

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS – FÍSICA

FABIANO MEIRA DE MOURA LUZ

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS NA ANÁLISE DA HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA
ORGÂNICA DE SOLO DE VÁRZEA

PONTA GROSSA
2013

FABIANO MEIRA DE MOURA LUZ

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS NA ANÁLISE DA HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA
ORGÂNICA DE SOLO DE VÁRZEA

Dissertação apresentada para a obtenção do
título de mestre na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de Ciências-Física.
Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab.

PONTA GROSSA
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Luz, Fabiano Meira de Moura
L979 Técnicas espectroscópicas na análise da
 humificação da matéria orgânica de solo de
 várzea/ Fabiano Meira de Moura Luz. Ponta
 Grossa, 2013.
 71f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências -
 Área de Concentração: Física),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Costa
 Saab.

 1. Fluorescência Induzida a Laser.
 2. Ressonância Paramagnética Eletrônica.
 3. Substâncias Húmicas. I. Saab, Sérgio da
 Costa. II. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Mestrado em Ciências. III. T.

CDD: 539.2


TERMO DE APROVAÇÃO

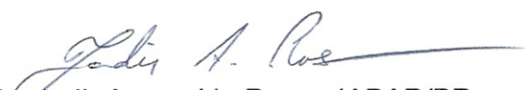
FABIANO MEIRA DE MOURA LUZ

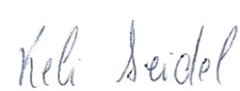
“HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DE SOLO DE VÁRZEA POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS”

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

Orientador:


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


Dr. Jadir Aparecido Rosa - IAPAR/PR
Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR/PR


Profª. Drª. Keli Fabiana Seidel
Departamento Acadêmico de Física, UTFPR/PR

Ponta Grossa, 22 de abril de 2013.

Dedico esse trabalho a minha mãe,
Dirce Meira de Moura, pelo apoio e
orações nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de tudo o que é bom.

À minha esposa, Patricia Elizabeth Husch, pelo apoio incondicional nas horas boas e ruins.

Ao meu orientador, Sergio da Costa Saab, pela paciência e pela sabedoria típica dos grandes mestres.

Ao José Alfredo Baptista dos Santos e ao Dacio Antônio Benassi pela grande ajuda na escolha e coleta das amostras.

Ao Marcelo L. Simões e a Larissa M. dos Santos, pela ajuda nas medidas de RPE e FIL, respectivamente.

À Caroline Amadori e Carla Lourenço Pinto, pela enorme ajuda extração dos ácidos húmicos.

Aos Colegas de pós-graduação, Wellington Claiton, Wellington Luís, Sabrina, Jaqueline, Jocenei, Luís V. Prandel, pela companhia e companheirismo em todas as horas.

À CAPES pelo financiamento da pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Penetra surdamente no mundo das
palavras. Lá estão os poemas que
espera ser escritos.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O processo de drenagem dos solos orgânicos pode alterar significativamente a dinâmica da matéria orgânica do solo (MOS), pois promove a oxigenação do meio e acelera a atividade microbiana. As técnicas espectroscópicas ressonância paramagnética eletrônica (RPE), fluorescência induzida a laser (FIL) e absorção no UV-visível foram utilizadas no estudo da humificação da matéria orgânica do solo (MOS), não fracionadas física ou quimicamente. As amostras de solo foram coletadas em área de várzea localizada na cidade Ponta Grossa – PR e submetidas a três diferentes históricos de uso. A saber, reflorestamento – R, drenagem-cultivo e pousio – DCP; drenagem e pousio – DP. Os resultados obtidos apontam diferenças entre o grau de humificação das amostras das áreas drenadas e não drenadas. Os dados indicam que o solo não drenado da área R, tem menor taxa de decomposição nos perfis mais profundos, onde a disponibilidade de O₂ é menor. Nas áreas drenadas, DP e DCP, o grau de humificação da MOS no perfil 0,0 - 0,1 m apresenta-se menos humificado, resultado encontrado por todas as técnicas.

Palavras chave: Fluorescência Induzida a Laser, Ressonância Paramagnética Eletrônica, Substâncias Húmicas.

ABSTRACT

The process of drainage of organic soils can significantly alter the dynamics of soil organic matter (SOM), as it promotes the oxygenation of the medium and accelerates microbial activity. The spectroscopic techniques of electron paramagnetic resonance (EPR), laser induced fluorescence (LIF) and absorption in the UV-Visible were used in the study of humification of soil organic matter (SOM) not physically or chemically fractionated.. Soil samples were collected in a low land area in the city of Ponta Grossa - PR submitted to three different historical uses. They are R: reforestation DCF: drainage, cultivation and fallow; DF: Drain and fallow. The results indicate differences in the degree of humification of samples from drained and non-drained areas. The data suggest that the non-drained soil of the area R has a lower decomposition rate in the deeper profiles where the availability of O₂ is lower. In the drained areas, DF and DCF, the degree of humification of SOM profile at 0.0 - 0.1 m is always less humified, as verified by all the techniques.

Keywords: Laser Induced Fluorescence, Electron Paramagnetic Resonance, Humic Substances.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo em três dimensões para a estrutura dos ácidos húmicos.	22
Figura 2: Modelo supramolecular para as substâncias húmicas.	22
Figura 3 - Espectro eletromagnético e suas respectivas regiões.	28
Figura 4 - Esquema representando a sequência de etapas que conduzem a fluorescência.	29
Figura 5 - Sequência de etapas que levam à fosforescência.	30
Figura 6 - Montagem experimental para realização de análises de fluorescência induzida a laser.	31
Figura 7 – Primeira derivada e sinal de EPR.	33
Figura 8 – Sinal de RPE de amostras de solo com diferentes teores de Fe.	35
Figura 9 - Diagrama com as inúmeras transições eletrônicas possíveis em moléculas orgânicas.	36
Figura 10 – Espectro de absorção na região do ultravioleta e do visível.	38
Figura 11 – Modos de vibração molecular.	39
Figura 12 - Locais de coleta das amostras de solo.	43
Figura 13 - Sinal típico dos radicais livres do tipo semiquinona.	46
Figura 14- Espectro de FTIR da amostra DCP.	50
Figura 15 – Espectros de absorção no infravermelho dos AHs.	51
Figura 16 – Espectro de emissão de fluorescência, obtidos por FIL de três amostras de solo orgânico não fracionadas física ou quimicamente.	53
Figura 17 - Índices de H_{FIL} de amostras de solo de várzea.	56
Figura 18 – Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica de amostras de solo orgânico.	57
Figura 19 – Sinal do radical livre orgânico das amostras de solo não fracionados obtidos por EPR.	58
Figura 20 – Espectros de EPR de amostra de AHs.	60
Figura 21 – Sinal do radical livre semiquinona das amostras de AHs por EPR.	62
Figura 22 - Espectro de absorção de radiação UV e Visível pelas amostras de AHs dos solos de várzea.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura das amostras de solo.	41
Tabela 2 – Espectroscopia por fluorescência de raio-X das amostras de solo inteiro. Valores em porcentagem.	48
Tabela 3 – Espectroscopia por fluorescência de raio-X das amostras de ácido húmico. Valores em porcentagem.	48
Tabela 4 - Principais grupos funcionais de absorção no infravermelho identificados nos espectros FTIR dos AHs.	51
Tabela 5 – Conteúdo de carbono das nove amostras de solo inteiro.	52
Tabela 6 – Índices de humificação – H_{FIL} de amostras de solo orgânico não fracionados física ou quimicamente obtidos por Fluorescência Induzida a Laser.	54
Tabela 7 – Indicadores de humificação da matéria orgânica do solo nas amostras de solo inteiro.	59
Tabela 8 – Indicadores de humificação da fração ácido húmico por ressonância paramagnética eletrônica.	61
Tabela 9 – Índices de humificação E_4/E_6 das amostras de ácidos húmicos de solos de várzea, obtidos por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível.	63

