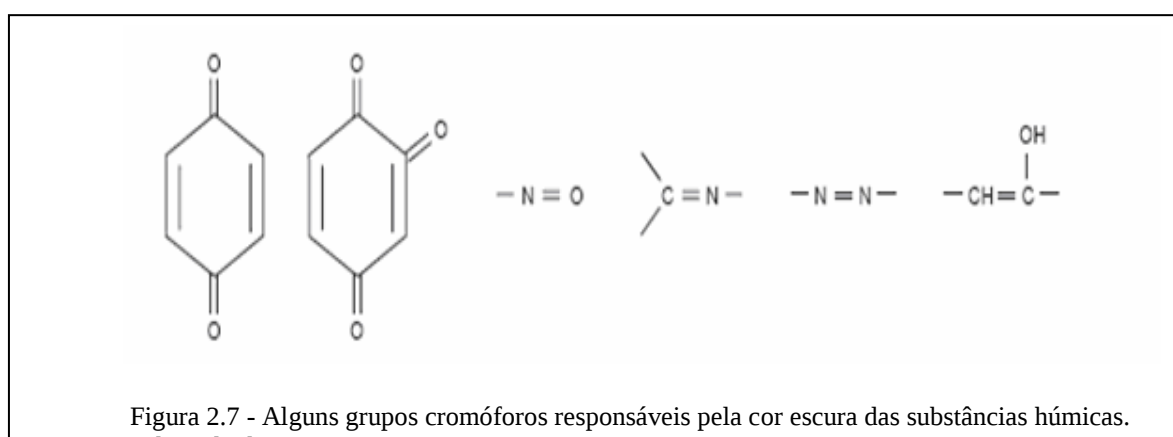
Os ácidos fúlvicos, por apresentarem menor massa molar, maior solubilidade, conseqüentemente maior mobilidade, e maior conteúdo de grupos funcionais carboxílicos e fenólicos, afetam mais diretamente as propriedades químicas do solo, como, por exemplo, na formação de complexos de íons metálicos e aumento de capacidade de troca catiônica, dentre outras.

O modelo da estrutura para o ácido fúlvico contém as estruturas aromáticas e alifáticas, ambas substituídas amplamente com grupos funcionais que contêm oxigênio, sendo um composto com massa molecular menor que os ácidos húmicos, conforme sugere a figura 2.6.



Os ácidos húmicos e os ácidos fúlvicos distinguem-se um do outro, segundo Stevenson (1986), pelo seu maior teor em oxigênio e menor em carbono, pela maior acidez de

troca dos ácidos fúlvicos em confronto com os ácidos húmicos e pelo menor peso molecular por parte dos ácidos fúlvicos. De acordo com Stevenson (1986) uma molécula “tipo” de ácido húmico consiste em micelas de natureza polimérica cuja estrutura básica é composta de anéis aromáticos de fenol di ou tri-hidroxilado, ligados entre si por grupos como - O -, - CH₂ -, - NH -, - N -, - S - ou outros. Tais anéis contêm como substituintes grupos OH livres e/ou duplas ligações quinona. Quer as ligações quinona quer outros grupos cromóforos, que são grupos de átomos com ligações não saturadas, cuja faixa de absorção de energia vai de 200 a 400 nm e de 400 a 800 nm, correspondentes ao ultravioleta e ao visível, como os representados na figura 2.7, são responsáveis pela cor escura das substâncias húmicas.



De acordo com o modelo supramolecular, os ácidos fúlvicos seriam formados por pequenas micelas estáveis que permaneceriam dispersas pela repulsão das cargas negativas originadas da dissociação da grande quantidade de grupos ácidos presentes em sua estrutura. Por outro lado, as micelas de ácidos húmicos, poderiam aproximar-se o suficiente para formar agregados de elevada massa molecular, por apresentarem menor quantidade de grupos funcionais ácidos (HAYES; CLAPP, 2001).

Após o fracionamento das substâncias húmicas, suas características podem ser estudadas com base na composição elementar, no arranjo destes elementos na estrutura e nos tipos e localizações dos grupos funcionais na estrutura da molécula. Assim sendo, métodos

analíticos e espectroscópicos têm sido usados como ferramenta para o estudo das substâncias húmicas isoladas de resíduos, solos e sedimentos.

2.12 ANÁLISE ELEMENTAR E RAZÃO ATÔMICA

A análise elementar é o método mais usado para a caracterização das substâncias húmicas e informa sobre a quantidade dos componentes maiores formadores dessas substâncias (C, H, N, O, S). Com os dados da análise elementar não é possível se chegar à fórmula molecular de ácidos húmicos ou ácidos fúlvicos, mas ela fornece uma noção da composição geral da molécula, e é muito utilizada para explicar a geoquímica das substâncias húmicas. Pode ainda ser interpretada para diferenciar as classes das substâncias húmicas, pois é um indicativo da eficiência do processo de purificação.

As principais transformações que ocorrem durante a decomposição de resíduo e a humificação, são as perdas de polissacarídeos e componentes fenólicos, enriquecimento em estruturas aromáticas recalcitrantes e modificação das estruturas de lignina (ZECH et al., 1997). Estas estruturas são dificilmente decompostas com respeito a açúcares e proteínas (ROSA et al., 2000) Desta forma, relações atômicas C/N, C/H, H/C e C/O têm sido usados como indicadores da aromaticidade e níveis de materiais orgânicos decompostos podendo ser calculadas a partir dos dados da análise elementar, sendo essas razões úteis para identificar os tipos de substâncias húmicas, monitorar mudanças nas suas estruturas e fornecer dados para estabelecer fórmulas estruturais para as moléculas.

A relação C/N, mesmo não sendo o único fator, é capaz de fornecer uma previsão da taxa de decomposição. Os microorganismos necessitam de carbono como fonte de energia, de esqueletos carbônicos para sintetizar biomoléculas diversas e de nitrogênio para sintetizar proteínas. Durante a decomposição da matéria orgânica, o consumo de carbono é maior que o

de nitrogênio, isso faz com a concentração relativa de nitrogênio aumente, diminuindo, por consequência a relação C/N (MARQUES, 2003; GONZALEZ-PÉREZ, 2004; SANTOS, 1999). Nesta relação quanto maior este valor, maior será o tempo de decomposição. Logo, quanto menor a quantidade de nitrogênio no processo, mais lentamente este ocorrerá.

A relação C/N pode ser utilizada ainda para inferir o grau de estabilização da matéria orgânica, no que se refere ao ataque microbiano (FERNANDES, 2000). Segundo Kumada (1987), a humificação de resíduos orgânicos é caracterizada por sua fragmentação, formação de húmus, abaixamento da relação C/N e sua transformação de preto-amarronzado para substâncias amorfas pretas. Não apenas microrganismos, mas também animais do solo participam do processo de humificação (KUMADA, 1987).

A relação C/N é um indicativo de que a matéria orgânica está na forma de pré-composto, bioestabilizada ou humificada. Para se obter a relação C/N se divide os percentuais de carbono e nitrogênio e o peso atômico do elemento, aplicando a seguinte razão: $C/N = (C\%/ \text{massa molar C}) / (N\%/ \text{massa molar N})$. Segundo alguns autores (STEVENSON, 1994; STEARMAN et al.; 1989; ROSA, 2004, ROSELL et al., 1989, ROMÃO; ROCHA, 2005), maiores valores de H/C (ou menores valores de C/H) indicam maior quantidade de grupos alifáticos, típicos de materiais menos humificados, enquanto que amostras mais humificadas apresentam, em geral, maiores valores de O/C, C/N e menores razões H/C. Esses resultados, no entanto, não estão de acordo aos obtidos por outros pesquisadores. Martin-Neto et al. (2000) encontraram altas concentrações de radicais semiquinonas, detectados por EPR, correlacionando com menores valores de razão C/N da fração orgânica avaliada e associando essas características ao maior grau de humificação dos ácidos húmicos Schnitzer e Khan (1978), encontraram maiores níveis de radicais livres semiquinona em amostras de solo com tamanho $< 50 \mu\text{m}$, o que é correlacionado razoavelmente bem com baixas razões C/N e associados a amostras com maior grau de humificação. Dick (1997), estudando também

ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho, com alta razão C/N e baixa razão H/C, verificou por meio de RMN ^{13}C , que os ácidos húmicos desse solo apresentavam baixo grau de aromaticidade e maiores quantidades de estruturas alifáticas, indicando que estas razões relacionam-se bem com o grau de aromaticidade das substâncias húmicas. Segundo Zech et al. (1997), quanto menor o valor da relação C/N, mais acentuado é o caráter aromático do carbono.

Essa razão também pode informar sobre o grau de humificação das substâncias húmicas, menores relações C/N indicam maior grau de humificação. Bezerra et al. (2006), verificando a viabilidade da aplicação de lodo, produzido pela Estação de Tratamento de Esgoto do Aeroporto Internacional do Rio de Janeiro (ETAR-APOIO), à revegetação de uma área degradada do aeroporto, concluiu que o material encontrava-se estabilizado devido a sua baixa reação C/N.

Observando possíveis alterações na distribuição das frações humificadas da matéria orgânica e das características estruturais dos ácidos húmicos de amostras de horizontes estruturais de dois solos tratados com adição de resíduos de origem urbana, Canellas et al. (2001) verificaram que os menores valores da relação C/N nos ácidos húmicos de um Argissolo Vermelho-Amarelo com a adição dos resíduos orgânicos caracterizavam a maior estabilidade química desta fração humificada e Amelung (1998), ao analisar frações de solo (areia grossa), encontrou altos valores da relação C/N sugerindo, assim, um baixo grau de humificação da matéria orgânica desse material particulado.

2.14 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE ANÁLISE APLICADAS AO ESTUDO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Nos últimos anos, as técnicas de análises espectroscópicas vêm sendo utilizadas para identificar o grau de humificação da matéria orgânica do solo, permitindo observar as

mudanças que ocorrem na conformação estrutural dos grupos funcionais da matéria orgânica, sendo que o seu uso em conjunto permite o estudo das características estruturais da matéria orgânica. Entre esses métodos destacam-se: RPE, RMN, FTIR, espectroscopia ótica no UV–visível e Fluorescência no UV - visível.

A espectroscopia de fluorescência (detalhado no capítulo 3) tem sido amplamente utilizada para estudos das substâncias húmicas. Zsolnay et al. (1999) e Kalbits et al. (1999) a utilizaram para avaliar o grau de humificação e o tamanho molecular das substâncias húmicas. Senesi et al. (1991), com a finalidade de estabelecer critérios para diferenciação e classificação das substâncias húmicas, propuseram a utilização das propriedades fluorescentes dessas substâncias e Milori et al. (2002) determinaram através dessa técnica o grau de humificação de ácidos húmicos.

2.14.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A RPE avalia o grau de humificação das substâncias húmicas através da quantificação de radicais livres do tipo semiquinonas (SENESI, 1990, MARTIN-NETO et al., 1994a; SAAB, 1999; SAAB; MARTIN-NETO, 2003). Essa técnica é uma das poucas, entre os métodos de laboratório que pode fornecer informações estruturais, sem artefatos ou condições experimentais restritivas, sobre a complexação dos íons metálicos paramagnéticos (Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Cr^{+3} e outros) com as substâncias húmicas (MARTIN-NETO et al., 1991).

2.14.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A RMN permite a visualização de grupos funcionais que compõem as substâncias húmicas e correlaciona o grau de humificação com o grau de aromaticidade das substâncias

húmicas (KRØSSHAVN et al., 1992, ZECH et al., 1997), sendo extensivamente utilizada para informações sobre os núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N e ^{27}Al , identificação de mecanismos de decomposição, efeitos de cultivo, caracterização de formas orgânicas de nitrogênio e fósforo e interação da matéria orgânica com xenobióticos e metais. Através da espectroscopia de RMN de ^{13}C a caracterização estrutural e a determinação do grau de aromaticidade e alifaticidade das substâncias húmicas, em amostras nos estados sólido e líquido podem ser determinados (SAAB, 1994; SAAB; MARTIN-NETO, 2007).

Esta técnica é atualmente a mais usada para caracterizar as substâncias húmicas do solo, sendo possível a utilização de amostra sólida ou líquida (CONTE et al., 1997), não sendo destrutiva e preservando a amostra para outras análises com economia de solventes e permitindo a avaliação *in situ* da matéria orgânica do solo. No entanto, apresenta algumas limitações como baixa sensibilidade devido à pequena abundância natural da maioria dos núcleos e os tempos de relaxação muito longos que exigem experimentos com longa duração.

2.14.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.

Esta técnica baseia-se no fato de que os diversos tipos de estruturas moleculares e de ligações químicas existentes numa molécula absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho, em comprimento de onda característico, fazendo com que cada ligação química vibre numa faixa espectral específica que vai refletir o ambiente químico de inserção de cada grupo de átomos analisado (CERETTA et al., 1999).

A FTIR é uma ferramenta que permite analisar a natureza química, reatividade e arranjo estrutural de grupos funcionais contendo oxigênio, a presença de proteínas e carboidratos e a eficiência do processo de purificação da amostra quanto à contaminantes como argila, sais e metais (STEVENSON, 1994).

Segundo Benites et al. (1999), a introdução da técnica de transformada de Fourier na determinação dos espectros de infravermelho proporcionou avanços como maior velocidade na leitura dos espectros, proporcionando uma melhoria na definição dos sinais e exatidão na análise e redução do custo do equipamento, tornando-se um método simples e barato comparado a outras técnicas espectroscópicas, além da pequena quantidade de amostra requerida na análise.

Complementando os dados obtidos por RMN, as análises de FTIR têm sido usadas para identificar grupos funcionais carboxila, amina, hidroxila, carbonila e outros (SCHNITZER, 1978; STEVENSON, 1994). Estas informações são úteis porque permitem identificar possíveis processos de oxidação e alteração de grupos funcionais, associados aos efeitos de manejos, devido, por exemplo, ao aumento ou redução da aeração do solo, mudança de pH, complexação com micronutrientes de fertilizantes ou ocorrendo naturalmente no solo, e com metais pesados.

2.14.4 Espectroscopia de Absorção de Luz UV- visível.

A Espectroscopia de UV-visível envolve transições eletrônicas. A razão das absorbâncias 465 e 655 nm (E_4/E_6) tem sido muito utilizada, apesar de existir controvérsias a seu respeito, como um indicador do grau de condensação e humificação das substâncias húmicas de solos. Com o aumento da massa molecular e da condensação dos anéis essa razão decresce, sendo utilizada como um indicador do grau de condensação. Assim, se a razão E_4/E_6 é baixa, indica alto grau de condensação dos constituintes aromáticos e se for alta infere-se a presença de um número relativamente maior de estruturas alifáticas.

Recentemente Saab e Martin-Neto (2007), estudando AH de gleissolos mostraram que a razão E_4/E_6 correlacionou muito bem com a quantidade de anéis aromáticos condensados, determinados por CP/MAS RMN ^{13}C juntamente com a técnica de defasagem dipolar.

A espectroscopia de UV-visível é muito utilizada devido ao fácil manuseio, rapidez e baixo custo operacional. Possui também baixos limites de detecção, o que possibilita determinações em pequenas quantidades de amostra e possibilidade de quantificação a partir de comparações com padrões. Porém, não é uma técnica qualitativa, pois, como é uma absorção molecular, o espectro gerado é de bandas. Os espectros no UV-visível correspondem a um gráfico de frequência ou comprimento de onda de absorção, relacionado com a intensidade de absorção, medida em transmitância ou absorbância.

Uma outra técnica espectroscópica também usada na análise de solos é a fluorescência e, mais recentemente, a fluorescência induzida por laser, a qual tem se mostrado eficaz na análise de solos inteiros. Essa técnica será tratada no capítulo a seguir.