LISTA DE SIGLAS

AF	Ácido Fúlvico
AH	Ácido Húmico
C-13 RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
DCP	Drenado, cultivado e em pousio.
DP	Drenado e em pousio
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FASCA	Grupo de Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais
FIL	Fluorescência Induzida a Laser
FRX	Fluorescência de Raios - X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
HU	Humina
IHSS	International Humic Substance Society
MO	Matéria orgânica
MOS	Matéria orgânica do Solo
R	Área Reflorestamento
RLO	Radical Livre Orgânico
RLS	Radical Livre Semiquinona
SHs	Substâncias Húmicas
SI	Solo Inteiro
SNH	Substâncias Não Húmicas
TFSA	Terra Fina Seca ao Ar
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UV/Vis	Ultravioleta e Visível
G	Gauss
mT	Militesla
h	Constante de Planck

R ₁	Reflorestamento (0 – 10 cm)
R ₂	Reflorestamento (10 – 20 cm)
R ₃	Reflorestamento (20 – 30 cm)
DP ₁	Drenagem e Pousio (0 – 10 cm)
DP ₂	Drenagem e Pousio (10 – 20 cm)
DP ₃	Drenagem e Pousio (20 – 30 cm)
DCP ₁	Drenagem, Cultivo e Pousio (0 – 10 cm)
DCP ₂	Drenagem, Cultivo e Pousio (10 – 20 cm)
DCP ₃	Drenagem, Cultivo e Pousio (20 – 30 cm)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. SOLOS DE VÁRZEA	17
2.2. MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	18
2.3. A ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	20
2.4. GRAU DE HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	23
2.5. TÉCNICAS DE MEDIDA DA HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	24
3. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	27
3.1. ESPECTROSCOPIA	27
3.2. FLUORESCÊNCIA E FOSFORESCÊNCIA.....	28
3.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (FIL).....	31
3.4. FLUORESCÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	32
3.5. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - RPE	32
3.6. ESPECTROSCOPIA NO UV-VISÍVEL.....	35
3.7. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. AMOSTRAS.....	41
4.2. FRACIONAMENTO QUÍMICO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	43
4.3. ANÁLISE ELEMENTAR	44
4.4. FLUORESCÊNCIA INDUZIDA A LASER.....	45
4.5. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	45
4.6. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL.....	46
4.7. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	47

4.8.	FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X – FRX	47
5.	RESULTADOS E DUSCUSSÃO	48
5.1.	FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X	48
5.2.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	49
5.3.	ESTUDO DA HUMIFICAÇÃO DO SOLO INTEIRO	52
5.3.1.	Análise Elementar.....	52
5.3.2.	Fluorescência induzida a laser	53
5.3.3.	Ressonância paramagnética eletrônica – solo inteiro	57
5.4.	ESTUDO DA HUMIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁCIDO HÚMICO	60
5.4.1.	Ressonância paramagnética eletrônica dos ácidos húmicos.....	60
5.4.2.	Espectroscopia no ultravioleta e visível	62
6.	CONCLUSÃO	65
7.	TRABALHOS FUTUROS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

Os solos de várzea são caracterizados pelos elevados teores de umidade e matéria orgânica – MO. Suas características físicas, químicas e biológicas se devem preponderantemente aos fatores orgânicos em detrimento de seus constituintes minerais (EMBRAPA, 2006).

Frequentemente o aproveitamento agrícola destes solos só é possível após o rebaixamento do lençol freático pelo processo de drenagem. Contudo, esta prática na medida em que diminui o teor de umidade no solo, acelera o processo de decomposição da matéria orgânica do solo – MOS provocando alterações em suas características físicas, químicas e biológicas (EBELING et al., 2011).

A extração da água, ao promover a oxigenação do meio, faz com que a atividade microbiana anaeróbica seja substituída por fungos e bactérias aeróbicas. Esses organismos, por sua vez, são decompositores mais eficientes e aumentam em muitas vezes as taxas de decomposição e mineralização (processo onde uma substância orgânica é convertida em uma substância inorgânica) (KALBITZ; GEYER; GEYER, 1999; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; LAIHO, 2006; SIX et al., 2006; EBELING et al., 2011; HELLER; ZEITZ, 2012).

A intensidade das modificações na dinâmica da matéria orgânica do solo podem ser avaliadas analisando-se o grau de humificação da MOS isto é, a matéria orgânica em seu estágio final de decomposição, o que pode ser feito utilizando-se técnicas espectroscópicas tais como: ressonância paramagnética eletrônica – RPE (SAAB; MARTIN-NETO, 2003; ROSA et al., 2005; SAAB; MARTIN-NETO, 2008; BARRIQUELLO et al., 2010; FIALHO et al., 2010; SEGNINI et al., 2010), fluorescência induzida a laser - FIL (MILORI et al., 2006; GONZALEZ-PEREZ et al., 2007b; FAVORETTO et al., 2008; SEGNINI; POSADAS et al., 2010; MARTINS et al., 2011), ressonância magnética nuclear – RMN (SAAB; MARTIN-NETO, 2007), espectroscopias no UV/visível (CHEN; SENESI e SCHNITZER, 1977; KALBITZ et al., 1999; SAAB; MARTIN-NETO, 2007; SEGNINI et al., 2010), análise termogravimétrica (BENITES et al., 2005; MICHEL et al., 2006; KOLOKASSIDOU et al., 2007).

O estudo aprofundado das modificações na dinâmica da MOS pelo processo de drenagem visa fornecer informações que fomentem o debate a respeito do uso

das práticas agrícolas em solos de várzea. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi, utilizando técnicas espectroscópicas, avaliar o grau de humificação da matéria orgânica do solo, de amostras coletadas em área de várzea submetidas a três diferentes históricos de uso. A hipótese deste estudo é que o grau de humificação da MOS em solos de várzea quando alagados (sem drenagem) é menor que os mesmos solos, quando drenados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SOLOS DE VÁRZEA

Os solos orgânicos de várzea são caracterizados pelos elevados teores de umidade e matéria orgânica. Suas características físicas, químicas e biológicas se devem preponderantemente aos fatores orgânicos em detrimento de seus constituintes minerais (EMBRAPA, 2006).

O ambiente saturado por água desses solos favorece a ação de microrganismos anaeróbicos. Estes, por sua vez, utilizam compostos oxidados do solo como receptores de elétrons em seu metabolismo. Assim, nitrato, Mn (IV), Fe (III), sulfato e CO₂ são reduzidos, respectivamente, para N₂, Mn²⁺, Fe²⁺, sulfeto e metano (SOUSA et al., 2009). O nitrato é o primeiro composto do solo a ser reduzido pelos microrganismos anaeróbicos. Nesse processo, denominado desnitrificação, praticamente todo nitrato presente no solo pode ser reduzido a N₂O e N₂, sendo esses perdidos por volatilização (SOUSA et al., 2009).

Em solos alagados, boa parte dos óxidos de Fe³⁺ livres (Fe cristalino e não cristalino) presentes no solo pode ser reduzida para Fe²⁺ rapidamente. A redução do Fe³⁺ para Fe²⁺, bem como o conseqüente aumento da solubilidade do Fe, é a principal alteração química que se processa no solo durante o alagamento. O aumento da concentração de Fe pode ser benéfico para as culturas adaptadas aos ambientes alagados, como o arroz; no entanto, em determinadas concentrações o ferro pode causar toxidez para as plantas (SOUSA et al., 2009).

A drenagem destes solos conduz a um processo chamado subsidência que é a contração natural e perda muitas vezes superior a 50% de seu volume (EBELING et al., 2011). A extração da água também promove a oxigenação do meio, fazendo com que a atividade microbiana anaeróbica seja substituída por fungos e bactérias aeróbicas. Esses organismos, por sua vez, são decompositores mais eficientes e aumentam em muitas vezes as taxas de decomposição e mineralização da matéria orgânica do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002), (SIX et al., 2006). Outro efeito da drenagem de solos alagados é a redução da quantidade de

matéria orgânica, como relatado em (KALBITZ et al., 1999; LAIHO, 2006; EBELING et al., 2011; HELLER; ZEITZ, 2012).

Em trabalho com Organossolos Háplicos de várias regiões do Brasil, Ebeling et al. (2011) estudaram atributos químicos, carbono orgânico e as substâncias húmicas de solos de várzea com diferentes históricos de uso e manejo. Os autores verificaram a redução na capacidade de troca catiônica (CTC) e do teor de carbono nas frações húmicas, de solos drenados, cultivados e (ou) alvos de queimadas, em comparação com solos sem influência antrópica.

Perdas de carbono orgânico na superfície de solos de várzea drenados também são relatadas por Laiho (2006) que revisou a literatura sobre a decomposição em solos alagados e os efeitos do processo de drenagem sobre a dinâmica da matéria orgânica do solo nesses ecossistemas.

As técnicas de ressonância paramagnética eletrônica, fluorescência induzida a laser e análise elementar (C/N, C/H e C/O) foram usadas em por Rosa et al. (2005) para avaliar o grau de humificação das substâncias húmicas de solos alagados e não alagados da Amazônia brasileira. Os índices de humificação obtidos por RPE e FIL apresentaram boa correlação entre si ($R^2 = 0,85$) e indicaram que o grau de humificação da MOS diminui com a profundidade do solo. Os autores constataram também que a concentração de radical livre semiquinona (obtido por RPE) é superior em solos alagados, em comparação a solos não alagados da mesma região. Estes dados indicam a influência da umidade no processo de humificação da MOS.

2.2. MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A matéria orgânica do solo (MOS) é um conjunto de compostos orgânicos resultantes da decomposição de resíduos animais e vegetais depositados no solo. A dinâmica da MOS é governada por fatores físicos, químicos, biológicos e climáticos. A decomposição da MOS, realizada pela ação de fungos, bactérias, minhocas, cupins, entre outros, é o processo pelo qual a matéria orgânica é mineralizada e os nutrientes voltam a ficar disponíveis para as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A MOS é a responsável pelo fornecimento de nutrientes para as plantas e está relacionada a diversos processos do solo, tais como a capacidade de troca catiônica, pH, estabilidade de agregados, porosidade, retenção de água, adsorção de poluentes e pesticidas e sequestro de carbono, (JASTROW, 1996; NARDI et al., 2002; RAWLS et al., 2003).

Devido à alta reatividade química, a MOS atua como agente cimentante na formação de agregados do solo. A agregação do solo, por sua vez, é de suma importância na manutenção da porosidade e aeração do solo, no crescimento das plantas e da população microbiana, na infiltração de água e no controle dos processos erosivos (BASTOS et al., 2005).

A relação entre o conteúdo de carbono e a capacidade de retenção de água foi investigada em Rawls et al. (2003). Segundo os autores, o efeito das alterações no conteúdo de carbono orgânico na retenção de água do solo depende da proporção de componentes de textura do solo e da quantidade de carbono orgânico presente no solo.

De modo geral, a MOS pode ser dividida em substâncias húmicas (SH) e substâncias não-húmicas (SNH).

As substâncias não húmicas são compostos orgânicos incolores, facilmente decomponíveis e de estrutura química bem definida. Por não serem recalcitrantes, as SNH permanecem pouco tempo no solo e são bastante sensíveis ao sistema de manejo. Dentre elas, podemos destacar os polissacarídeos, aminoácidos, carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos, entre outros.

As substâncias húmicas são compostos orgânicos de coloração escura, sem estrutura química definida, recalcitrantes e alto peso molecular (STEVENSON, 1994). As SHs frequentemente são divididas em três grupos: ácido húmico (AH), solúvel em meio alcalino; ácido fúlvico (AF), solúvel em qualquer pH e humina (HU), insolúvel em qualquer pH.

As SHs são importantes em quase todos os campos da ciência do solo, posto que está associada à densidade aparente do solo, capacidade de troca catiônica, agregação do solo, cor e temperatura, capacidade de retenção de água, solubilidade, complexação e quelatização¹.

¹ O nome quelato provém da palavra grega *chele*, que significa garra ou pinça, referindo-se à forma pela qual os íons metálicos são “aprisionados” no composto orgânicos.

A densidade global do solo está relacionada às substâncias húmicas uma vez que as huminas, por sua característica de floculação² das partículas dos solos, aumenta sua porosidade e conseqüentemente diminui sua densidade aparente.

As substâncias húmicas e as argilas são os principais agentes cimentantes do solo. A associação de colóides orgânicos e inorgânicos do solo, forma complexos organo-minerais muito estáveis que favorecem o processo de agregação do solo e sua conseqüente estruturação (MBAGWU; PICCOLO, 1989). As SHs mostram-se mais eficientes que as argilas na formação de agregados com areia (WHITELEY, 1993). Em trabalho com solos do Mediterrâneo de climas árido e semiárido, Piccolo; Pietramellara e Cmbagwu (1997) verificaram que a adição de ácidos húmicos melhorou a estabilidade de agregados em solos degradados.

Em virtude da propriedade coloidal, as SHs são capazes de reter uma quantidade de água muitas vezes maior que a própria massa (PICCOLO; PIETRAMELLARA; MBAGWU, 1996). As substâncias húmicas, formam estruturas bi ou tridimensionais insolúveis com os minerais do solo, evitando a perda de nutrientes por lixiviação em solos arenosos. Os benefícios das substâncias húmicas para o crescimento vegetal também tem sido relatadas na literatura (NARDI et al., 2002).

2.3.A ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A estrutura da matéria orgânica do solo e dos ácidos húmicos têm sido discutida a partir de diferentes pontos de vista, incluindo conformação molecular, agregação molecular, macromolecularidade, características supramoleculares, mobilidade domínio, e muitos outros. A comparação desses modelos apresenta contradições, embora cada ponto de vista forneça informações importantes sobre as propriedades estruturais e funcionais da MOS (SCHAUMANN, 2006; SCHAUMANN; THIELE-BRUHN, 2011). Dentre os mais aceitos pela comunidade científica, podemos destacar os modelos macromolecular e supramolecular (CANELLAS; VELLOSO; SANTOS, 2005).