CAPÍTULO 3

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

3.1 FOSFORESCÊNCIA E FLUORESCÊNCIA

As moléculas apresentam diferentes níveis energéticos podendo sofrer transições entre estes níveis pela absorção ou emissão de um quantum discreto de luz com energia igual à separação entre os níveis. As energias necessárias para alterar a distribuição eletrônica de moléculas são da ordem de diversos eV. Logo, os fótons absorvidos ou emitidos quando tais alterações ocorrem estão nas regiões do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (ATKINS, 2003).

Muitos sistemas químicos podem ser excitados por radiação eletromagnética e reemitir essa radiação ao mesmo tempo ou a outro comprimento de onda. Sistemas como esses são chamados fotoluminescentes, dentro dos quais se distingue os fluorescentes e os fosforescentes. (GONÇALVES, 2001)

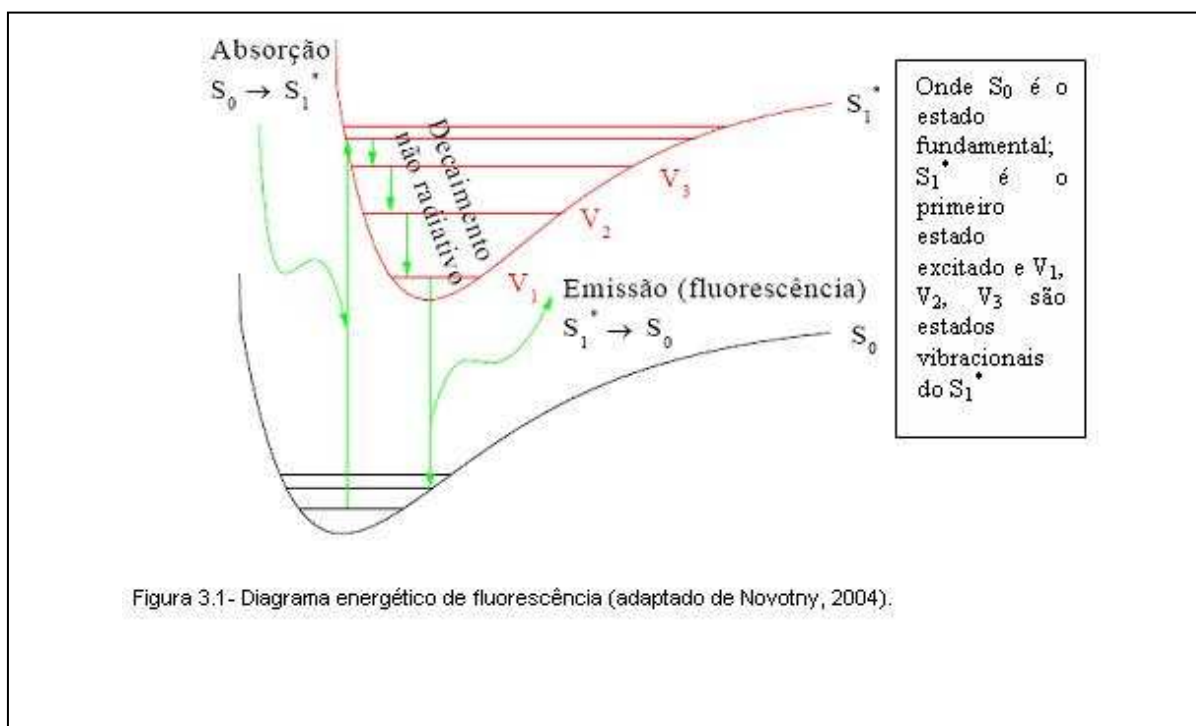
Luminescência é a propriedade que diversas substâncias possuem de emitir luz sob efeito de uma excitação que pode ser térmica (termoluminescência), mecânica (triboluminescência), química (quimioluminescência), biológica (bioluminescência), ou luminosa causada por radiação ultravioleta ou na região do visível (fotoluminescência). Esse fenômeno será dito fluorescência se for instantâneo ou fosforescência, se ocorrer num tempo muito pequeno entre a excitação e a emissão.

A fluorescência molecular consiste em processo fotoradioativo que se baseia na emissão de um fóton quando um elétron é excitado. Se esse fica emparelhado com o elétron no estado fundamental não há spin resultante e então se tem um estado singlete; se, pelo

contrário, os spins dos dois elétrons no estado fundamental e excitado são paralelos, diz-se que é um estado triplete, pois origina três níveis de energia tipicamente diferentes segundo os quais as moléculas se distribuem. (ATHINS, 2003; GONÇALVES, 2001)

Estas transições envolvem a passagem de elétrons disponíveis dos orbitais n ou π para π^* . O retorno dos elétrons ao estado fundamental envolve processo radiativo de fluorescência e fosforescência. Quando o tempo entre a excitação e a emissão da espécie excitada é maior ($\sim 10^{-6}$ - 1 s) o fenômeno é então chamado de fosforescência; no caso da fluorescência o tempo de vida média é mais curto ($\sim 10^{-8}$ s) e as transições eletrônicas se dão em torno de 10^{-5} s.

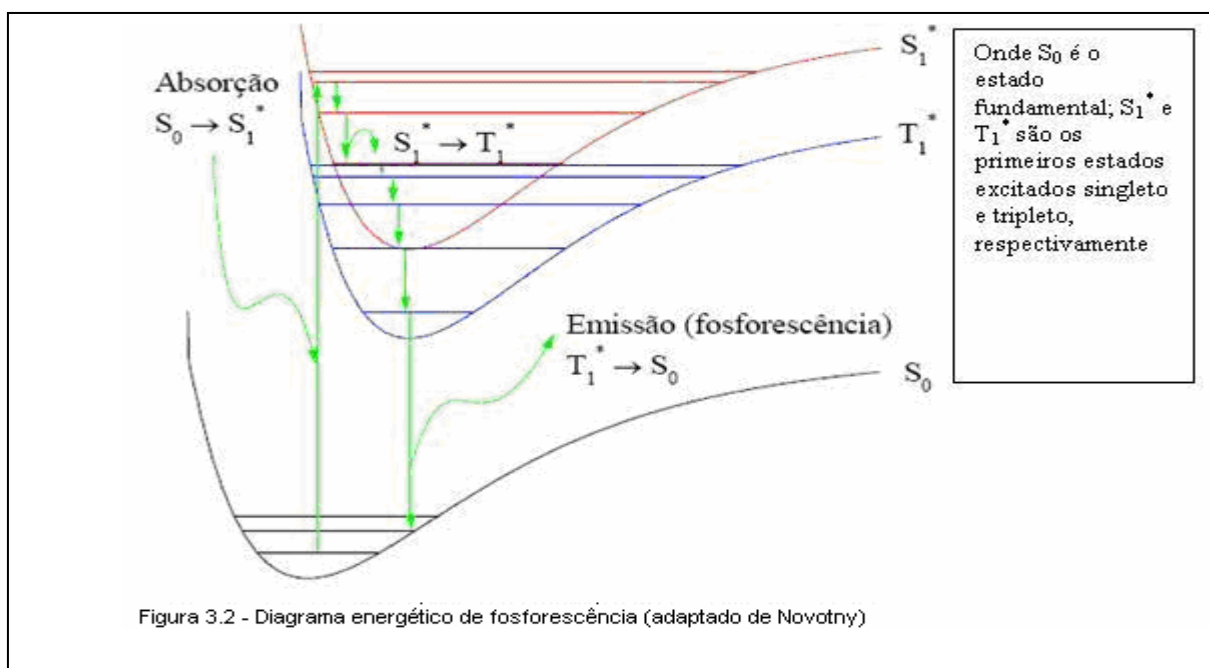
A Figura 3.1 mostra a seqüência de passos envolvidos na fluorescência. A absorção de radiação eletromagnética no UV ou visível induz uma transição eletrônica do estado fundamental, S_0 , até o primeiro estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1^*$). A molécula excitada é, então, sujeita a colisão com as demais moléculas vizinhas, fazendo com que parte da energia absorvida seja dissipada não radiativamente. Com isto o elétron excitado desce os níveis vibracionais ($\rightarrow V_3 \rightarrow V_2 \rightarrow \dots$) até o nível vibracional de menor energia (V_1) do estado molecular eletronicamente excitado (S_1^*). Nesta condição, as moléculas das redondezas não são capazes de aceitar a maior parte de energia necessária para levar a molécula até o estado fundamental; assim a molécula emite esta energia espontaneamente, na forma de fluorescência, para retornar ao seu estado fundamental (ATKINS, 2003).



A fluorescência ocorre tanto em sistemas químicos simples como complexos, sejam esses sólidos, líquidos ou gases. Quando a radiação absorvida é reemitida sem alteração de frequência, é chamada de fluorescência ressonante. No entanto, as bandas de fluorescência molecular encontram-se mais frequentemente centradas em comprimentos de onda maiores (energia menores) que o da linha de ressonância (SKOOG, 2002).

No fenômeno da fosforescência, os primeiros passos são os mesmos da fluorescência (Figura 3.2), diferindo apenas pela presença de um estado excitado tripleto.

As figuras 3.1 e 3.2 mostram o esquema das diferentes formas de decaimento para elétrons excitados. Duas dessas transições, a fluorescência e a fosforescência, são radiativas porque envolvem a liberação de fótons. Entretanto, outras formas de transição não radiativas podem ocorrer.



Os processos não radiativos para que a molécula volte ao seu estado fundamental são: a conversão interna, a conversão externa e o cruzamento intersistemas.

Esses processos que podem competir com as transições radiativas ou mesmo complementá-las são mostrados a seguir.

3.2 CONVERSÃO INTERNA

Uma molécula pode ser excitada a qualquer um dos níveis vibracionais mais energéticos durante um processo de excitação eletrônica. Porém, em solução este “excesso” de energia vibracional rapidamente é perdido para o meio, resultando em um pequeno acréscimo na temperatura desse e levando o elétron ao mais baixo nível vibracional do estado excitado. O processo vibracional é tão eficiente que o tempo de vida médio de uma molécula excitada é da ordem de 10^{-12} s ou menos. Desta forma, a banda de fluorescência associada a esta transição eletrônica, quando existe, ocorre a energias menores que da excitação inicial.

A conversão interna resulta em um mecanismo não radiativo para a relaxação do estado excitado. Esses processos não são bem compreendidos, mas são altamente eficientes, pois poucos compostos exibem fluorescência.

A conversão interna parece dar-se com maior probabilidade quando dois níveis de energia eletrônica estão suficientemente juntos de modo a dar-se a sobreposição dos níveis vibracionais. Assim, dão-se transições não radiantes entre dois estados singletes, ou dois tripletes, por relaxação vibracional. A conversão interna pode resultar no fenômeno da pré-dissociação, que deve diferenciar-se da dissociação, porque nesta a radiação absorvida excita o elétron de um grupo cromóforo diretamente para um nível vibracional suficientemente elevado, de modo a quebrar a ligação do grupo. Este processo de dissociação também compete com o de fluorescência.

A desativação de um estado eletrônico excitado envolve frequentemente interação e transferência de energia entre as moléculas excitadas e as do solvente, ou outros solutos, por colisões ou ações a longa distância, processo a que se chama de *Conversão externa* ou *supressão* (ou *extinção*) por colisão (em inglês, *collisional quenching*) e que explica o efeito do solvente na intensidade da fluorescência. Deste modo, as condições que provocam uma diminuição do número de colisões, ou outros efeitos bimoleculares, entre as partículas, como um abaixamento da temperatura e um aumento da viscosidade, aumentam em geral a fluorescência.

3.4 CRUZAMENTO INTERSISTEMA

É o processo no qual o elétron tem seu spin invertido, permitindo a sua migração para um estado tripleto. Como acontece com a conversão interna, a probabilidade deste tipo de transição aumenta se os níveis vibracionais dos dois estados se sobrepuserem (GONÇALVES,

2001). Este processo é mais comum em moléculas que contêm átomos de alto peso molecular (*efeito do átomo pesado*). As interações spin/órbita ficam mais fortes na presença destes átomos favorecendo, dessa forma, a mudança do spin. A presença na solução de espécies paramagnéticas, tais como oxigênio molecular, diminui a fluorescência, pois também promove o cruzamento intersistema.

Estes mecanismos limitam a fotoluminescência a um número relativamente pequeno de sistemas. A rota mais favorável para o decaimento é aquela que minimiza o tempo de vida dos estados excitados. Assim, o decaimento por fluorescência será observado se o sistema apresentar características estruturais e ambientais as quais permitam que esse decaimento seja rápido o suficiente em relação aos processos não radiativos.

A fluorescência dificilmente ocorre para excitações com radiação ultravioleta de comprimentos de onda menores que 250 nm, pois tal radiação é constituída por fótons com energia suficiente para causar a desativação da molécula por dissociação ou pré-dissociação (Skoog, 2000). No caso da pré-dissociação, o elétron é levado para um estado energético de menor energia a partir de um estado de energia maior, porém num estado de vibração superior. Esta energia vibracional é elevada o bastante para provocar o rompimento da ligação seguida por conversão interna de energia eletrônica para energia vibracional (GONÇALVES, 2001).

Posteriormente, por cruzamento intersistema, o elétron passa para um nível eletrônico baixo, porém em um nível vibracional mais energético. (SKOOG, 2000).

3.5 FATORES QUE INTERFEREM NA FLUORESCÊNCIA

Muitos são os fatores capazes de afetar a fluorescência da molécula, reduzindo sua energia no estado excitado e a intensidade fluorescente.

A intensidade da fluorescência diminui com o aumento do tamanho molecular (LEVESQUE, 1972; HALL; LEE, 1974; SENESI, 1990; SPARK; SWIFT, 1994; ALBERTS et al., 2000). Ewald et al., (1988) observaram que no espectro de emissão de fluorescência em frações de ácidos fúlvicos, com peso molecular distintos, provenientes da atividade microbiana, ocorria um deslocamento do pico de emissão para o vermelho, ou seja, deslocamento para comprimentos de onda maiores, com o aumento do tamanho das moléculas.

Átomos de elevado número atômico ligados à estrutura fluorescente também são capazes de diminuir a eficiência da fluorescência, pois podem causar perturbação no spin eletrônico aumentando a taxa de cruzamento entre sistemas. É o que ocorre com as substâncias húmicas quando há substituição por halogênios e coordenação de íons de elevado número atômico, especialmente quando o íon é paramagnético (PIANA E ZAHIR, 2000).

A interação com outros solutos, como o oxigênio molecular dissolvido (extinção estática), ou com íons metálicos (extinção dinâmica), que são de mais alto estado excitado, também diminuem a intensidade da fluorescência. Os íons metálicos podem reduzir a fluorescência de ligantes orgânicos, devido ao aumento na proporção de processos não radioativos que competem com a fluorescência. Metais paramagnéticos de transição, como o Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , e Cr^{3+} , entre outros, têm o nível *d* de energia menor que o estado excitado “singlete”, podendo reduzir a fluorescência dos ligantes das substâncias húmicas por transferência de energia intramolecular (SENESE et al., 1991). Um aumento da intensidade de fluorescência pode ser observado quando há um aumento da rigidez estrutural, pois esta tem o efeito de reduzir o grau de interação da molécula fluorescente com seu meio ocorrendo, com isto, uma diminuição da taxa de conversão interna (SENESE, 1990).

A fluorescência de um composto aromático com substituintes básicos ou ácidos no anel benzênico também depende do pH. O comprimento de onda e a intensidade de emissão

possivelmente serão diferentes para as formas ionizadas e não ionizadas do composto. As mudanças na emissão de compostos destes tipos surgem do número diferente de espécies ressonantes associadas às formas básica e ácida das moléculas. Estas observações sugerem que procedimentos analíticos baseados na fluorescência requerem controle de pH. (SKOOG, 2002). As propriedades fluorescentes das SH variam marcadamente com o pH de acordo com sua natureza e origem (SENESI, 1992). Como a fluorescência depende do grau de conjugação da molécula e a ocorrência de ligações de hidrogênio intramolecular pode aumentar ou diminuir a conjugação de grupos vizinhos, a intensidade da fluorescência pode variar pela ocorrência deste tipo de ligação em função de variações da concentração de eletrólitos e do pH do meio (SPARK et al, 1994).