O modelo macromolecular, um dos mais usados pelos pesquisadores membros da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) foram

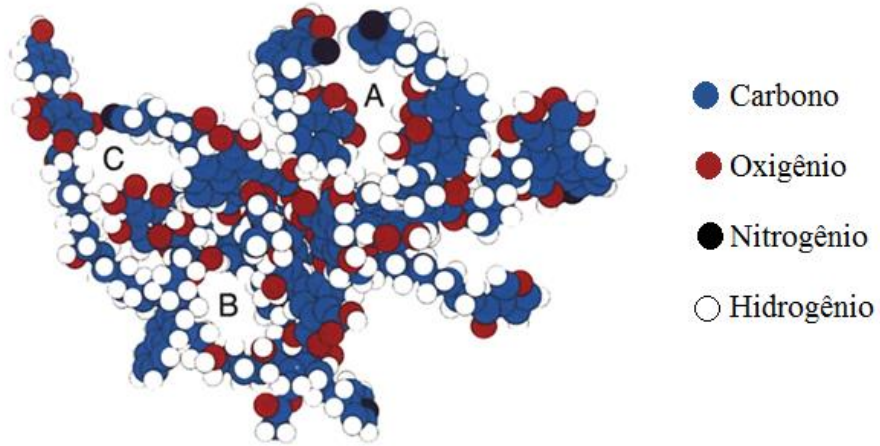
² Floculação é o processo onde coloides saem de suspensão na forma de agregados, formando partículas maiores, ditos "flocos" ou "flóculos".

compiladas em Stevenson (1994). Embora seja amplamente aceito, esse modelo nunca foi demonstrado em termos químicos e físicos obtidos de extratos extraídos do solo (PICCOLO, 2002). Neste modelo as SHs são entendidas como uma estrutura polimérica formadas a partir de três mecanismos: (a) a reação de compostos nitrogenados oriundos da atividade microbiológica com ligninas modificadas; (b) oxidação de polifenóis até quinonas, posteriormente condensados através de reações com compostos aminados; (c) açúcares reduzidos que reagem com compostos aminados evoluindo até macropolímeros de coloração escura e elevada massa molecular (STEVENSON 1994; CANELLAS; VELLOSO e SANTOS, 2005).

A caracterização das substâncias húmicas por ressonância magnética nuclear revelou que, ao contrário do esperado pelo modelo macromolecular, a estruturas das SHs são preponderantemente alifáticas. Baseado nisso e em estudos realizados utilizando outras técnicas, Schulten e Schnitzer (1995) propuseram uma estrutura bidimensional para o AH, chamada modelo biomolecular. Posteriormente, os autores propuseram um modelo tridimensional, onde a estrutura do ácido húmico, mostrada na Figura 1 tem massa molecular de 5539,949 g/mol, composição elementar $C_{308}H_{328}C_{90}N_5$ e análise elementar de 66,78% de C, 5,97% de H, 25,99% de O e 1,26% de N.

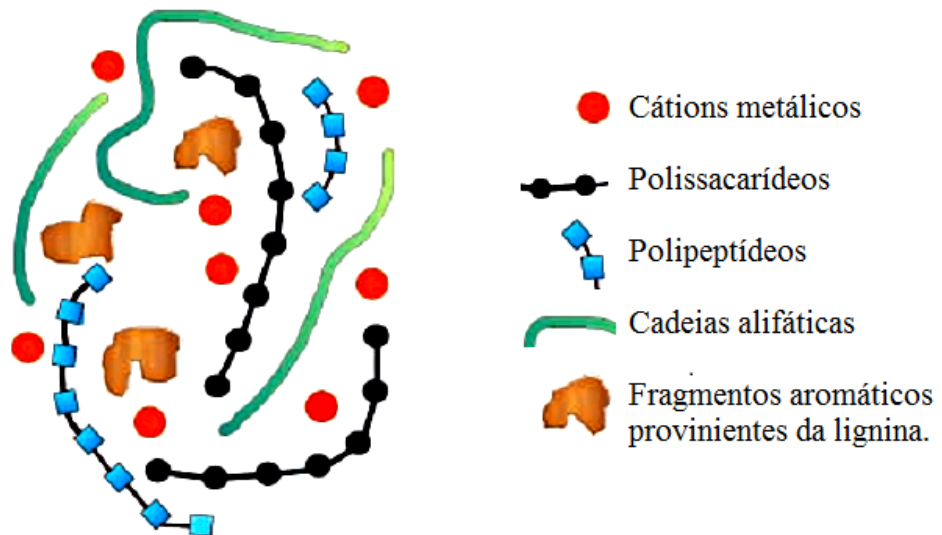
Outro ponto de vista sobre a estrutura das substâncias húmicas é apresentado em Piccolo, (2001). Neste modelo, denominado supramolecular, as SHs são entendidas não como macromoléculas, mas sim como o produto da auto-organização de pequenas moléculas heterogêneas, unidas por ligações intermoleculares fracas, aparentando grande tamanho molecular. O modelo supramolecular está representado na Figura 2.

Figura 1 - Modelo em três dimensões para a estrutura dos ácidos húmicos (SCHULTEN; SCHNITZER, 1995). Na estrutura os espaços vazios estão apresentados em A, B e C.



Fonte: (SCHULTEN; SCHNITZER, 1995).

Figura 2: Modelo supramolecular para as substâncias húmicas.



Fonte: adaptado de (SIMPSON et al., 2002)

2.4. GRAU DE HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A humificação é o processo pelo qual a biomassa, constituída pelos restos animais e vegetais depositados no solo, é convertida em húmus no processo de decomposição (STEVENSON, 1994).

A decomposição da MOS envolve processos distintos e simultâneos que podem ser resumidos em quatro etapas: (I) macromoléculas são atacadas pelas enzimas extracelulares de origem microbiana, produzindo moléculas menores, que são absorvidas e consumidas pelas células microbianas; (II) Os monômeros e oligômeros, presentes no material em decomposição, são rapidamente consumidos, transformados em biomassa, CO₂ e energia; (III) Como resultado da proliferação microbiana, o carbono e nutrientes do material são transformados em novas moléculas, como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos, quinina e outros; (IV) Finalmente, restos celulares e metabólitos microbianos, subprodutos da decomposição e complexos organo-minerais acumulam-se na MOS como moléculas quimicamente estáveis, formando o húmus do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

O grau de humificação da matéria orgânica do solo tem sido avaliado por diversas técnicas tais como: ressonância paramagnética eletrônica (RPE)(SAAB; MARTIN-NETO, 2003; ROSA et al., 2005; SAAB; MARTIN-NETO, 2008; BARRIQUELLO et al., 2010; FIALHO et al., 2010; SEGNINI et al., 2010), fluorescência induzida a laser (FIL), (MILORI et al., 2006; GONZALEZ-PEREZ et al., 2007b; FAVORETTO et al., 2008; SEGNINI et al., 2010; MARTINS et al., 2011), ressonância magnética nuclear (RMN) (SAAB; MARTIN-NETO, 2007), espectroscopias no UV/visível (UV- Visível) (CHEN et al., 1977; KALBITZ et al., 1999; SAAB; MARTIN-NETO, 2007; SEGNINI; POSADAS et al., 2010), análise termogravimétrica (BENITES et al., 2005; MICHEL et al., 2006; KOLOKASSIDOU et al., 2007). Alguns resultados do grau de humificação da MOS obtidos na literatura estão descritos no próximo item.