A extensão de sistemas eletrônicos π , o nível de substituição heteroatômica e o tipo e número de grupos substituintes dos anéis aromáticos afetam a intensidade e o comprimento de onda da emissão fluorescente das substâncias húmicas. Assim, o comportamento da fluorescência de uma molécula é o resultado de um efeito cumulativo e muitas vezes interdependente de diferentes aspectos estruturais da molécula, sendo o espectro de fluorescência provavelmente a soma de diversos espectros de fluoróforos presentes nas moléculas de substâncias húmicas (SENESI et al., 1990).

A heterogeneidade das substâncias húmicas fornece, portanto, espectros de fluorescência que podem ser utilizados para se distinguirem aspectos baseados na sua natureza, origem e gênese (SENESI et al., 1991). Alguns autores se referem a técnica de fluorescência para as SHs como sendo promissora (MIANO et al., 1988; SENESI; LOFFREDO, 1996; ZSOLNAY et al, 1999; KALBITZ et al., 2000), visto ser uma técnica sensível, não invasiva, requer um preparo mínimo e uma pequena quantidade de amostra, podendo a análise ser feita em curto espaço de tempo. Porém, a pequena quantidade de estruturas fluorescentes presentes nas substâncias húmicas, que dificultam a observação da

fluorescência é uma das limitações desta técnica, além do fato da fluorescência observada não representar a total fluorescência da molécula, devido à dificuldade de se varrer o espectro em todos os comprimentos de onda.

3.6 MODOS DE OBTENÇÃO DO ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA

O espectro de fluorescência pode ser obtido em três modos: de emissão, excitação e excitação sincronizada em amostras de ácido húmico e ácido fúlvico dissolvidos em água a uma concentração e pH apropriado. O espectro de emissão de fluorescência é obtido, em geral, definindo-se um comprimento de onda específico para excitação dos componentes da amostra. Esta radiação incidente é definida como aquela em que a amostra absorve com maior intensidade em seu espectro de absorção. Mantendo-se fixo este comprimento de onda de excitação, são registrados os comprimentos de onda e as intensidades das emissões provenientes da relaxação dos componentes da amostra. O espectro de excitação é registrado medindo-se a intensidade da emissão em um comprimento de onda fixo, embora variando o comprimento de onda da excitação. Os espectros de excitação de varredura sincrônica são obtidos por medida da intensidade da fluorescência, enquanto que simultaneamente faz varredura sobre ambos: a excitação e emissão num comprimento de onda e mantendo uma constante, otimizada pela diferença do comprimento de onda, $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$, entre elas. (SENESI, 1992).

Na figura 3.3 estão representados os espectros obtidos para uma mesma amostra de ácido húmico e ácido fúlvico, sendo o λ_{exc} de 360 nm para o espectro de emissão, de 270-500 nm a leitura do espectro de excitação, com o λ_{em} fixa a 520 nm e o espectro de excitação – sincronizado de 290-550 nm, sendo o $\Delta\lambda$ de 18 nm (SENESI et al, 1991).

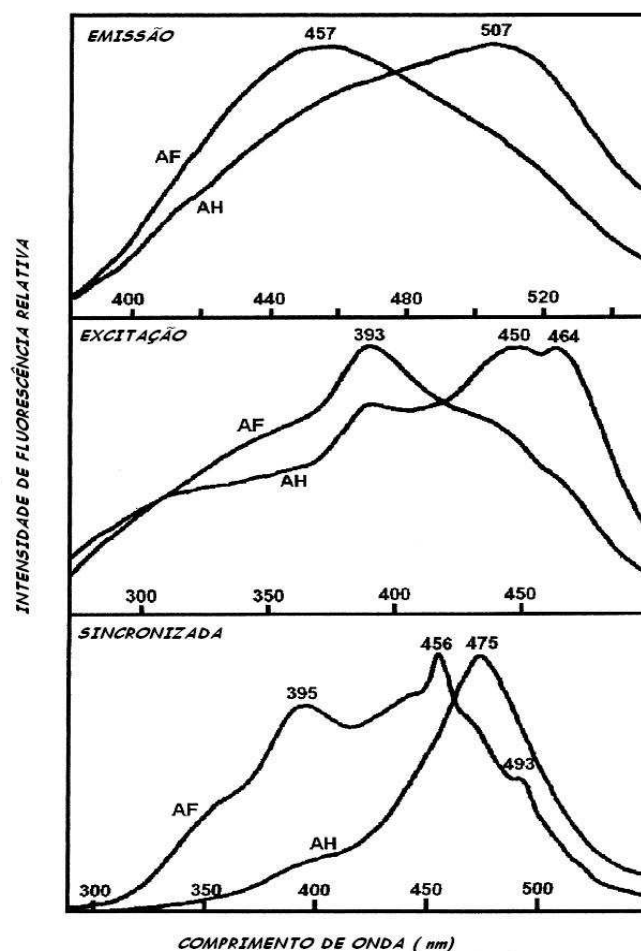


Figura 3.3 - Espectro de fluorescência de emissão, excitação e sincronizada-excitação de um ácido húmico (AH) e um ácido fúlvico (AF) de um mesmo solo (Senesi et al., 1991).

O uso da espectroscopia de fluorescência para o estudo das substâncias húmicas tem sido de grande utilidade para indicar seu grau de humificação (SENESI, 1992, MILORI et al., 2002; ROSA et al., 2004) e tem dado importantes resultados na avaliação da qualidade do solo, pois fornece informações que podem ser usadas para diferenciar e classificar a matéria orgânica natural de acordo com a sua origem, gênese e natureza e também para identificar estruturas moleculares e funcionalidades, sendo sensível à presença de metais pesados e contaminantes orgânicos.

Esta técnica é muito sensível devido à capacidade de se detectar o sinal proveniente de moléculas quando excitadas por um comprimento de onda específico. É também bastante

seletiva, uma vez que os comprimentos de onda de excitação e emissão dependem do mesmo composto de interesse, fazendo com que o sinal de fluorescência detectado seja característico de cada molécula em estudo.

O uso da técnica de fluorescência nos estudos sobre substâncias húmicas está apoiado na presença estável de várias estruturas fluorescentes intrínsecas à molécula húmica e também aos seus precursores, particularmente anéis aromáticos, fenóis e grupos quinona (SENESI et al, 1991). Essa é uma das poucas técnicas que investiga as substâncias húmicas em concentrações e condições naturais, fornecendo assim, informações estruturais das moléculas que as compõem.

3.7 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

As técnicas anteriormente citadas exigem a extração e fracionamento químico das substâncias húmicas do solo, resultando na geração de resíduos químicos e tornando a análise de solos um processo lento e trabalhoso. Além disso, os produtos deste tratamento (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) podem apresentar modificações em relação a sua forma *in situ* (FELLER; BEARE, 1997).

Em trabalho recente, Milori et al (2006) mostraram que usando a técnica de fluorescência chamada de (FIL) fluorescência induzida por laser é possível quantificar a humificação do solo inteiro (solo sem qualquer tratamento físico ou químico). Segundo os autores, isto é possível devido ao fato de que os sinais de fluorescência são emitidos em sistemas rígidos conjugados em estruturas ou moléculas individuais, como anéis aromáticos e quinonas. Sendo assim, quando a substância muda de estado (sólido, líquido, vapor) ou é dissolvido, o sinal de fluorescência da substância ainda persistirá.

As principais vantagens desta técnica são alta sensibilidade e seletividade, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados, sendo que a intensidade da fluorescência aumenta com o decréscimo do tamanho molecular e o incremento de grupos C=O, COOH e C aromáticos. A simplicidade e rapidez são também vantagens com uso desta técnica. A fluorescência não tem o mesmo impedimento analítico como o EPR e RNM em relação ao Fe^{3+} podendo, por isso, ser usada para determinar o grau de humificação em latossolos sem a necessidade da extração de ácidos húmicos. Porém, a maioria dos trabalhos existentes usa esta técnica em substâncias húmicas (MILORI et al., 2002).

Nas substâncias húmicas, os principais fluoróforos presentes, grupos capazes de absorver e emitir energia, na forma de luz, são sistemas com alto grau de conjugação, como, por exemplo, anéis aromáticos e grupos do tipo quinona.

Riffaldi e Schnitzer (1972) afirmaram que os radicais semiquinonas são formados a partir da remoção de hidrogênio (H) dos grupos OH dos fenóis. Assim, quanto maior a concentração de fenóis no material de origem, maior a concentração de spins nos ácidos húmicos formados a partir deles. Martin Neto et al. (1994a), utilizando a técnica de EPR, encontraram altas concentrações de radicais semiquinonas ao correlacionar com menores valores de razão C/N da fração orgânica avaliada associando, dessa forma, estas características ao maior grau de humificação do ácido húmico.

Com base nestes fatos é possível propor a fluorescência como parâmetro para se estudar os processos de humificação. Sua utilização é mais relevante nos solos (como, por exemplo, Latossolos Vermelho eutroférico) em que os conteúdos de ferro inviabilizam os estudos dos parâmetros da humificação por técnicas de Ressonância Magnética.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

4.1.1 Localização e características do solo

As amostras de solo foram coletadas em 23/03/2005, na Estação Experimental do Pólo Regional de Pesquisa do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), em Ponta Grossa-Paraná-Brasil (Figura 4.1). As coordenadas geográficas da área do ensaio são: latitude 25°13'S, longitude 50°01'W e altitude de 875 m.



Figura 4.1 – vista geral das três macro-parcelas (área de ensaio)

O clima da área, segundo a classificação de Köppen é o Cfb – subtropical úmido mesotérmico com verões frescos, sem estação seca e com geadas severas. A temperatura média do mês mais frio é menor que 18°C e a do mês mais quente maior que 22°C.

A precipitação total anual situa-se entre 1300 mm a 1800 mm, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano. A vegetação é constituída por campo subtropical de altitude (EMBRAPA, 1992/93). Os tratamentos foram distribuídos em três parcelas, onde duas apresentam a dimensão de 100 x 50m com uma área de 5000m² e rampas de 50m. Uma terceira parcela possui uma área superficial de 100x100m com uma área de 10000m².

As coletas foram realizadas com auxílio de um trado tipo Holandês, no qual existem graduações de várias profundidades. Neste caso, foram utilizadas as marcações de profundidade 0-20 cm, 20-40 cm e 40-60 cm. Utilizou-se em torno de 10 coletas por área, as quais compuseram uma amostra para uso das análises.

Os tratamentos das parcelas 1, 2 e 3 foram compostos por uma sucessão de diversas culturas em três sistemas de manejo descritos a seguir, conforme relatório de experimento do IAPAR.

SISTEMA 1 – Preparo Convencional

Preparo do solo com uso de arado de disco, hidráulico e reversível, da marca LAVRALE, seguido de duas gradagens leves, com grade hidráulica de 24 discos (Figura 4.2), feitas com a finalidade de criar condições favoráveis para o estabelecimento da cultura. A rotação de cultura (rotação 1) entre os anos de 1981-1990 foi de trigo e soja, entre 1990 1995 cultivaram-se aveia preta/soja/aveia preta/milho/trigo/soja/aveia preta/soja/tremoço/ milho, entre 1995-2000 cultivaram-se aveia preta/soja/trigo/soja/aveia + ervilhaca/milho/aveia preta/soja/trigo/milho e entre 2000-2005, cultivaram-se aveia +ervilhaca/milho/aveia/soja/aveia/soja/aveia + ervilhaca/milho/aveia/soja/aveia + ervilhaca..



Figura 4.2 - Solo cultivado sob sistema plantio convencional – IAPAR - PG

SISTEMA 2 – Preparo Mínimo

Este sistema de cultivo (Figura 4.3) refere-se à quantidade de preparo do solo para criar condições necessárias a uma boa emergência e estabelecimento da planta.



Figura 4.3 - Solo cultivado sob sistema preparo mínimo - IAPAR - PG

O preparo do solo foi feito com uso da grade aradora ROME, seguida de duas gradagens leves (Figura 4.3). A rotação de cultura foi a mesma adotada no sistema 1.

SISTEMA 3 – Plantio Direto

Neste sistema (Figura 4.4) entre os anos de 1981-1988 utilizou-se uma alternância de preparo com uso da aração e gradagem e plantio direto em três ocasiões. A partir de 1989 esta parcela passou a ser cultivada sempre em plantio direto. A rotação de culturas adotada entre 1981-1990 era de milho/aveia/soja/trigo/soja/tremoço/milho/aveia/soja/trigo/soja/tremoço/milho/aveia/soja/trigo e soja.



Figura 4.4 – Solo cultivado sob sistema plantio direto – IAPAR - PG

Assim como nos sistemas 1 e 2, a partir de 1990 passou-se a adotar a rotação de culturas de aveia preta/soja/aveia preta/milho/soja/aveia preta/soja/tremoço/milho e entre 1995-2005, a rotação de cultura foi a mesma adotada no sistema 1. Os preparos do solo e plantio foram realizados sempre em nível e a colheita realizada com colhedora automotriz.

Este sistema de plantio não envolve preparo do solo, a não ser na faixa e profundidade onde a semente será plantada.

4.2 SOLO

O solo a ser utilizado no experimento (Figura 4.5) classifica-se, conforme o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos Embrapa (1999), como um Latossolo Vermelho Distrófico (LVd), com uma declividade média de 8%, submetido a 26 anos de plantio de várias culturas diferentes.

Latossolos são solos muito profundos (com mais de 2,0m de profundidade), de cor vermelha, alaranjada ou amarela, muito porosos, com textura variável. Possuem baixa capacidade de troca de cátions e teores de óxidos de ferro e alumínio elevados.



Figura 4.5 - Solo Analisado: Perfil do solo classificado como Latossolo Vermelho distrófico.

4. 2.1. Procedimento de abertura das amostras de solo

As amostras de solo em duplicatas foram colocadas para secar naturalmente e, após, moídas em peneira de 1 mm para que a fração cascalho e as impurezas maiores fossem retiradas. Essas amostras foram numeradas e novamente deixadas para secar naturalmente à temperatura ambiente. A tabela 4.1 mostra os sistemas de cultivo e a profundidade para as amostras de solo.

Tabela 4.1. Sistemas de manejo e profundidades do solo Latossolo

Amostra	Sistemas de manejo	Profundidade (cm)
1	Convencional	0-20
2	Convencional	20-40
3	Convencional	40-60
4	Mínimo	0-20
5	Mínimo	20-40
6	Mínimo	40-60
7	Direto	0-20
8	Direto	20-40
9	Direto	40-60

4.2.2 Procedimento para fracionamento por granulometria das amostras de solo.

As amostras de solo inteiro foram moídas para desmanchar os torrões que ainda pudessem existir e então peneiradas para separar as impurezas, utilizando-se para isso peneira de 1 mm. Então foi preparado 1L de solução de NaOH 1 mol/L, colocando-se 40 g de NaOH para 1L de solução, etiquetou-se e reservou-se em frasco âmbar.

Em placas de petri, colocou-se cada amostra de solo, em duplicata, sendo todas as amostras numeradas e etiquetadas. Essas amostras foram levadas à estufa numa temperatura de 60°C, para garantir o mínimo de umidade às mesmas.

As amostras permaneceram em estufa e, após, em dessecadores, para que não absorvessem umidade, por aproximadamente 48 horas sendo, então, submetidas ao procedimento de desagregação de partículas para o fracionamento físico, descrito a seguir:

Mediu-se aproximadamente 20g de cada amostra das placas de petri em balança eletrônica diretamente em erlenmayers ou em béqueres de 250 mL. A amostra medida foi colocada num recipiente contendo 200mL de água destilada, então foi adicionado 10 mL de NaOH – 1mol/L, para minimizar a floculação das amostras durante a sedimentação, agitou-se essa suspensão manualmente e cobriu-se cada amostra com filme plástico. Essas suspensões ficaram em repouso por aproximadamente 24 horas. Depois, as amostras ainda fechadas com filme plástico, foram levadas a uma lavadora ultra-sônica (Lavadora Ultra-Sônica Computadorizada USC 750 – Ultra Sonic Cleaner) para desagregação das partículas, por 20 minutos. Após esse tempo, cada amostra em suspensão foi derramada sobre uma peneira de 53 mm/μm (270 mesh) e lavada com água destilada a fim de que se separasse a fração areia grossa das demais frações.