2.5. TÉCNICAS DE MEDIDA DA HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica foi usada por Saab e Martin-Neto (2003) para a análise da estabilidade térmica de alguns compostos organo-minerais encontrados em um Gleissolo. Os autores observaram o desaparecimento completo do sinal do radical livre semiquinona (RLS) em torno de $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a fração física do solo $< 2\text{ }\mu\text{m}$, e um sinal residual do RLS para as frações $2 - 20\text{ }\mu\text{m}$ e $20 - 53\text{ }\mu\text{m}$ na mesma temperatura. Além disso, os autores mostraram que a fração de $2 - 20\text{ }\mu\text{m}$ teve uma maior concentração de radicais livres semiquinona por grama de carbono e menor largura de linha, que indica uma maior humificação desta fração.

O grau de humificação das substâncias húmicas (SHs) extraídas de seis diferentes solos da Amazônia, coletados de regiões alagadas e não inundadas em diferentes profundidades foi determinado por Rosa et al. (2005). Os ácidos húmicos foram caracterizados utilizando diversas técnicas, incluindo espectroscopia de RPE. Os autores obtiveram concentrações de RLS variando entre $0,10 - 7,55 \times 10^{18}$ spins por grama de carbono, que indica diferenças significativas entre os níveis de humificação da SH extraídas de solos da Amazônia. Ainda segundo os autores, os perfis $10 - 20\text{ cm}$ e $0 - 10\text{ cm}$ mostraram geralmente mais humificados.

O grau de humificação das frações físicas de um Gleissolo foi estudado por Saab e Martin-Neto (2008). Segundo os autores, devido ao alto teor de carbono e baixa concentração de íons Fe^{3+} , foi possível detectar e quantificar os radicais livres semiquinona das amostras de solo inteiro e de suas frações físicas, sem a necessidade do fracionamento químico.

A técnica de RPE foi usada por Fialho et al. (2010) para o monitoramento da decomposição da matéria orgânica durante o processo de compostagem. Observou-se que a lignina é a principal fonte de radicais livres semiquinona. Os autores constataram que a técnica de RPE não é a mais indicada no estudo de materiais com elevado teor de lignina.

Milori et al. (2006) utilizaram a técnica de fluorescência induzida a laser para medir o grau de humificação da MOS de amostras de solo inteiro. Neste trabalho os índices de humificação obtidos para o solo não fracionado apresentaram boa

correlação com os índices A(4)/A(1), e I-465/I-399 A(465) obtidos por FIL para amostras de ácidos húmicos dissolvidos. Deste modo, a técnica mostrou-se promissora para o estudo da humificação em amostras de solo inteiro, particularmente nos Latossolos, na qual, devido à alta concentração de Fe^{3+} , não é possível o uso das técnicas RPE e C-13 RMN.

Gonzalez-Perez *et al.* (2007a) avaliaram o grau de humificação da matéria orgânica de amostras de solo inteiro por fluorescência induzida a laser (H_{FIL}). Os autores compararam os índices de humificação H_{FIL} com o grau de humificação obtido por RPE e C-13 RMN para amostras de AHs. Verificou-se forte correlação entre os índices H_{FIL} e a concentração de radicais livres semiquinona (RLS) obtidos por RPE ($R^2 = 0,94$), bem como com a humificação por RMN ($R^2 = 0,97$). As altas correlações com os resultados obtidos por técnicas mais convencionais confirmam o potencial de fluorescência induzida a laser no estudo da humificação da MOS de amostras não fracionadas.

Em trabalho com Latossolos submetidos a diferentes sistemas de manejo, Favoretto *et al.* (2008) utilizaram a técnica de fluorescência induzida a laser para avaliar a humificação da matéria orgânica de solos inteiros, bem como das frações físicas obtidas através do tamanho de partícula deste solo, relacionando os resultados obtidos com a profundidade e os sistemas de manejo. Os autores verificaram que a superfície dos solos sob plantio direto, de 0 a 20 cm, apresenta a menor humificação quando comparado aos solos superficiais do preparo convencional e do preparo mínimo e que nos três sistemas de manejo, a humificação aumenta com a profundidade. Com relação à análise das frações físicas do solo, os resultados indicaram maior humificação na fração areia fina (20-53 μm) e menor na fração argila (<2 μm), em todos os sistemas de manejo, sugerindo que nesta fração a interação da matéria orgânica com a fração mineral seja o fator determinante para a sua estabilidade e não a sua aromaticidade.

Em estudo com solos de várzea, Segnini *et al.* (2010) utilizaram as técnicas FIL e RPE para avaliar a estabilidade da matéria orgânica do solo. Os resultados obtidos por ambas as técnicas, obtiveram boa correlação ($R^2 = 0,88$), e revelaram-se os indicadores de confiança. Os autores verificaram que a humificação das áreas permanentemente inundadas foram menores do que para as sazonalmente inundadas devido à anaerobiose.

Em estudo com um Latossolo Vermelho sob diferentes sistemas de manejo, Martins et al. (2011) usaram a relação C/N e espectroscopia de fluorescência induzida por laser para determinar a humificação da MOS. Os autores verificaram menor humificação no solo sob sistema de plantio direto, principalmente na superfície. Além disso, a argila foi a fração do solo que apresentou o menor índice de humificação. Foi constatada boa correlação a humificação obtidas pelos índices FIL e relação C/N ($0,77 < R^2 < 0,92$).

Saab e Martin-Neto (2007) avaliaram a humificação da MOS de um Gleissolo por RMN de ^{13}C obtidos pelas técnicas de polarização cruzada e ângulo mágico (CP/MAS) e desacoplamento defasado (DD), bem como por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e espectroscopia no UV/Visível (relação E_4/E_6). Os autores obtiveram boa correlação entre os índices E_4/E_6 e quantidade de anéis aromáticos condensados, determinados por CP/MAS ^{13}C juntamente com a técnica de desacoplamento defasado ($R^2 = 0,94$). Segundo os mesmos, a explicação para a diferença está no fato que a razão E_4/E_6 está associada aos grupos aromáticos condensados e não com a aromaticidade total das amostras. Coerentemente a concentração de radicais livres semiquinona, obtida por RPE, também se correlacionou melhor com o grau de anéis aromáticos obtido pela técnica de RMN usando DD ($R^2 = 0,62$).

Chen; Senesi e Schnitzer (1977) mostraram que a relação E_4/E_6 de AHs e AFs são governadas essencialmente pelo tamanho de partícula ou peso molecular, podendo assim, ser associado ao grau de humificação da MOS. Segundo os autores, os valores ótimos de E_4/E_6 são obtidos em solução NaCO_3 0,05 mol/L, com pH entre 7 e 8 em concentrações de AHs ou AFs entre 200 e 400 ppm.

Benites et al. (2005) estudaram as propriedades termogravimétricas de quarenta amostras de ácidos húmicos extraídos de solos com diferentes características. A estabilidade térmica dos AHs, definida através do índice termogravimétrico (TGI), variou entre $2,04 \pm 0,41$ e $2,8 \pm 0,33$. Os teores de cinzas dos AHs variaram entre 0,7 e 4,4%. Verificou-se também forte correlação entre o índice TGI e a absorção em 465 nm, bem como com razão H/C.

3. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Neste capítulo serão brevemente descritas as principais técnicas espectroscópicas usadas em estudos de humificação da matéria orgânica do solo. A saber: fluorescência induzida a laser (FIL), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), espectroscopia de absorção no ultravioleta e no visível e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

3.1. ESPECTROSCOPIA

Espectroscopia é a denominação atribuída a toda técnica de obtenção de características físico-químicas da matéria pela absorção, transmissão ou espalhamento de radiação.

A interação da radiação com a matéria depende das propriedades ondulatórias. A relação entre o comprimento de onda (λ), a frequência (f) e a velocidade (v) de uma onda eletromagnética é

$$v = \lambda f$$

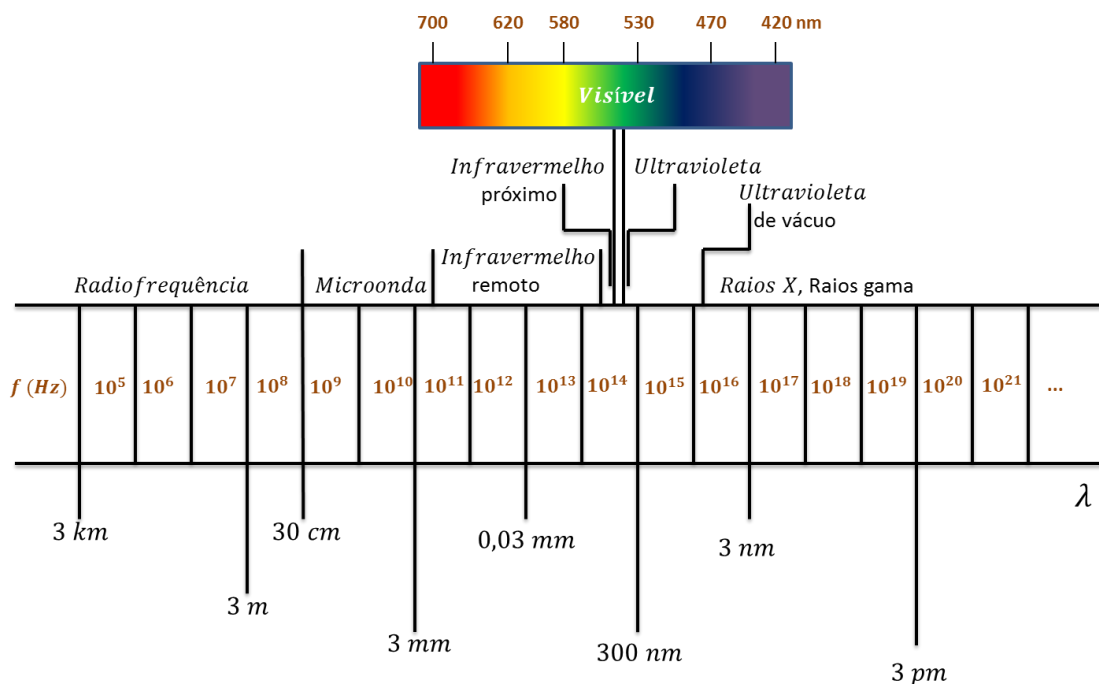
Por outro lado, a energia (E) de um fóton é proporcional a f , de modo que

$$E = hf = \frac{hc}{\lambda} = \lambda^{-1}hc$$

O termo λ^{-1} é número de onda e h a constante de Planck. No Sistema Internacional de Unidades, $h = 6,62 \times 10^{-34} J$.

O espectro eletromagnético é convenientemente dividido em várias regiões, como mostrado na Figura 3. Os limites dessas regiões são determinados pelos limites práticos dos métodos experimentais de produção e detecção das regiões. Em espectroscopia, a essas regiões adquirem significado adicional, posto que as interações com a matéria seguem diferentes mecanismos e fornecem diferentes tipos de informação.

Figura 3 - Espectro eletromagnético e suas respectivas regiões.



Fonte: Adaptado de Atkins (2003).

3.2. FLUORESCÊNCIA E FOSFORESCÊNCIA

A fluorescência é o fenômeno da emissão de fótons, por um intervalo de tempo muito curto (10^{-8} s) e num comprimento de onda característico, devido à absorção de energia pelo sistema. Essa energia é da ordem de apenas alguns eV, portanto o fóton absorvido ou emitido pertence a uma região do espectro eletromagnético que se estende do ultravioleta ao visível.

Quando um fóton é absorvido por um sistema de átomos ou moléculas, sua energia, $E = hf$ pode provocar uma transição eletrônica, onde um elétron passa do estado fundamental para outro mais energético. Para que o elétron volte ao estado fundamental, a energia deve ser dissipada, o que normalmente ocorre pela transformação excedente em energia em energia térmica ou pela emissão de um fóton.

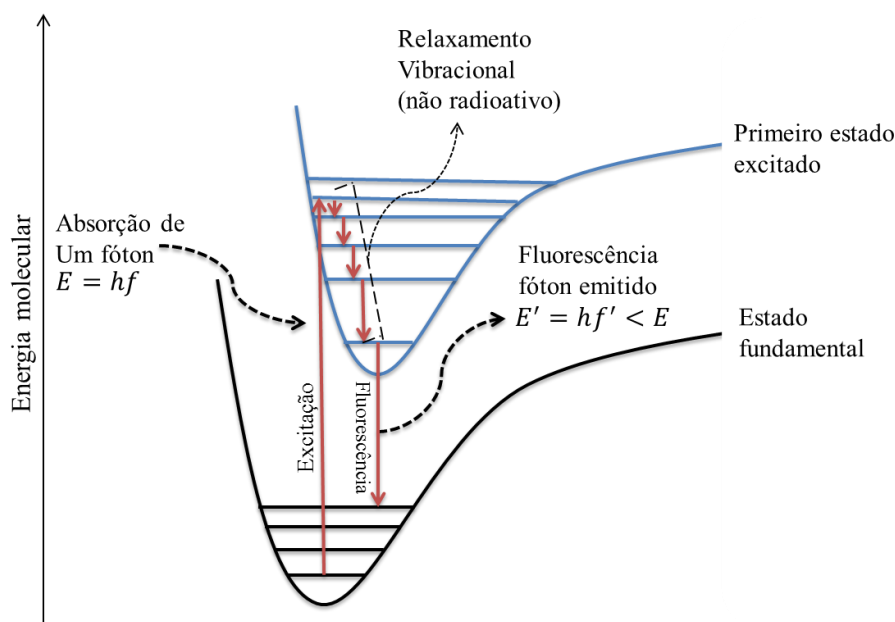
Quando ocorre uma transição eletrônica, a densidade de carga diminui rapidamente em uma região da molécula e aumenta em outras. Conseqüentemente, os núcleos atômicos, submetidos às forças Coulombianas da nova configuração

eletrônica, põe-se a vibrar, dissipando parte da energia da transição. Logo, surge no espectro, além da banda referente a transição eletrônica, uma série de bandas que se sobrepõem e se formando uma banda vibracional não resolvida.

A fluorescência ocorre quando parte da energia da transição eletrônica é descartada pelo sistema através da emissão de um fóton. A energia dos fótons, absorvido e emitido, são iguais e se diz que a fluorescência foi ressonante.