Procurou-se tomar cuidado para que o volume de água destilada usada na lavagem da areia grossa não fosse muito superior a um litro (o ideal seria 1L). Nos casos em que o volume de água utilizado foi superior a 1L, reservou-se o excedente no recipiente onde já estava a amostra em suspensão (erlenmayer, béquer e, em alguns casos houve a necessidade de se utilizar mais recipientes para reserva de material – cada novo recipiente a ser utilizado foi lavado apenas com água destilada).

Os recipientes contendo os excedentes das lavagens foram fechados com filme plástico e reservados, para depois serem utilizados, completando o volume do tubo onde as frações seguiram para as próximas etapas do fracionamento físico.

A fração areia grossa que permaneceu na peneira foi lavada com água destilada para retirar a fração argila e, depois, com a água destilada fez-se seu arraste para uma placa de petri

para posterior secagem. As demais frações que passaram pela peneira (lembrando que a lavagem com água destilada da amostra na peneira parou quando a água que por ela passava estava o mais clara possível, para garantir a passagem da maior parte de fração argila), foram colocadas em tubos de PVC, por 24 horas. Prosseguiu-se o peneiramento para separação da fração areia grossa com as outras amostras.

A temperatura foi medida para posteriormente ser verificado por quanto tempo deveriam as amostras permanecer em descanso e depois serem coletadas (Lei de Stokes).

$$t = \frac{18\eta h}{g(d_p - d_l)D^2}$$

η : Viscosidade da água
 h : Altura do cilindro
 g : gravidade
 d_p : densidade de partículas
 d_l : densidade da água
 D : diâmetro da partícula

Onde:

$$h = 5 \text{ cm}$$

$$d_p = 2,53 \text{ g/cm}^3$$

$$D \leq 2,0 \text{ } \mu\text{m} = 2.10^{-6} \text{ m} = 2.10^{-4} \text{ cm (fração argila)}$$

$$d_l = 1 \text{ g/cm}^3$$

$$\eta = \text{coeficiente de viscosidade (tabelado)}$$

$$g = 980 \text{ cm/s}^2$$

A primeira agitação das amostras foi realizada nos tubos por um minuto com uma haste de metal, de base em forma de disco com perfurações. Essa haste de metal foi substituída por outras de PVC, as quais eram lavadas com água destilada a cada término de agitação para evitar contaminações das outras amostras.

Após esse procedimento as amostras permaneceram em repouso por um tempo determinado de acordo com a temperatura medida inicialmente.

Completo-se o volume dos tubos com água destilada, quando toda a fração argila foi coletada.

Para cada coleta da fração argila mediu-se a temperatura em água destilada (valendo as amostras dentro dos tubos) no início e no final da coleta, a fim de se verificar se a temperatura variava. Em cada coleta, as amostras foram reservadas em potes de plástico com capacidade de aproximadamente 670 mL. Realizou-se ao todo 53 coletas, sendo necessárias para completar o volume do pote três coletas, então:

$$3 \text{ coletas} - 670 \text{ mL}$$

$$53 \text{ coletas} - x \text{ mL}$$

$$x = 11836,67 \cong 11837 \text{ mL} = 11,837 \text{ L}$$

Após a coleta da fração argila, preparou-se 1L de solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 1 mol/L. Para preparar essa solução mediu-se em balança aproximadamente 110,9 g de CaCl_2 anidro ($\text{MM} = 110,99 \text{ g/mol}$) e dissolveu-se essa massa em 1L de água destilada. A solução foi reservada e etiquetada.

Nas amostras coletadas anteriormente, as quais estavam reservadas em potes de plástico e em repouso para decantação da fração argila, adicionou-se 7 mL da solução de CaCl_2 1 mol/L para floculação do material. A utilização de 7 mL e não 10 mL foi devido ao volume de amostra que cada pote comporta ($\sim 670 \text{ mL}$), assim para cada L seriam 10 mL:1000 mL de amostra = 10 mL de solução de CaCl_2 1mol/L

$$670 \text{ mL de amostra} = x \text{ mL de solução de CaCl}$$

$$x = 6,7 \text{ mL} \cong \mathbf{7,0 \text{ mL}}$$

Realizado esse procedimento, todas as amostras foram novamente levadas a repouso. Observou-se a floculação da fração argila, em poucos segundos após a adição dos 7 mL de solução de CaCl_2 1 mol/L e, após aproximadamente duas semanas de decantação fez-se a sifonação dessa fração, deixando-se então secar naturalmente.

Na separação da fração silte (2-20 μm), repetiu-se o procedimento de sedimentação de modo que, ao final, a suspensão retirada estivesse transparente, indicando que praticamente

todo o solo referente àquela fração havia sido separado (BAYER; MARTIN-NETO; SAAB, 2003), sendo que a fração 20-53 μm consistiu no material remanescente após a separação da fração 2-20 μm . Essas frações foram, então, secas em estufa a 60°C, sendo realizado na seqüência suas análises.

4.3 ANÁLISE ELEMENTAR

As análises químicas elementares foram feitas utilizando o método via seca por combustão – aparelho LECO CR 412 do laboratório de Química e ICP do GMG - IGC – USP – São Paulo, SP. Em todas as análises foram utilizadas três replicatas e apresentado o valor médio das análises.

4.4 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA

4.4.1 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL) do solo intacto

As amostras de solo, após serem previamente peneiradas e secas, passaram por um processo de pastilhamento. Para isso foram pesados aproximadamente 0,5 g de cada amostra e prensadas por cerca de 2 minutos, num peso de oito toneladas, sendo que cada pastilha formada é circular com diâmetro de 12 mm e 2 mm de espessura. Estas medidas devem ser respeitadas de acordo com o tamanho do suporte utilizado para as amostras no momento da medição.

A excitação da fluorescência foi feita com um laser de argônio (Coherent – modelo Innova 90C), mostrado na Figura 4.6.

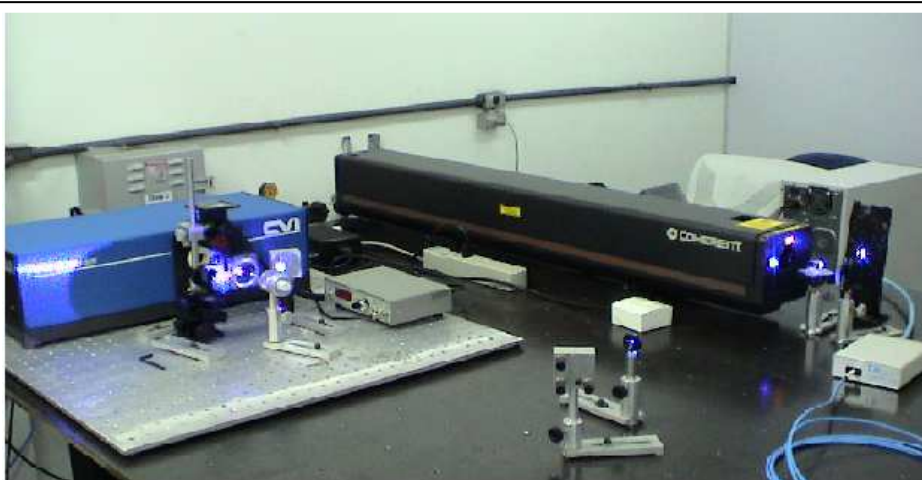
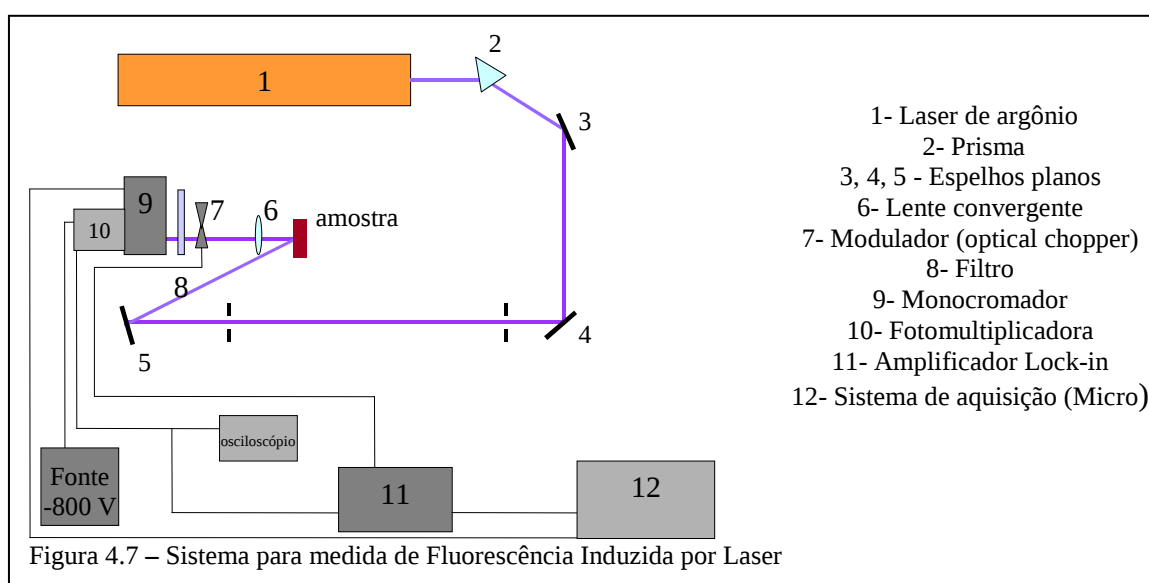


Figura 4.6 - Detalhes da montagem experimental da FIL - EMBRAPA - São Carlos

A montagem experimental do sistema de FIL está mostrada na Figura 4.7.



O sistema para medir a FIL (Figura 4.7) é constituído de um laser de argônio (1), de um prisma para separação da emissão laser de fluorescência do gás (2), de espelhos para condução da excitação até a amostra de solo (3,4 e 5), de uma lente convergente para coletar a fluorescência (6), de um modulador óptico (optical chopper) (7), de um filtro para suprimir a

excitação no sistema de detecção (8), de um monocromador (CVI, L=25 cm) (9), de uma fotomultiplicadora (10), de um amplificador lock-in (11) e de um microcomputador dotado de placa de aquisição e software de controle e aquisição de dados (12). Foram obtidos espectros para cada amostra, e a média da área desses espectros foi utilizada para calcular o grau de humificação.

Foram feitas análises de nove amostras de solo inteiro submetidos a diferentes sistemas de manejo (PD, PM e PC) e diferentes profundidades (0-20 cm, 20-40 cm e 40-60 cm). Após a obtenção dos dados, foi calculado o grau de humificação das amostras de solo inteiro, denominada H_{FIL} .

4.4.2 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser das Frações do solo

A matéria orgânica foi determinada utilizando-se as seguintes frações da superfície (0-20 cm) do solo:

- Frações argila, silte, areia grossa e areia fina, obtidas por fracionamento físico;
- Frações argila, silte, areia grossa e areia fina submetidas a lavagem com H_2O_2 (foram onze lavagens à temperatura ambiente (25°C) e três lavagens a 55°C), sendo que nos dois tratamentos aos quais o solo foi submetido utilizou-se amostras dos três sistemas de preparo do solo;
- Frações argila, silte, areia grossa e areia fina, do sistema plantio direto, submetidas à temperatura de 700°C.

O fato de ter-se utilizado amostras deste sistema de preparo do solo foi somente para comprovar que a fluorescência das amostras são originadas da matéria orgânica.

O procedimento para se fazer o pastilhamento e posterior medida de FIL foi o mesmo realizado para o solo inteiro, o qual foi anteriormente descrito.

Utilizaram-se, para a realização das medidas de fluorescência, os seguintes parâmetros no equipamento: tensão na Fotomultiplicadora = 800 volts, Lock-in = 50 milivolts, Laser = 458 nm e 300 miliwatts, e Varredura = 480 a 650 nm (MILORI et al., 2006).

A interpretação do efeito dos sistemas de preparo de solo na humificação (H_{FIL}) do solo inteiro e das frações granulométricas do solo foi realizada com base no respectivo desvio padrão da média, calculado a partir dos resultados da análise por FIL em duplicata ($n=2$). Cada pastilha de solo intacto possui duas faces ideais para essas medidas sendo que, para cada pastilha, foram obtidos dois espectros de FIL. Havendo duas pastilhas por amostra, foi obtido um total de quatro medidas (espectros) de FIL para cada amostra.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são mostrados os resultados obtidos através de análises de CHN e FIL realizadas com amostras de solo intacto e suas frações físicas, por tamanho de partículas, bem como a discussão desses resultados.

5.1 RESULTADOS DA ANÁLISE DE CARBONO (C), HIDROGÊNIO (H), NITROGÊNIO (N) E RELAÇÃO C/N.

Na tabela 5.1 são mostrados os valores de CHN e a relação C/N das amostras de solo em seus sistemas de manejo e profundidades.

Tabela 5.1 - Teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e razão elementar C/N das camadas de solo analisadas.

Sistemas de manejo e profundidade do solo (cm)	C _{total} (g/kg ⁻¹)	H _{total} (g/kg ⁻¹)	N _{total} (g/kg ⁻¹)	C/N
PC (0-20)	32,6	20,5	2,1	18,11
PC (20-40)	32,2	20,9	2,0	18,78
PC (40-60)	26,9	21,2	1,7	15,82
PM (0-20)	37,9	21,9	2,4	18,42
PM (20-40)	33,9	21,9	2,0	19,77
PM (40-60)	28,2	21,8	1,7	16,59
PD (0-20)	39,6	22,2	2,4	19,17
PD (20-40)	33,7	21,8	1,8	21,72
PD (40-60)	27,1	21,9	1,7	15,94

5.1.1. Resultado do carbono total

De acordo com os valores obtidos, observou-se que, em área sob PD, os valores da concentração de carbono total foram maiores na camada superficial (0-20 cm), com relação

aos outros sistemas de manejo do solo. Isto pode ter ocorrido pelo fato da atividade microbiana se concentrar nesta camada, devido ao aporte de matéria orgânica fresca principalmente no plantio direto, ocorrendo maior continuidade no processo de degradação do material orgânico e sua estabilização no solo, o que é dificultado nas camadas mais profundas.

Esse sistema de cultivo e outras técnicas de preparo mínimo constituem hoje uma tendência geral para todas as áreas agrícolas, agropecuárias e agroflorestais, pois representam uma substancial redução de custos e uma alternativa benéfica em termos de preservação e recuperação de ambientes, (LAL, 1976; CAMPOS et al., 1997, CARPENEDO; MIELNICZUK, 1990; CORAZZA et al., 1999). Isso pode ser observado através dos valores obtidos no PM, onde os valores de carbono total foram maiores que o PC na camada de 0-20 cm e maiores que o PD e PC nas camadas de 20-40 cm e 40-60 cm.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Bayer et al. (2000a), ao analisarem solos no PM e PC. Esses pesquisadores verificaram que o cultivo mínimo confere melhorias na fertilidade do solo e no seqüestro de carbono, e que os sistemas de manejo do solo podem atuar de forma variável sobre a dinâmica das suas diferentes frações húmicas. Em áreas de Latossolos Vermelhos sob PC na região de Passo Fundo – RS por longo período de tempo (9 anos), Freixo et al. (2002) também observaram uma redução de 47% do carbono na profundidade de 0-5 cm.

Resck et al. (2000), estudando sistemas de manejo do solo e balanços de carbono no cerrado verificaram que os sistemas de manejo afetam o carbono orgânico do solo diferentemente, não somente pelo modo como cada sistema de preparo atua no solo, mas também pela época do ano em que os restos culturais são incorporados ao solo. Estes autores, ao caracterizarem química e fisicamente parcelas com diferentes sistemas de manejo aplicados a um Latossolo Vermelho Escuro argiloso durante 15 anos, observaram que, em um perfil do solo de 40 cm, o sistema plantio direto acumulou mais carbono orgânico durante

estes anos do que áreas preparadas com pastagem ou com arado de discos, sendo que as maiores diferenças ficaram nos primeiros 10 cm de solo.

Os resultados obtidos (Figura 5.1) mostram também que os menores teores de carbono total foram observados no preparo convencional, em todas as camadas, indicando que a transformação da matéria orgânica ocorre de maneira mais rápida. Tal fato sugere que estas áreas são mais suscetíveis à degradação do solo, quando comparadas às dos outros sistemas de manejo do solo.

A redução do conteúdo de carbono no solo não se deve unicamente à diminuição da quantidade de resíduos adicionados, mas também ao aumento da atividade microbiana, causada por melhores condições de aeração, temperatura mais elevada e alternância mais freqüente de umedecimento e secagem do solo (STEVENSON, 1982).

O uso contínuo de implementos e as perdas causadas pela erosão que é favorecida no sistema de manejo convencional, também contribuem para a redução do carbono no solo. Por outro lado, o acúmulo de resíduos culturais sobre o solo e de matéria orgânica nas camadas superficiais são contribuintes importantes para a ciclagem de nutrientes, atividade microbiana, agregação, movimento e armazenamento de água e troca de gases com a atmosfera (REICOSKY et al., 1995). Assim, sistemas de manejo conservacionistas, como plantio direto e preparo mínimo, promove aumento do teor de carbono nas camadas superficiais, o que também é complementado pela decomposição de raízes (CORAZZA et al., 1999).

Bayer e Mielniczuk (1999) mostraram que o manejo de solo convencional (aração e gradagem) promove maior taxa de decomposição da matéria orgânica e menor adição de resíduos. Isso resulta em diferenças na quantidade de carbono orgânico e nitrogênio total no solo. Também observaram que a taxa de decomposição de carbono e nitrogênio no manejo convencional é o dobro se comparada com o plantio direto. Essa diferença entre os sistemas de manejo do solo nos teores de carbono e nitrogênio, ou de matéria orgânica na camada

superficial do solo (0-5 cm) é encontrada desde os primeiros trabalhos com plantio direto (MUZILLI, 1983; SIDIRAS; PAVAN, 1985), permanecendo restrita a esta profundidade ou chegando até 10 cm, mesmo após vários anos da implantação do plantio direto (BAYER; MIELNICZUCK, 1997; BAYER et al., 2000b).

5.1.2. Resultado do nitrogênio total

A dinâmica do nitrogênio no solo é semelhante a do carbono e está intimamente relacionada com a desse elemento, sendo um importante indicador da qualidade do solo, pois está ligado com a capacidade deste em suprir a demanda das culturas, sendo o seu déficit estreitamente relacionado com o esgotamento de carbono facilmente mineralizável (GONÇALVES et al., 2001).

Neste estudo, os maiores valores de nitrogênio no solo foram observados na camada superficial (0–20 cm) e os menores, na de 40–60 cm, em todos os sistemas de manejo. Isto já era de se esperar, pois segundo Cerri (1989) a maior parte de nitrogênio total encontra-se na superfície do solo em função da decomposição de resíduos vegetais das culturas que contêm este elemento em seu tecido; esse pesquisador encontrou resultados semelhantes ao realizar estudos de solos da Bacia Amazônica. Hernández-Hernández e López-Hernández (2002) também observaram maior valor de nitrogênio total em solo sob plantio direto, comparado com o manejo convencional, principalmente na camada de 0–5 cm, e diminuição do nitrogênio total com a profundidade.

A magnitude das alterações do nitrogênio total depende da intensidade do manejo, do tipo e frequência dos implementos, da qualidade e quantidade de fertilizantes e dos resíduos orgânicos que retornam ao solo (BEARE et al., 1994). Os teores de matéria orgânica e nitrogênio total do solo são determinantes importantes do processo de mineralização de

nutrientes no solo. Quanto maior o potencial produtivo de biomassa do ecossistema, maior é o aporte de matéria orgânica do solo, conseqüentemente, maior a quantidade de nitrogênio.

5.1.3. Relação C/N

Giacomini (2003) e Nicolardot, Recous e Mary (2000) citam que a relação C/N tem sido a característica mais usada em modelos para prever a disponibilidade de nitrogênio no solo durante a decomposição de materiais orgânicos.

Avaliando a matéria orgânica de solos tropicais submetidos à adição de lodo de esgoto, em um experimento de longa duração, Santos et al. (2006) observou que o lodo de esgoto apresentou menor razão C/N em relação aos ácidos húmicos extraídos do solo, o que foi atribuído ao fato de que o lodo de esgoto apresenta maior concentração de compostos nitrogenados, quando comparado ao solo.

Através dos resultados obtidos neste estudo observou-se que em todos os sistemas de manejo houve um aumento da relação C/N na camada intermediária de 20-40 cm, em relação à camada superficial (0-20 cm), tornando a diminuir na camada de 40-60 cm. Resultados semelhantes também foram encontrados por Diekow (2003), em seus estudos sobre alterações nos estoques de carbono e nitrogênio do solo promovido por sistemas de culturas e adubação nitrogenada em plantio direto. Esse pesquisador observou que a relação C/N diminuiu a partir da superfície, onde se concentravam os resíduos da parte aérea da planta (2,5 – 7,5 cm), tendo depois um aumento abaixo dessa camada (37,5 – 47,5 cm) e tornando a diminuir até a profundidade de 107,5cm; o que foi atribuído a maior relação lignina/N e aumento do teor de argila em profundidade, associado com a maior relação dessa fração física na camada de 37,5 – 47,5 cm.

5.2. RESULTADOS DA ANÁLISE DE CARBONO TOTAL DAS FRAÇÕES DO SOLO.

Os resultados mostrados na tabela 5.2, são referentes apenas à camada superficial do solo (0-20 cm), pois os principais efeitos do manejo do solo são verificados nessa camada e indicam que na fração silte (2-20 μm) se encontra o maior conteúdo de carbono, quando comparados com as outras frações de solo. Estes resultados estão de acordo com alguns autores, os quais observaram que o conteúdo de carbono varia entre as frações físicas do solo, sendo a fração silte a que mais contribui para isso (BALESDENT; MARIOTTI, 1987; CATROUX; SCHNITZER, 1987; MONROZIER et al., 1991; RISTORI et al., 1992).

Segundo González-Pérez, (2003), Martin-Neto et al. (1994a) e Bayer et al. (2002), com a diminuição do tamanho da partícula, ocorre um aumento na capacidade do solo em armazenar carbono. Isso se explica, de acordo com Christensen (1992), pela redução observada na relação C/N das frações granulométricas, que diminui com a redução do tamanho da partícula, o que sugere um grau de humificação mais avançado para o carbono associado às partículas mais finas (areia<silte<argila) do solo.

Esse mesmo pesquisador afirma que o carbono-argila é uma das frações mais estabilizadas da matéria orgânica do solo, o que se deve ao fato dessa fração ser constituída de um material mais recalcitrante e, também, pela maior estabilidade química e física conferida ao carbono em associação com a fase mineral do solo (CHRISTENSEN, 1992, 1996).

Tabela 5.2 - Valores de C_{total} das frações do solo, em diferentes sistemas de manejo e profundidade de 0-20cm.

Sistemas de manejo do solo	Frações	C_{total} (g/kg^{-1})
Preparo mínimo	Argila	30,4
	Silte	32,0
	Areia grossa	20,8
	Areia fina	15,8
Plantio direto	Argila	30,3
	Silte	31,8
	Areia grossa	16,6
	Areia fina	15,5
Preparo convencional	Argila	24,8
	Silte	29,9
	Areia grossa	15,7
	Areia fina	12,6

Compostos orgânicos associados com a fração silte são mais estáveis, menos biodegradáveis e têm maior aromaticidade. Este comportamento ocorre em razão dos agregados com este diâmetro serem mais estável por ocasião do umedecimento e por serem constituídos por partículas de pequenas dimensões (2-20 μm de diâmetro) unidas por diversas substâncias cimentantes, como óxidos, aluminossilicatos e materiais orgânicos, de tal forma, a não serem facilmente rompidos pelas práticas agrícolas. Isto demonstra a importância da participação do carbono orgânico como um dos elementos responsáveis pela estabilização dos agregados, em especial, para os agregados de maior diâmetro.

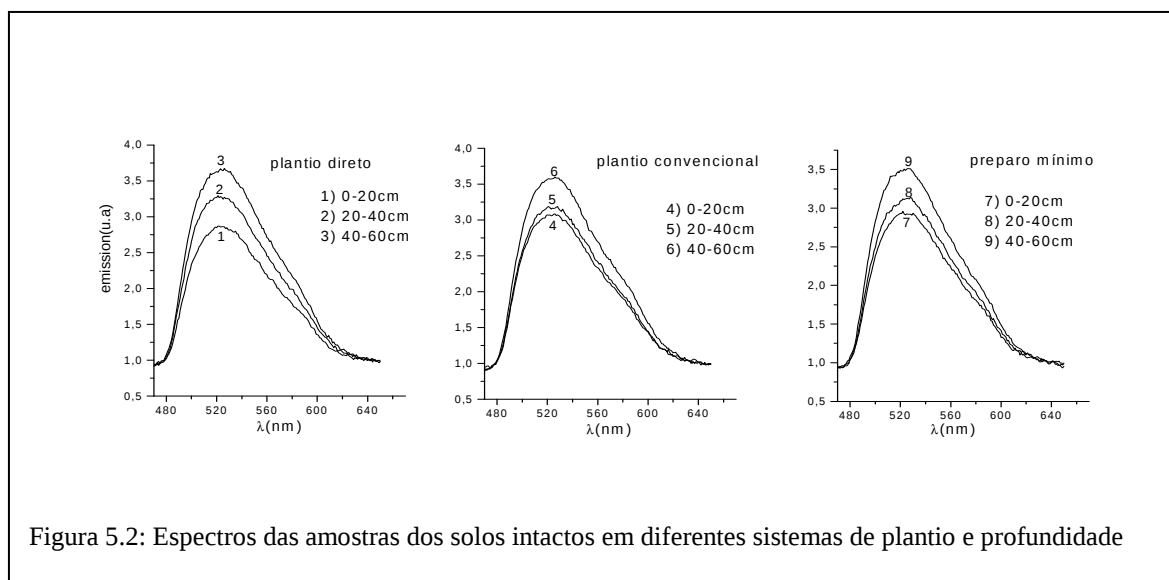
Além disso, espera-se que as formas de carbono possam interagir com as partículas menores estejam mais transformadas, enquanto, nos macroagregados, o material orgânico encontra-se menos alterado (DUXBURY et al., 1989). Portanto, a formação de agregados no solo é a mais provável razão da estabilização da matéria orgânica (STEVENSON, 1994) e os agregados mais estáveis estão na fração 2-20 mm.

5.3 RESULTADOS DA ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

Experimentos de FIL foram realizados, a fim de se obter informações sobre o grau de humificação (H_{FIL}) das amostras de solo intacto. A proposta de cálculo deste índice de humificação é a razão entre o valor a área da fluorescência (AF) e o valor do carbono total (C_T) presente na amostra de solo inteiro (MILORI et al., 2006), ou seja, $H_{FIL} = \frac{AF}{C_T}$. Isso é feito para normalizar a relação entre a intensidade de emissão e a concentração de fluoróforos presentes na matéria orgânica da amostra. A adoção da área sobre a curva de fluorescência (ACF) como parâmetro para estimativa da humificação se baseia na metodologia para análise de fluorescência de AH em solução proposta por Milori et al. (2002), ou seja, o índice de humificação A_{465} . A excitação no azul é mais ressonante com estruturas humificadas (MILORI, 2002), por isso foi utilizada neste estudo com FIL.

5.3.1. Amostras de solo inteiro

Os espectros de emissão de FIL das amostras dos latossolos inteiros são mostrados na figura 5.2. de maneira geral, a menor intensidade de sinal de fluorescência foi observada no sistema plantio direto, na camada de 0-20 cm e os maiores nas profundidades de 20-40 cm e 40-60 cm.



Os espectros de emissão apresentam comprimento de onda em aproximadamente 530nm. Isso indica aumento do número de núcleos aromáticos condensados e, conseqüentemente, de maior humificação da matéria orgânica humificada, pois os anéis aromáticos são os principais fluoróforos presentes nas substâncias húmicas. (KALBITZ, 2000; MILLORI et al., 2002). A tabela 5.3 apresenta os valores da emissão de Fluorescência Induzida por Laser das amostras de solo.

Tabela 5.3 - Valores de emissão de Fluorescência Induzida por Laser.

AMOSTRAS	SISTEMAS DE MANEJO E PROFUNDIDADES (cm)	ÁREA
1	PD (0-20)	328,18
2	PD (20-40)	362,85
3	PD (40-60)	380,44
4	PC (0-20)	344,81
5	PC (20-40)	350,38
6	PC (40-60)	377,72
7	PM (0-20)	329,61
8	PM (20-40)	342,85
9	PM (40-60)	375,15

Observa-se que os resultados são coerentes aos apresentados pela literatura (BAYER et al., 2002; MILLORI et al., 2002). Segundo estes pesquisadores a intensidade da emissão de fluorescência com excitação na região do azul está diretamente relacionada com a concentração de radicais livres semiquinonas medidos pela técnica de EPR para amostras de ácido húmico extraídos do solo. Esta alta correlação é devido ao fato de que a excitação neste comprimento de onda é ressonante com estruturas que têm origem na oxidação de grupos quinonas e fenólicos. Dessa forma, a intensidade de fluorescência com excitação no azul é proporcional ao grau de humificação da matéria orgânica.

Os menores valores observados na camada 0-20 cm, em todos os sistemas de manejo, devem-se ao grau de humificação menos avançado, pois nesta profundidade há a presença de resíduos vegetais e raízes em estágios iniciais de decomposição. Observa-se que todas as amostras apresentam valores superiores de humificação na camada de 40-60 cm, sendo um indicativo de que a matéria orgânica presente nesta profundidade encontra-se em estágio avançado de decomposição (estabilização da matéria orgânica), em comparação com as demais profundidades.

Através da média dos valores obtidos da área do sinal de fluorescência e os teores de carbono total das amostras de solos mostrados na tabela 5.4, construiu-se o gráfico H_{FIL} (Figura 5.3).

Tabela 5.4 - Área do sinal de fluorescência dividido pelo teor de carbono total

SISTEMAS DE MANEJO E PROFUNDIDADES (cm)	C_{total} (g/kg ⁻¹)	ÁREA (u.a)	$H_{FIL} = A/C_{total}$
PD (0-20)	39,6	328,18	8,287
PC (0-20)	32,6	344,81	10,577
PM (0-20)	37,9	329,61	8,697
PD (20-40)	33,7	362,85	10,767
PC (20-40)	32,2	350,38	10,881
PM (20-40)	33,9	342,08	10,091
PD (40-60)	27,1	380,44	14,038
PC (40-60)	26,9	377,72	14,041
PM (40-60)	28,2	375,49	13,315

Para a profundidade de 0-20 cm, as amostras provenientes do solo submetido ao sistema convencional apresentaram maior humificação. A decomposição preferencial e acelerada das porções mais lábeis da MO é induzida nesse sistema de preparo em função do intenso revolvimento, resultando assim num incremento relativo de estruturas recalcitrantes.

Por outro lado, os sistemas plantio direto e preparo mínimo, sendo conservacionistas, contribuem para a manutenção da matéria orgânica na superfície e, após vários anos, provavelmente para o aumento da capacidade de suprimento de nitrogênio do solo, nutriente mais limitante ao rendimento da maioria das gramíneas (SANTOS; TOMM, 2003).