A Figura 4 esquematiza a sequência de etapas que conduzem a fluorescência. Após a absorção inicial, os estados vibracionais superiores sofrem decaimento não radioativo - o processo de relaxamento vibracional, fornecendo energia para a vizinhança. Então ocorre uma transição radioativa a partir do estado vibracional fundamental do estado superior. Na prática, a separação entre os estados vibracionais fundamentais dos estados eletrônicos é dez a cem vezes maior que a separação entre os níveis vibracionais (ATKINS, 2003).

Figura 4 - Esquema representando a sequência de etapas que conduzem a fluorescência.



Fonte: Adaptada de Novotny (2002) e de Atkins (2003).

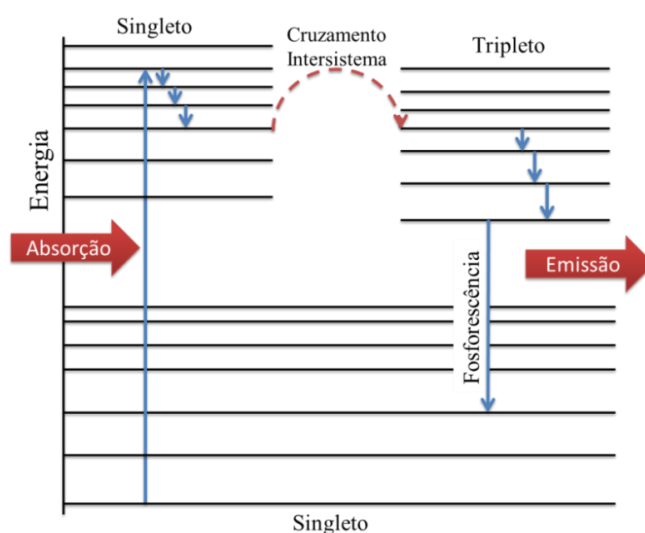
Pelo princípio de Pauli, no estado fundamental, elétrons que compartilham o mesmo orbital têm spins emparelhados ($\uparrow\downarrow$) de modo que o momento angular líquido é nulo ($S = -1/2 + 1/2 = 0$). A multiplicidade do estado é $m = |S| + 1 = 0 + 1 = 1$.

Quando elétrons estão em orbitais diferentes seus spins são paralelos, de modo que o spin total é $S = 1/2 + 1/2 = 1$, ou $S = -\frac{1}{2} + \left(-\frac{1}{2}\right) = -1$, cuja multiplicidade é $m = |2 \cdot (\pm 1)| + 1 = 3$. Estados com multiplicidade 1 ou 3 são denominados como singletos e tripletos, respectivamente.

Se houver um cruzamento intersistema (passagem entre estados de diferentes multiplicidades), o estado singleto pode ser convertido triplete se os spins forem desemparelhados (a configuração $\uparrow\downarrow$ é convertida em $\uparrow\uparrow$). Depois que uma molécula singleto excitada passa para um estado triplete, continua a liberar energia para as vizinhanças e a descer a escada dos estados vibracionais. Agora, porém a molécula não consegue emitir energia por radiação, pois a volta para o estado fundamental é proibida: um estado triplete não pode se converter para um estado singleto, porque o spin de um elétron não pode reverter sua direção relativamente ao outro elétron durante a transição. No entanto, a transição radioativa não é totalmente proibida porque o acoplamento spin órbita responsável pelo cruzamento intersistema também quebra essa regra. As moléculas são então capazes de emitir radiação com baixa intensidade por muito tempo depois que o estado excitado foi formado.

A Figura 5 mostra a sequência de etapas que leva a fosforescência. A etapa importante é o cruzamento intersistema a partir de um estado singleto excitado para um estado triplete excitado. O estado triplete age como um reservatório de energia de energia Atkins (2003).

Figura 5 - Sequência de etapas que levam à fosforescência.

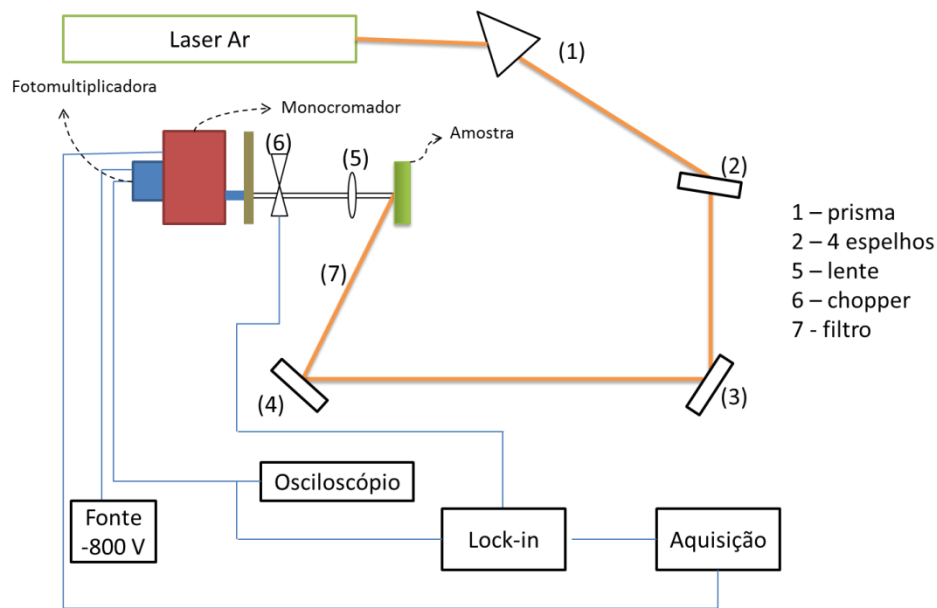


Fonte: Adaptado de Atkins (2003).

3.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (FIL)

A Figura 6 mostra o esquema básico do usado nas análises de FIL usando o laser de Ar como fonte de excitação.

Figura 6 - Montagem experimental para realização de análises de fluorescência induzida a laser.



Fonte: Adaptado de Abreu Junior et al. (2009).

A radiação emitida pelo laser passa pelo prisma para separar emissão laser da fluorescência de fundo do gás e permitir maior controle da excitação da amostra. O sinal de fluorescência é então coletado pela lente que o focaliza sobre a fenda do monocromador. A excitação espalhada pela superfície da amostra é eliminada pelo filtro e o chopper serve para modular a luz numa frequência definida que serve de referência para o amplificador lock-in. Um sistema de aquisição controla o passo do monocromador e a leitura do lock-in gerando o espectro de emissão da amostra.

3.4. FLUORESCÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Segundo Senesi (1990) a fluorescência é altamente provável em grupos funcionais das substâncias húmicas que possuem pares solitários de elétrons, tais como: $C=O$, anéis aromáticos, fenólicos, quinonas e, anéis e (ou) sistemas alifáticos conjugados insaturados mais rígidos. Nestes grupos, a intensidade e o comprimento da fluorescência dependem fortemente da extensão de sistemas eletrônicos π , do nível de substituição heteroatômica, do tipo e do número de grupos substituintes sobre os anéis aromáticos (ABREU JUNIOR; MARTIN NETO et al., 2009)

3.5. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - RPE

A técnica de RPE é baseada transição eletrônica de elétrons desemparelhados de um átomo, molécula ou íon. Tal fenômeno pode ocorrer quando o átomo estiver submetido a um campo magnético intenso, gerando a separação dos seus níveis de energia degenerados. Este fenômeno, denominado efeito Zeeman (ATKINS, 2003).