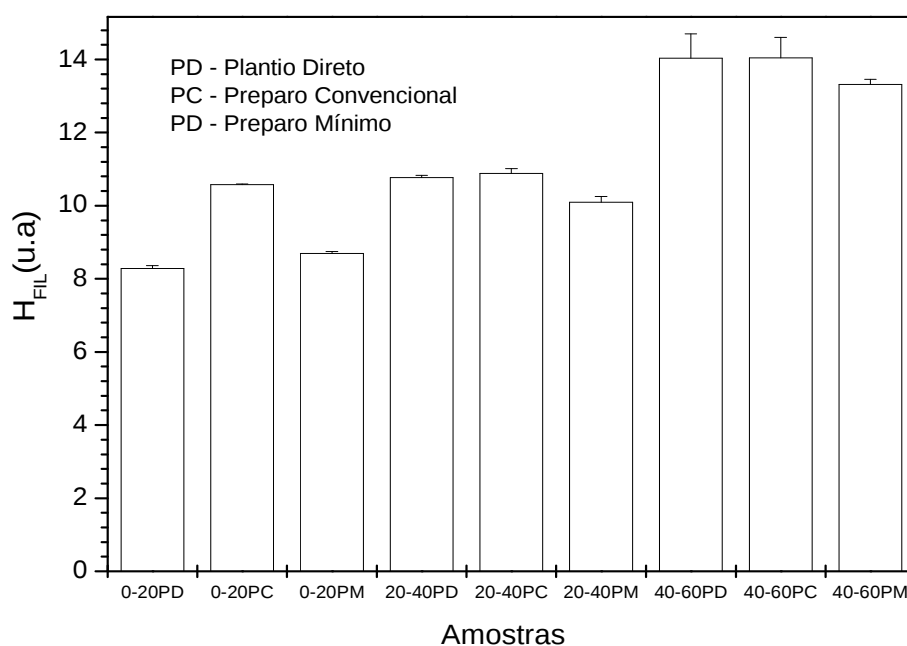


Figura 5.3 - Valores de H_{FIL} obtidos para todas as amostras de solo sob diferentes sistemas de manejo

Resultados semelhantes foram obtidos por espectroscopia de fluorescência em amostras em solução por Bayer et al. (2002), de maneira que a intensidade do sinal de emissão de fluorescência foi maior no solo sob preparo convencional, indicando a presença de maior quantidade de estruturas aromáticas condensadas.

Milori et al. (2006) também encontraram menor sinal de fluorescência e índice H_{FIL} para solos manejados sob plantio direto àqueles sob preparo convencional, principalmente nas camadas até 10 cm de profundidade. Tais resultados também foram coerentes com os obtidos por esses mesmos pesquisadores por fluorescência em solução de ácidos húmicos e demonstram a natureza mais lábil da matéria orgânica em solos sob plantio direto, causada possivelmente pela presença de estruturas vegetais na fração particulada. Isso não ocorre em solos sob preparo convencional, pois estes possuem matéria orgânica cuja natureza é mais

recalcitrante em função da decomposição acelerada e preferencial das estruturas mais lábeis, indicando melhor qualidade dos solos sob plantio direto.

De acordo com Christensen (1992), o acúmulo de fração leve é influenciado pelo uso da terra, tipo de vegetação e outros fatores que alteram o balanço entre a produção e a decomposição da matéria orgânica.

A maior concentração de estruturas aromáticas no solo sob preparo convencional deve-se a sua maior recalcitrância ao processo de decomposição oxidativa, como também explicado por Martin-Neto et al. (1994b) com relação ao efeito do cultivo do solo.

Estes resultados expressam a influência do preparo convencional em aumentar a recalcitrância da matéria orgânica do solo, expressa pela presença de estruturas de natureza aromática (RIFFALDI; SCHNITZER, 1972).

5.3.2 Resultados da análise de FIL das frações do solo

Existe uma estreita relação entre a matéria orgânica e a fração mineral do solo, formando complexos organo-minerais (SCHNITZER, 1986). Assim, o fracionamento físico do solo tem mostrado ser uma excelente alternativa ao procedimento químico convencional e ferramenta útil no estudo qualitativo da matéria orgânica do solo, revelando diferenças tanto na estrutura como na dinâmica da matéria orgânica, quando esta se encontra ligada às partículas de diferentes tamanhos (FELLER; BEARE, 1997; STEVENSON, 1982).

As técnicas espectroscópicas, especialmente as ópticas e de ressonância magnética nuclear e eletrônica vêm sendo muito utilizadas, pois através dessas técnicas os índices de humificação obtidos permitem a avaliação do grau de humificação das substâncias húmicas. Neste estudo foi utilizada a técnica da FIL para quantificar as frações da matéria orgânica do solo. Os resultados obtidos através da FIL para as amostras de solo, por tamanho de

partículas, são mostrados na tabela 5.5 e indica maior humificação na fração areia fina (20-53 μ m), em todos os sistemas de manejo do solo.

Tabela 5.5 - Valores de FIL para frações do solo na camada de 0-20 cm

Sistemas de manejo	Tamanho de partícula	Média (u.a)
PM	argila 0-2	163,79
	silte 2-20	234,52
	areia fina 20-53	313,86
	areia grossa 53-100	229,21
PD	argila 0-2	191,78
	silte 2-20	249,41
	areia fina 20-53	319,74
	areia grossa 53-100	257,32
PC	argila 0-2	161,07
	silte 2-20	267,25
	areia fina 20-53	396,37
	areia grossa 53-100	250,54

u.a = unidade arbitrária

O aumento da aromaticidade da matéria orgânica nas frações 2-20 μ m e 20-53 μ m, principalmente com o revolvimento do solo, reflete a decomposição preferencial de frações alifáticas da matéria orgânica, devido a maior facilidade de decomposição pelos microorganismos do solo.

Na fração < 2 μ m, onde não ocorreram alterações significativas na aromaticidade da matéria orgânica, sua decomposição é menos influenciada pela aromaticidade, sendo provavelmente a sua interação com a fração mineral o fator determinante da sua estabilidade.

Muitos trabalhos têm mostrado que as concentrações de carbono associado às partículas de tamanhos diferentes do solo são afetadas de forma diversa quando o teor total de carbono do solo muda. Isso indica que a matéria orgânica do solo tem períodos diferenciados de “turnover”, dependendo da partícula à qual ela se liga (CERRI et al., 1985).

Os valores de humificação das frações do solo são mostrados nos diagramas das figuras 5.4 e 5.5.

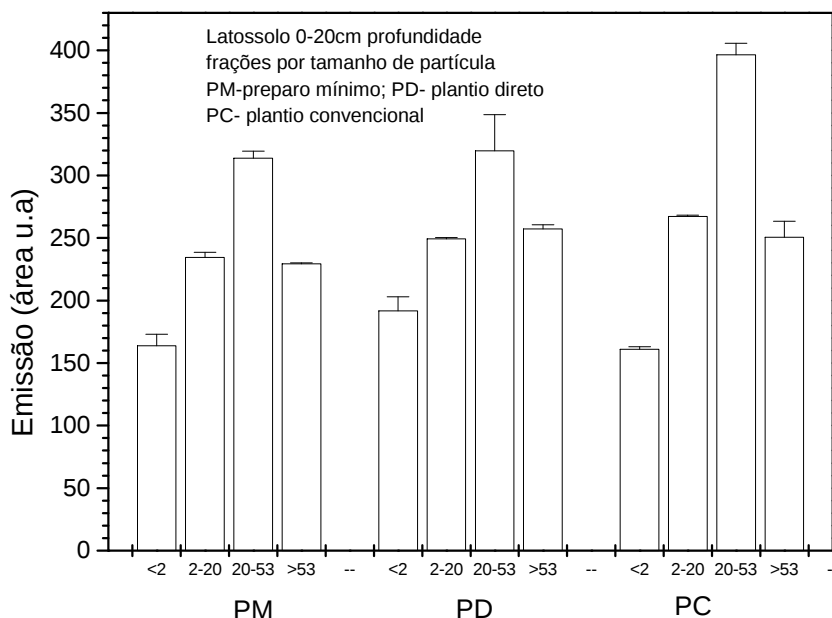


Figura 5.4 – Diagrama representativo da emissão de FIL das frações do solo.

Os menores valores de humificação foram observados na fração argila, em todos os sistemas de cultivo.

Esses resultados estão de acordo com alguns já relatados na literatura, sendo exemplo um estudo feito por Freixo, (2000) onde, em áreas sob sistema de plantio direto (com maior aporte de MOS), quando comparadas a áreas com solo revolvido (menor entrada e maior decomposição de MOS), foram obtidos maiores teores de carbono-areia e carbono-silte, na condição de maior armazenamento de MOS, enquanto os teores de carbono-argila não variaram nos dois sistemas de manejo avaliados.

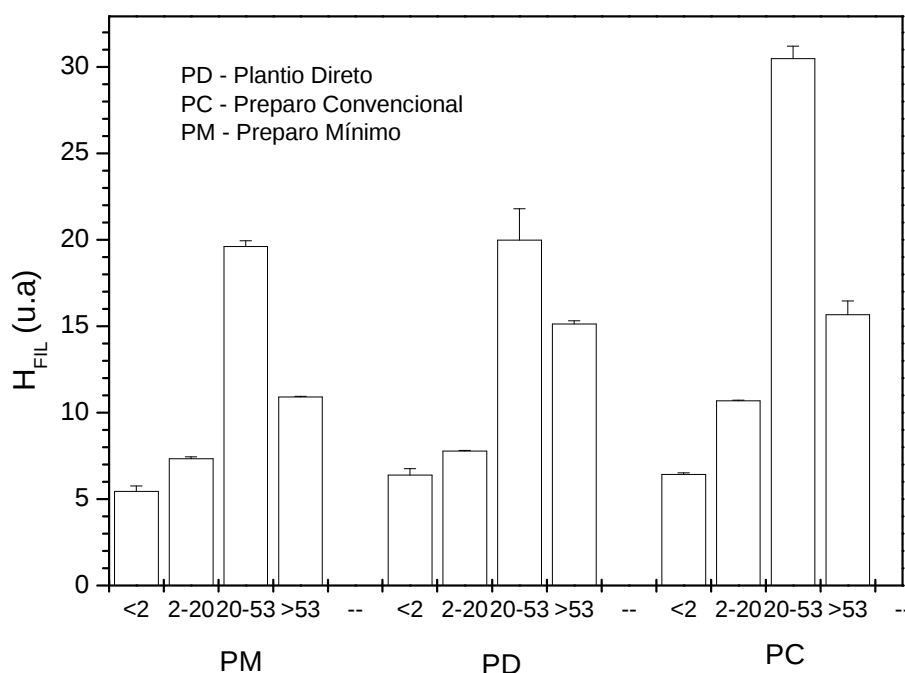
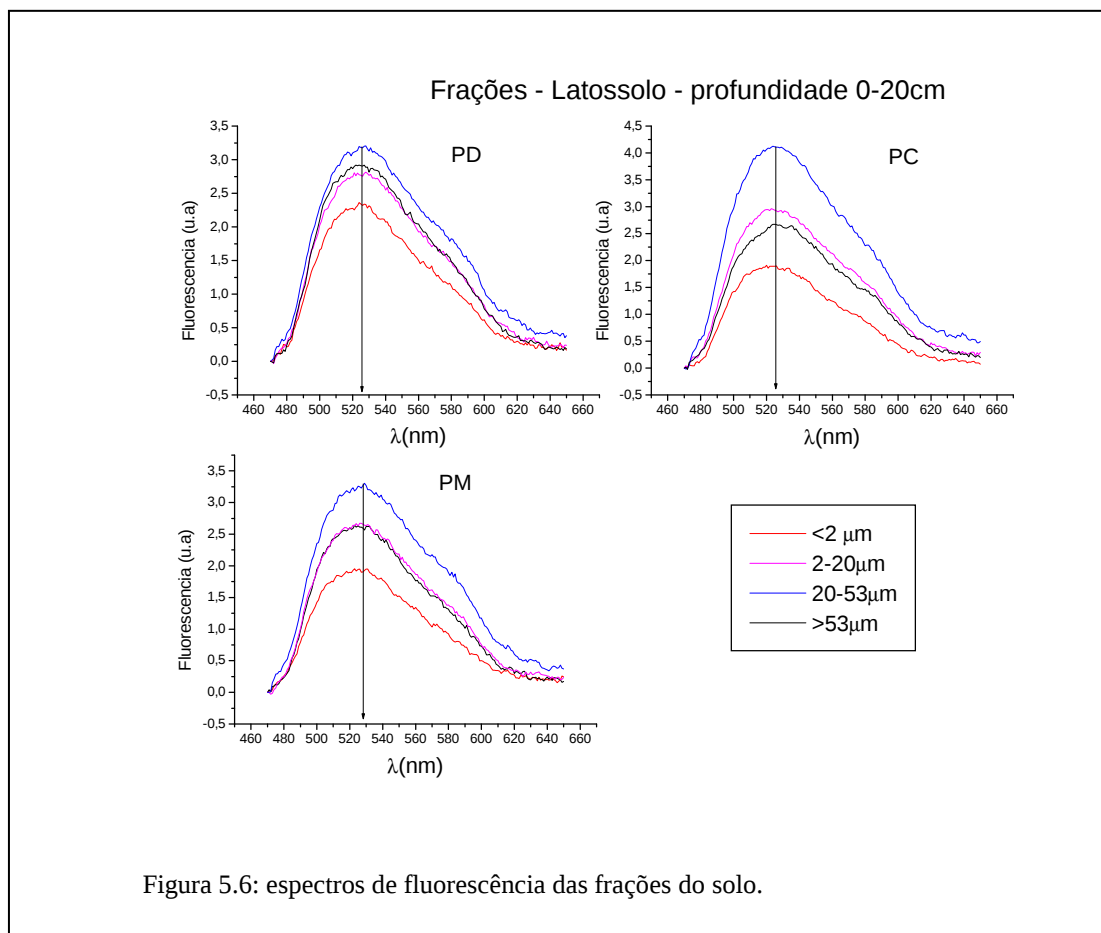


Figura 5.5 - Diagrama representativo dos índices de humificação obtido por FIL para frações por tamanho de partículas do solo.

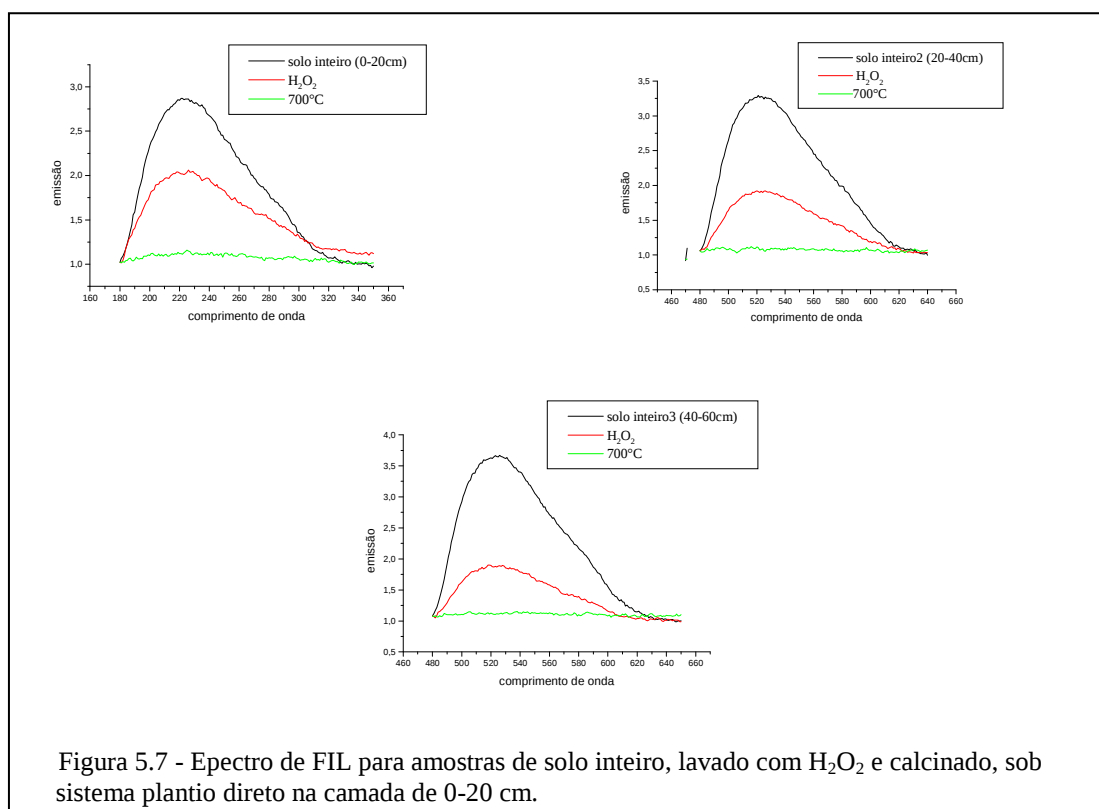
Os compostos orgânicos associados à argila são mais lábeis, têm mais constituintes alifáticos e incluem mais resíduos bioquímicos da biomassa microbiana. Substâncias húmicas mais alifáticas provavelmente contribuem para menor formação de radicais livres de semiquinonas os quais, segundo Riffaldi e Schnitzer (1972), são formados a partir da remoção de hidrogênio (H) dos grupos hidroxilas (OH) dos fenóis; então quanto maior a concentração de fenóis no material de origem maior será a concentração de spins nos ácidos húmicos formados a partir deles. Segundo Schnitzer e Khan (1978), os maiores níveis de radicais livres semiquinona estão presentes em amostras de frações de solo com tamanho menor que 50 μm , correlacionando com baixas razões C/N, as quais têm sido associadas a amostras com maior grau de humificação.

Na figura 5.6 os resultados mostram que os sinais de fluorescência, de todas as frações de solo, provavelmente têm sua origem nas moléculas dos anéis aromáticos ligados a sistemas conjugados, grupos quinonas e sistemas cíclicos.



González-Pérez, (2004) realizando estudos em um Latossolo Vermelho Amarelo, inteiro e de suas frações, através da fluorescência induzida por laser, observou sinais de fluorescência em aproximadamente 510 nm, com alta intensidade para frações do solo, indicando presença de grupos de menor peso molecular. No solo que estudamos foi observado comprimento de onda em aproximadamente 528 nm, o que provavelmente se deve a uma maior humificação, pois o espectro de emissão de fluorescência tende para mudança em direção a longos comprimentos de ondas quando moléculas fluorescentes tornam-se mais condensadas (ZSOLNAY et al., 1999).

Para se comprovar que a fluorescência observada era proveniente da matéria orgânica, realizou-se dois testes: um com amostras calcinadas (700°C) de solo sob sistema plantio direto e outro com todas as amostras submetidas a tratamento com água oxigenada (H_2O_2). Os resultados podem ser observados através dos espectros de FIL mostrados na figura 5. 7.



Através dos espectros observa-se que ainda há sinal de fluorescência nas amostras submetidas a tratamento com H_2O_2 . Isso se deve ao fato de que essas amostras não foram suficientemente tratadas com H_2O_2 , havendo a necessidade de se fazer um tratamento mais efetivo. Não obstante, pode-se observar uma brusca redução na linha do sinal de fluorescência desses espectros e o total desaparecimento do sinal de fluorescência com tratamento térmico (700°C), o que vem confirmar os resultados obtidos por Milori et al., (2006). Estes pesquisadores, utilizando esta mesma técnica com solos da região do Cerrado brasileiro, concluíram que os sinais observados indicavam a presença de matéria orgânica nas amostras desse solo.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

- Na superfície, o plantio direto possui a menor humificação da MOS em comparação com o plantio convencional e preparo mínimo;
- A maior humificação foi observada em profundidades maiores para todos os sistemas de manejo do solo.
- Para as frações da camada superficial do solo (0-20 cm) analisadas, os resultados indicaram maior humificação na fração areia fina (20-53 μm) e o menor na fração argila ($< 2 \mu\text{m}$), em todos os sistemas de manejo do solo.
- A Espectroscopia de FIL, proposta para avaliar o grau de humificação da MO de solos intactos, pode ser utilizada por ser uma técnica rápida e eficaz, sem que haja a necessidade de se tratar quimicamente as amostras de solo e por fornecer resultados coerentes acerca do grau de humificação da matéria orgânica do solo. Por isso, essa técnica apresenta um grande potencial para análise da matéria orgânica em condições muito próximas às naturais.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, J.J., TAKÁCS, M., EGEBERG, P.K. Total luminescence fluorescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000: Toulouse-França). **Anais...** Toulouse, IHSS, p. 147-14, 2000.

ANDRADE, C.A. **Fração orgânica de bio sólidos e efeito no estoque de carbono e qualidade da matéria orgânica de um latossolo cultivado com eucalipto**. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP 113 p. 2004.

ANDREUX, F. et al. The usefulness of humus fractionation methods in studies about the behaviour of pollutants in soil. **Toxicology Environmental and Chemistry**, v. 31/32, p. 29-38, 1991.

ANDRIULO, A.E. et al. Matéria orgânica del suelo en la región pampeana; I. Un método de fraccionamento por tamizado. **Agrochimica**, v. 34, p.475-489, 1990.

ATKINS, P. W. **The Elements of Physical Chemistry**, 3 ed., LTC, Rio de Janeiro, 2003, 476p.

BALESDENT, J., CHENU, C., BALABANE, M. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. **Soil & Tillage Research**, v. 53, p. 215-230, 2000.

BALESDENT, J.; MARIOTTI, A.; GUILLET, D. Natural ¹³C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 19, p. 25-30, 1987.

BARRIUSO, E.; KOSKINEN, W. C. Incorporating nonextractable atrazine residues into soil size fractions as a function of time. **Soil Science Society of America Journal**, v. 60, p. 150-157, 1996.

BAUMGARDNER, M.F. et al. Effects of organic matter on the multispectral properties of soils. **Proceedings Indiana Academy of Science**, Brookville, v.79, p.413-422, 1970.

BAYER, C. **Dinâmica da matéria orgânica em sistemas de manejo de solos**. Porto Alegre, 1996. 241 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 105-112, 1997.

BAYER, C., MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G.A., CAMARGO, F.A.O. (Eds.), **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, p.9-26, 1999.

BAYER, C. et al. Organic matter storage in a sandy clay loam Acrisol affected by tillage and cropping systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 54, p. 101-109, 2000a.

BAYER, C. et al.. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. **Soil & Tillage Research**, v. 53, p. 95-109, 2000b.

BAYER, C. et al. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. **Geoderma**, Amsterdam, v.105, p.81-92, 2002.

BEARE, M. H. et al. Aggregate-protected and un protected pools of organic matter in conventional and no-tillage soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.58, p. 787-795, 1994.

BENITES, V.M. et al. Caracterização dos ácidos húmicos extraídos de um latossolo vermelho-amarelo e de um podzol por análise termodiferencial e pela espectroscopia de absorção no infravermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.2, p.543-551, jul./set. 1999.

BODDEY, R. M et al. S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 103, p. 389-403, 2004.

BOYER, J. **Les sols ferrallitiques**: Facteur de fertilité et utilisation des sols. (ORSTOM. Initiations documentations techniques, 52). Paris: Orstom, 384p, 1982.

BRADY, N.C. Suprimento e assimilabilidade do fósforo e do potássio. In: **Natureza e propriedade dos solos**. 7. ed. Rio de Janeiro, Freitas Bastos, p.373-413, 1989.

CAMPOS, B.C. et al.. Estabilidade estrutural de um latossolo vermelho-escuro distrófico após sete anos de rotação de culturas e sistemas de manejo de solo. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 21, p.473-480, 1997.

CANELLAS, L. P. et al., Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36 n. 12, dez. 2001.

CANELLAS, L.P. et al. Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhço e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, n.2, p.935-944, set./out. 2003.

CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.3, p.233-240, mar. 2004

CARPENEDO, V.; MIELNICZUK, J. Estado de agregados e qualidade de agregados de um latossolos roxos, submetidos a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.99-105, 1990.

CARVALHO, E. R. et al. "Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy". **J. Braz. Chem. Soc.**, v.15, p. (53): 421, 2004.

CASTRO FILHO, C.; MUZILLI, O.; PODANOSCHI, A.L. Estabilidade dos agregados e sua relação com o teor de carbono orgânico num Latossolo Roxo distrófico, em função de sistemas de plantio, rotação de culturas e métodos de preparo das amostras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 22:527-538, 1998.

CATROUX, G.; SCHNITZER, M. Chemical, spectroscopic, and biological characteristics of the organic matter in particle size fractions separated from an aquoll. **Soil Science Society of America Journal**, v.51, p.1200-1207, 1987.

CERETTA, C.A. et al. Métodos espectroscópicos. In: SANTOS G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Eds.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Porto Alegre: Genesis, p.293-336, 1999.

CERRI, C.C. Dinâmica da matéria orgânica em solo de pastagem. In: **SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMA DE PASTAGEM, 1989**, Piracicaba. Piracicaba: Universidade de São Paulo, p.135- 147, 1989.

CERRI, C.C. et al.. Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols. **Compte Rendu Académie des Sciences**, Paris, t. 300, Sér. n.9, p.423-428, 1985.

CHRISTENSEN, B.T. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. **Advances in Soil Science**, v.20, p.1-19, 1992.

CHRISTENSEN, B.T. Carbon in primary and secondary organo-mineral complexes. In: CARTER, M.R.; STEWART, B.A. (Ed.). **Structure and organic matter storage in agricultural soil**, Boca Raton: CRC, p.97-165, 1996. (Advances in Soil Sciences).

CHRISTENSEN, B.T. Organic matter in soil - structure, function and turnover. In: **Plant Production**. Tjele 2000, 95p.

COLLINS, H.P. et al. Characterization of soil organic carbon relative to its stability and turnover. In: **Soil organic matter in temperate agroecosystems** - long-term experiments in North America. Boca Raton, CRC Press, p. 51-72, 1997.

CONTE, P. et al.. "Quantitative differences in evaluating soil humic substances by liquid and solid – state ^{13}C – NMR Spectroscopy. **Geoderma**, 80: 339, 1997.

CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformation arrangement of dissolved humic substances: influence of solution composition on association of humic molecules. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 1682-1690, 1999.

CORAZZA, E.J. et al.. Comportamento de diferentes sistemas de manejo como fonte ou depósito de carbono em relação à vegetação de cerrado. **Revista brasileira de ciência do solo**, 23:425-432, 1999.

DICK, D.P. Caracterização por NMR e por análise elementar de substâncias húmicas de dois solos de diferentes mineralogias. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRESUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, São Carlos, 1997. **Anais**. São Carlos: SBSH, p.92-93. 1997.

DICK, D.P., BURBA, P., HERZOG, H. Influence of extractant and soil type on molecular characteristics of humic substances from two brazilian soils. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.10, p.140-145, 1999.

DIEKOW, J. **Estoque e qualidade da matéria orgânica do solo em função de sistemas de culturas e adubação nitrogenada no sistema plantio direto**. Porto Alegre, 2003. 164 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

DIEKOW, J. et al. 2004. Soil C and N stocks as affected by cropping systems and nitrogen fertilisation in a southern Brazil Acrisol managed under no-tillage for 17 years. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, 2004. no prelo.

DING, G. et al.. Soil organic matter characteristics as affected by tillage management. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.66, p.421-429, 2002.

DUXBURY, J. M.; SMITH, M. S.; DORAN, J. W. soil organic matter as a source and a sink of plant nutrients. In: COLEMAN, D. C. et al. (Eds). *Dinamic of soil organic matter in tropical ecosystems*. Honolulu: Neftal project, p. 33-67, 1989.

EWALD, M., BERGER, P., VISSER, S.A. UV-visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as function of their molecular weights. **Geoderma**. 43, 11-20, 1988.

FEIGL, B.J. **Dinâmica da matéria orgânica do solo na sucessão floresta/pastagem na Amazônia (Rondônia)**. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994, 68p.

FELLER, C.; ALBRECHT, A.; TESSIER, D. Aggregation and organic matter storage in kaolinitic and smectitic tropical soils. In: CARTER, M.R.; STEWART, B.A. (Eds.). **Structure and organic matter storage in agricultural soils**. Boca Raton: CRC Lewish, Ch.8, p.309-352. (**Advances in Soil Science**), 1996.

FELLER, C.; BEARE, M. H. Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. **Geoderma**, v.79: 69-116, 1997.

FERNANDES, F. Estabilização e Higienização de Biossólidos. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA, cap. 3, p. 45-67, 2000.

FREIXO, A.A. **Caracterização da matéria orgânica de Latossolos sob diferentes sistemas de cultivo através de fracionamento físico e espectroscopia de infravermelho**. 2000. 86p.

Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

FREIXO A.A.et al. Soil organic carbon and fractions of a Rhodic Ferralsol under the influence of tillage and crop rotation systems in southern Brazil. **Soil & Till. Res.**, v. 64, p. 221–230, 2002.

GIACOMINI, S. J.et al. Matéria seca, relação C/N e acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio em misturas de plantas de cobertura de solo. **Revista brasileira de ciência do solo**. Viçosa, 27: 325-334, 2003.

GLATZELA, S. et al. Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs. **Geoderma**, v.113, p.397– 411, 2003.

GOLCHIN, A. et al. The effects of cultivation on the composition of organic matter and structural stability of soils. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v.33, p.975-993, 1995.

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos Instrumentais para análise de soluções, 4ª ed. Corrigido e aumentado**. Serviço de Educação e Bolsas, Fundação Calouste Gulbenkian/Lisboa, 2001.

GONÇALVES, J.L.M.; MENDES, K.C.F.S.; SASAKI, C.M. Mineralização de nitrogênio em ecossistemas florestais naturais e implantados do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 25. p.601-616, 2001.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M. **Estudos Espectroscópicos da dinâmica da matéria orgânica e complexação com íons metálicos em solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. 2003. 128 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M. et al.. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and Fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, [S.l.], v.118, p.181-190, 2004.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M. et al. Laser-Induced fluorescence of organic matter from a Brazilian oxisol under sewage-sludge applications. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz), v.63, n. 3, p. 269-275, May/June 2006.

HALL, K.J., LEE, G.F. Molecular size characterization of organic matter in a meromictic lake. **Water Res.** 8, 239-251, 1974.

HAYES, M. H. B.; CLAPP, C. E. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 723-737, 2001.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, R.M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D. Microbial biomass, mineral nitrogen and carbon content in savanna soil aggregates under conventional and no-tillage. **Soil Biology & Biochemistry**, v.34, p.1563-1570, 2002.

HERNANI, L.C.; KURIHARA, C.H.; SILVA, W.M. Sistemas de manejo de solo e perdas de nutrientes e matéria orgânica por erosão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 23:145-154, 1999.

JENKINSON, D. S. **Soil organic matter and its dynamics**. In: **Russel's Soil Conditions and Plant Growth**. A. Wild Ed. Longmann Scientific & Technical. Burnt Mill, Harlow, Essex, England, p. 564-607, 1988.

JENNY, H. **Factors of soil formation**: A system of quantitative pedology. New York: CAB International, 1941. 286p.

KALBITZ, K., GEYER, W., GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances a reflection of land use history in a fen area. **Biogeochem.** 47, 219-238, 1999

KALBITZ, K.; GEYER, S.; GEYER, W. A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances. **Chemosphere**, v. 40, p.1305-1312, 2000.

KALBITZ, K. et al. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. **Geoderma**, v.113: 273– 291, 2003.

KERN, J.S.; JOHNSON, M.G. Conservation tillage impacts on national soil and atmospheric carbon levels. **Soil Science Society of America Journal**, 57:200-210, 1993.

KRØSSHAVN, M.; SOUTON, T. E.; STEINNES, E. The influence of vegetational origin and degree of humification of organic soils on their chemical composition, determined by solid-state ¹³C NMR. **Journal of Soil Science**, Oxford, v.43, p. 485 493, 1992.

KUMADA, K. **Chemistry of soil organic matter**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1987. 241p.

LAL, R. Residue management, conservation tillage and soil restoration for mitigating greenhouse effect by CO₂-enrichment. **Soil and Tillage Research**, [S.l.], v.43, p.81-107, 1997.

LEPSCH, I.F.; MENK, J.R.F.; OLIVEIRA, J.B. de. Carbon storage and other properties of soils under agriculture and natural vegetation in São Paulo State, Brazil. **Soil Use and Management**, v.10, p.34-42, 1994.

LEVESQUE, M. Fluorescence and gel filtration of humic compounds. **Soil Science**, v.113, 346-353, 1972.

LONGO, R.M. **Modificações em parâmetros físicos e químicos de latossolos argilosos decorrentes da substituição de floresta e de cerrado por pastagens**. Tese (Doutorado) - Universidade de Campinas, Campinas, 1999. 102p

LOVLEY, D. et al. **Humic substances as electron acceptors for microbial respiration** **Nature**, London, v.382, p.445-448, 1996.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: adubos e adubação**. 2a. ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1967. 528p.

MARQUES, M. O. **Incorporação de lodo de esgoto em solo cultivado com cana-de-açúcar**. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 1997.

MARTIN-NETO, L. et al. "EPR of Micronutrients-Humic substances complexes Extracted from Brazilian Soil". **Soil Science**, 151 (5):369, 1991.

MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A. E.; TRAGHETTA, D. G. Effects of cultivation on EPR spectra of soil organic matter from soil size fractions of a mollisol. **Soil Science**, Baltimore, v. 157, p. 365-372, 1994a.

MARTIN-NETO, L; VIEIRA, E.; SPOSITO, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 1867-1873, 1994b.

MARTIN-NETO, L; ROSSEL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperature grassland climosequence. **Geoderma**, v. 81, p. 305-311, 1998.

MARTIN-NETO, L. et al. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 520-525, 2001.

MARTINS, P.F.S. et al. Consequences of clearing and tillage on the soil of a natural Amazonian ecosystem. **Forest Ecology and Management**, v.38, p.273-282, 1991.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of Plant Nutrition**. 4^a ed. International Potash Institute, Bern, Switzerland, 1987.

MIANO, T.M., SPOSITO, G., MARTIN, J.P. Fluorescence spectroscopy of humic substances. **Soil Science**. Soc. Am. J. 52, 1016-1019, 1988.

MILORI, D.M.B.P. et al. Fotoluminescência de solos intactos. Nova técnica para avaliação da humificação da matéria orgânica. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 4, 2001, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, Departamento de Solos, p. 97-99, 2001.

MILORI, D. M. B. P. et al. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, n. 11, p. 739-749, 2002.

MILORI, D. M. B. P; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C. Nova metodologia utilizando fluorescência induzida por laser para análise de solos inteiros. **Nos Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. Ribeirão Preto, 13 a 18 de julho de 2003.

MILORI, D.M.B.P. et al. Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, v.70, p.57-63, 2006

MOLLOY, L.F.; SPEIR, T.W. Studies on a climosequence of soil in tussock grasslands. 12. Constituents of the soil light fraction. New Zealand J. **Soil Science**, Wellington, v. 20, p. 167-177, 1977.

MONROZIER, L.J. et al. Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. **Geoderma**, v.50, p. 37-62, 1991.

MONTGOMERY, O.L. **An investigation of the relationship between spectral reflectance and chemical, physical and genetic characteristics of soil**. Thesis (PhD in Soil Science) - Purdue University. 1976. 148p.

MOREAU, R. Évolution des sols sous différents modes de mise en culture en Côte d'Ivoire forestière et préforestière. **Cahier ORSTOM**, Série Pédologie, Paris, v.20, n.4, p.311-325, 1983.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2003, 626p.

MOREIRA, A., MALAVOLTA, E. Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solo submetido a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.11, p.1103-1110, nov. 2004.

MUZILLI, O. Influência do sistema de plantio direto, comparado ao convencional, sobre a fertilidade da camada arável do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, p. 95-102, 1983.

NEVES, C. S. V.J. et al. Influência de sistemas de manejo de solo em pomar de tangerina 'Poncã' sobre limão 'Cravo' em um latossolo roxo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.20, n.3, p.367-374, 1998.

NEVES, C. S. V.; FELLER, C.; LARRÉ-LARROUY, M.C. Matéria orgânica nas frações granulométricas de um latossolo vermelho distroférrico sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 17-26, jan. /mar. 2005.

NICOLARDOT, B.; RECOUS, S.; MARY, B. Simulation of C and N mineralization during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C/N ratio of the residue, **Plant Soil**, 228:83 – 103, 2001.

NKEDI-KIZZA, P.; RAO, P. S. C.; JOHNSON, J. W. Adsorption of diuron and 2, 4, 5-T on soil particle-size separates. **Journal of Environmental Quality**, v. 12, p. 195-197, 1983.

NOVOTNY, E. H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo**. 2002. 231 f. Tese (Doutorado em Físico Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

OADES, J.M. et al. Influence of management on the composition of organic matter in a redbrown earth as shown by ¹³C nuclear magnetic resonance. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v.26, p.289-299, 1988.

OADES, J.M. An introduction to organic matter in mineral soils. In: DIXON, J.B. & WEED, S.B. (Eds.) **Minerals in soil environments**. 2. ed. Madison: Soil Science Society of America, p. 35-84, 1989.

PEIXOTO, R. T. G. Matéria orgânica e a dinâmica das cargas elétricas dos solos: processos e consequências. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26.1997 Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBSC/EMBRAPA-CNPS, 1997. CD-ROM.

PETERSEN, H.; LUXTON, M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. In: PETERSEN, H. (ed). **Quantitative ecology of microfungi and animais in soil and litter**. Oikos, 39(3):287-388, 1982.

PIANA, M.J., ZAHIR, O. Investigation of metal binding of humic substances using fluorescence emission and synchronous-scan spectroscopy. **J. Environ. Sci. Health**. B35, 87-102, 2000.

PICCOLO, A.; MBAGWU, J. S. C. Effects of different organic waste amendments on soil microaggregates stability and molecular sizes of humic substances. **Plant Soil** 123:27-37, 1990.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Micelle-Like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. **Chemosphere**, v. 33, p. 595, 1996.

PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. **Adv. Environ. Res.** 3:508-521, 2000.

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

PIERZYNSKY, G.M., SIMS, J.T., VANCE, G.F. **Soils and environmental quality**. Florida: CRC Press, 313p. 1994.

PILLON, C. N. **Alterações no conteúdo e qualidade da matéria orgânica do solo induzidas por sistemas de cultura em plantio direto**. Tese de doutorado, UFRGS, 2000, 232p.

PILLON, C.N. et al. Seqüestro de carbono por sistemas de manejo do solo e seus reflexos sobre o efeito estufa In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 4. 2001, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, Departamento de Solos, 2001.

PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. Editora Nobel, 9a edição, São Paulo, 1987. 549p

REEVES, D.W. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. **Soil & Tillage Research**, v.43, p.131-167, nov. 1997.

REICOSKY, D.C.; LINDSTROM, M.J. Fall tillage method: effect on short-term carbon dioxide flux from soil. **Agron. J.**, 85:1237-1243, 1993.

REICOSKY, D.C. et al. Soil organic matter changes resulting from tillage and biomass production. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.50, p.253-261, 1995.

Relatórios do experimento. **Avaliação da erosão em sistemas de preparo e rotação de culturas em macroparcelas**, programa de recursos naturais – PRN, IAPAR- PR.

RESCK, D. V. S.; PEREIRA, J.; SILVA, J. E. **Dinâmica da matéria orgânica na região dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1992. 22p. (Documentos, 36).

RIFFALDI, R.; SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. **Soil Science Society of America Journal**, v.36, p.301-305, 1972.

RISTORI, G.G. et al. Characterization of organic matter in particle-size fractions of Vertisols. **Geoderma**, v.54, p. 295-305, 1992.

ROMÃO, L. P. C.; ROCHA, J. C. Utilização da ultrafiltração em fluxo tangencial na determinação das constantes de troca entre substâncias húmicas e íons Cu(II). **Revista da Fapese de Pesquisa e Extensão**, v. 2, p. 25-36, jul./dez. 2005.

ROSA, A. H., ROCHA, J. C., FURLAN, M. Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam na extração. **Quim. Nova**, v. 23, 472-476, 2000.

ROSA, A. H. et al. Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soil profiles in Brazil's Amazonian region. Milori, **Geoderma** 127 (2005) 1 –10, 2004.

ROSSEL, R.A. et al Humic acids properties of an Argiudoll soil under two tillage systems. **Science of the Total Environment, Amsterdam**, v.81/82, p.391-400, 1989.

SAAB, S. C. **Caracterização da matéria orgânica em gleissolos por espectroscopias de EPR, RMN, IV e UV-Visível**. 1999, 111p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

SAAB, S.C.; MARTIN-NETO, L. Use of the EPR technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions **Quim. Nova**, v. 26, No. 4, 497-498, 2003.

SAAB, S.C.; MARTIN-NETO, L. Studies of Semiquinone Free Radicals by ESR in the Whole Soil, HA, FA and Humic Substances, **J. Braz. Chem. Soc.** Vol. 15. No. 1, 34, 37, 2004.

SANTOS, J. Q. **Fertilização - Fundamentos da Utilização dos Adubos e Correctivos**. Publicações Europa-América, Mem Martins, 1991, 442 p.

SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O., eds. **Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre, Gênese, p. 27-40, 1999, 491p.

SANTOS, H. P.; TOMM, G. O. Disponibilidade de nutrientes e teor de matéria orgânica em função de sistemas de cultivo e de manejo de solo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 477-486, 2003.

SANTOS, L. M. et al. **Avaliação da matéria orgânica de solos tropicais submetidos à adição de lodo de esgoto em um experimento de longa duração.** São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006, 6p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 36)..

SCHNITZER, M. Humic substances: chemistry and reactions. In: Soil Organic Matter (Schnitzer, M. e Khan, S. U., Eds.). **Elsevier Science Publishers**, B. V. Amsterdam, p. 1-64, 1978.

SCHNITZER, M.; Khan, S. U. Humic substances chemistry and reactions: soil organic matter. New York: **Elsevier**, p. 319, 1978.

SCHNITZER, M. Binding of humic substances by soil mineral colloids. In: HUANG, P. M., SCHNITZER, M. (Eds.) **Interactions of soil minerals with natural organics and microbes.** Madison: SSSA, p. 77-102, 1986.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. "A state of the art structural concept for humic substances". **Naturwissen Schafte**n, New York, 80:29, 1993.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 162, n. 2, p. 115-130, 1997.

SEGNINI, A. et al.. Evaluation of carbon sequestration in Brazilian area of sugar-cane under different tillage systems. In: MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; SILVA, W.T.L. da. (Eds.). **Humic Substances and Soil and Water Environment: International Meeting of IHSS**, 12. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, p. 14-16, 2004.

SEIN, L.T., Jr., VARNUM, J.M.; JANSEN, S.A. Conformational modeling of a new building block of humic acid: approaches to the lowest energy conformer. **Environmental Science & Technology**. 33 (4), 546-552, 1999.

SENESI, N. Application of Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy in Soil Chemistry. **Advances in soil science**, V.14. New York, Springer, 1990.

SENESI, N. et al. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v.152, p.259-271, 1991.

SENESI, N., SAIZ-JIMENEZ, MIANO, T.M. Spectroscopic characterization of metal-humic acid-lix complexes of earthworm-composted organic wastes. **Sci. Total Environ.** 117/118, 111-120, 1992.

SENESI, N.; MIANO, T.M.; BRUNETTI, G. Humic like substances amendments and effects on native soil humic substances. In: PICCOLO, A. (Ed.) Humic substances in terrestrial ecosystems. Amsterdam: **Elsevier Science**, cap. 14, p.531-593, 1996.

SENESI, N.; LOFFREDO, E. The Chemistry of Soil Organic Matter. In: SPARKS, D.L. (Ed.) Soil physical chemistry. **Boca Raton**: CRC Press. cap.6, p.242-370, 1999.

SIDIRAS, N; PAVAN, M. A. Influência do sistema de manejo do solo no seu nível de fertilidade. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, p. 249- 254, 1985.

SILVA, I.F.; MIELNICZUK, J. Avaliação do estado de agregação do solo afetado pelo uso agrícola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.21, n.2, p.313-319, 1997.

SILVA, C.A.; MACHADO, P.L.O.A. **Seqüestro e emissão de carbono em ecossistemas agrícolas: estratégias para o aumento dos estoques de matéria orgânica em solos tropicais**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 23p. (Documentos, 19), 2000.

SILVA, L.S.; CAMARGO, F.A.O.; CERETTA, C.A. Composição da fase sólida orgânica do solo. In: MEURER, E.J. (Ed.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Genesis, p.45-62, 2000.

SILVA, L.S.; CAMARGO, F.A.O.; CERETTA, C.A. Composição da fase sólida orgânica do solo. In: MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo**, 2 ed. Porto Alegre, Genesis, p.73-99, 2004.

SIMPSON, A. J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, p. S72-S80, 2002a.

SIMPSON, A. J. et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 84-88, 2002b.

SKOOG, D.; WEST D.; HOLLER, F. **Química Analítica**, Edit.McGraw-Hill. Sexta edição, 2000.

SKOOG, D.A. HOLLER, F.J. NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre, Bookman, 2002, 836p.

SPARK, K.M., SWIFT, R.S. Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. In: Senesi, N, Miano, T. (Ed.). Humic substances in the global environment and implications on human health. Amsterdam, **Elsevier**. p. 153-160, 1994.

STEARMAN, G. K. et al. Characterization of humic acid from no-tilled and tilled soils using carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.53, p.744-749, 1989.

STEVENSON, F.J, GOH, K.M. Infrared spectra of humic acids and related substances. **Geochim. Cosmochim. Acta**. 35, 471-483, 1971.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd ed. New York: Wiley, 1982, 443p.

STEVENSON, F. J. **Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients**. New York: John Wiley, 1986, 380 p.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd ed. New York: Wiley, 1994, 496p

STOUT, J.D.; GOH, K.M.; RAFTER, T.A. Chemistry and turnover naturally occurring resistant organic compounds in soil. In: **Soil biochemistry**. New York: MarcelDekker, 1985.
 SWIFT, R.S. In Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods; Sparks, D. L. ed.; **Soil Science Society of America**: Madison, USA, p 1001, 1996.

TATE III, R.L. Humic and fulvic acids: formation and decomposition. In: TATE III, R.L., ed. Soil organic matter: biological and ecological effects. New York: **John Wiley & Sons**, p.147-164, 1987.

THENG, B.K.G., TATE, K.R., SOLLINGS, P. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: COLEMAN, D.C., OADES, J.M., UEHARA, G. **Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems**. Hawaii:NiftAL Project, p.5-32, 1989.

TISDALL, J. M., OADES, J. M.: Organic matter and water- stable aggregates in soils. **Journal of Soil Sci.** 33, 141–163, 1982.

TISDALE, S. L.; NELSON, W. L.; BEATON, J. D. **Soil Fertility and Fertilizers**, 4^a ed., Macmillan Publishing Company, New York, 1985, 754 p.

TURCHENEK, L. W.; OADES, J. M. Fractionation of organo-mineral complexes by sedimentation and density techniques. **Geoderma**, v. 21, p.311-343, 1979.

WANDRUSZKA, Von R. The micellar model of humic acid: evidence from pyrene fluorescence measurements. **Soil Science**, v. 163, p. 921-930, 1998.

WERSHAW, R. L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemical in soil-water or sediment-water systems. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 1, p. 29-45, 1986.

WERSHAW, R. L. Model for humus in soils and sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 27, p. 814-816, 1993.

ZECH, W. et al., G. Factors controlling humification and mineralizing of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v.79, p.117-161, 1997.

ZSOLNAY, A. et al. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**. 38, 45-50, 1998.

ZSOLNAY, A. et al. “Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying” **Chemosphere**, 38: 45, 1999.