A energia de separação entre os níveis de energia pode ser calculada pela equação:

$$\Delta E = g\beta H$$

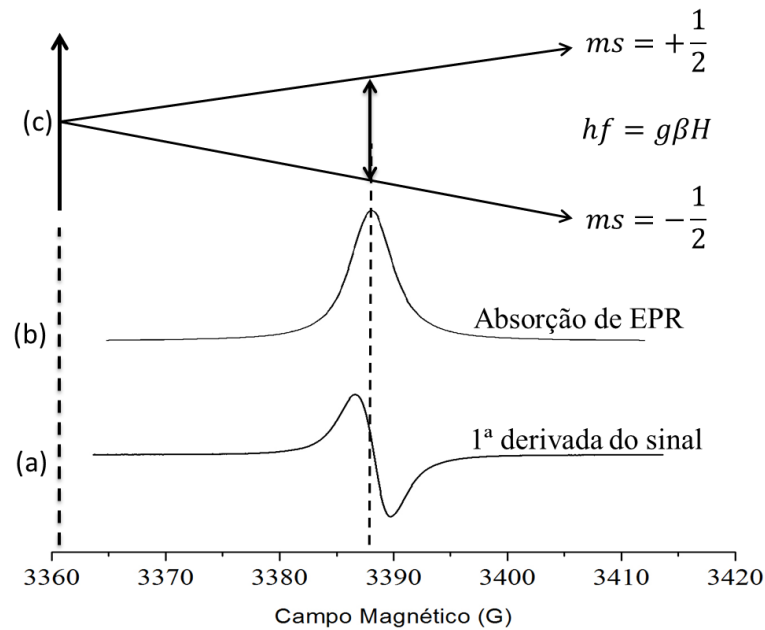
Onde g é o fator giromagnético do elétron (para um elétron livre, $g = 2,00232$), β é o magnéton de Bohr e H é a intensidade do campo magnético externo sobre o material.

O sinal de RPE resulta da absorção de energia de uma onda eletromagnética incidente (com frequência entre 10^9 e 10^{12} Hz) a qual induz a transição de uma molécula de um estado de menor energia para um de maior energia. Para que a transição ocorra, varia-se a intensidade do campo magnético até que haja ressonância.

Na Figura 7, em (a) mostra a primeira derivada do sinal de RPE e este, por sua vez é mostrado em (b). Em (c) separação dos níveis de energia causada pelo

campo magnético H e a transição eletrônica causada pela radiação incidente (FIALHO, 2007).

Figura 7 – Primeira derivada e sinal de EPR. Em (a) a primeira derivada do sinal de RPE; em (b) o sinal registrado pelo equipamento de RPE para a absorção da radiação incidente; em (c) a separação dos níveis de energia causada pelo campo magnético H e a transição eletrônica causada pela radiação incidente (FIALHO, 2007).



Fonte: O Autor

Quando satisfeita a condição de ressonância, ou seja, quando $hf = g\beta H$, as transições eletrônicas em ambos os sentidos são equiprováveis, de modo que a detecção da absorção é uma função da diferença de população entre os níveis de energia up e down, são dados pela distribuição de Boltzmann. Assim, se existem N^+ elétrons com energia E^+ e N^- elétrons com energia E^- , tem-se

$$\frac{N^+}{N^-} = e^{\Delta E/K_B T}$$

Sendo $K_B = 1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ a constante de Boltzmann e $T \approx 300\text{K}$, temos $\Delta E/K_B T \approx 0,001$ e podemos expandir a expressão de modo que:

$$\frac{N^+}{N^-} \approx 1 - \frac{\Delta E}{K_B T}$$

Para $f \approx 10^{10} \text{ Hz}$ e $T \approx 300 \text{ K}$, tem-se

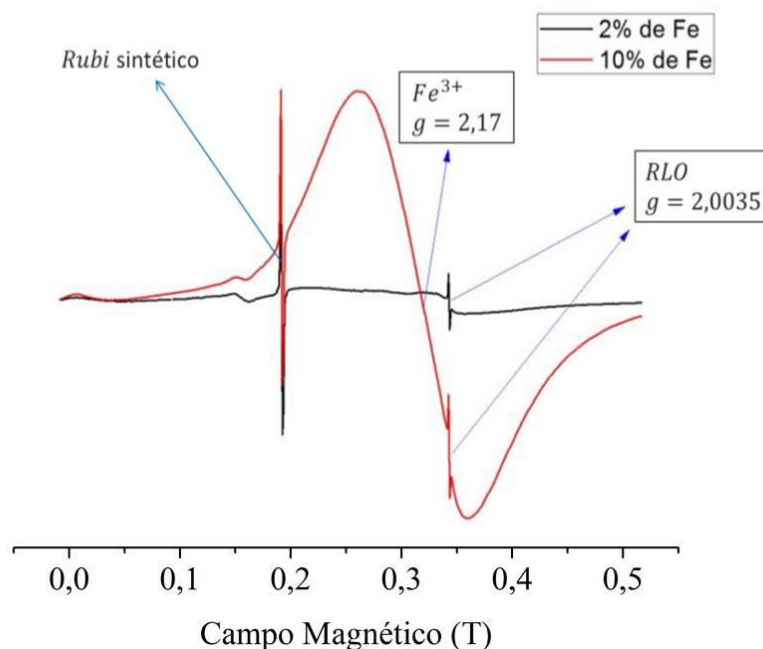
$$\frac{N^+}{N^-} \approx 1 - \frac{6,6 \times 10^{-24}}{4,1 \times 10^{-21}} = 0,9984$$

Portando, a diferença entre as populações com energia E^+ e E^- é muito pequena, que dificulta a detecção do sinal. Por este motivo, a técnica é capaz de detectar apenas concentrações de spins superiores a 10^{11} spins/g . Dentro dessas condições, com a técnica de RPE é possível obter informações sobre a concentração de elementos paramagnéticos, bem como seu estado de valência e simetria. Em alguns casos pode-se determinar os átomos ligantes de íons metálicos, além de localizar e identificar radicais livres (NOVOTNY; MARTIN-NETO, 2002; SAAB; MARTIN-NETO, 2008).

Na fração húmica da MOS os radicais livres são representados principalmente por semiquinonas, cuja concentração na amostra pode ser determinada por RPE multiplicando a intensidade (I) do sinal de RPE pela largura de linha do sinal de RPE ΔH elevada ao quadrado, ou seja, $I \times \Delta H^2$, em comparação com aos dados de um padrão secundário de AH com concentração de spins conhecida e um rubi sintético.

O estudo da MOS por RPE só é possível em amostras de solo fracionadas quimicamente, ou em solos orgânicos, posto que o sinal do radical livre é facilmente sobreposto na presença de íons paramagnéticos, em especial o Fe^{3+} . A Figura 8 mostra o sinal de RPE de duas amostras com diferentes teores de Fe, com destaque para os sinais do radical livre semiquinona e do íon Fe^{3+} .

Figura 8 – Sinal de RPE de amostras de solo com diferentes teores de Fe. Em destaque os sinais do íon Fe^{3+} e do radical livre orgânico (RLO).



Fonte: O autor.

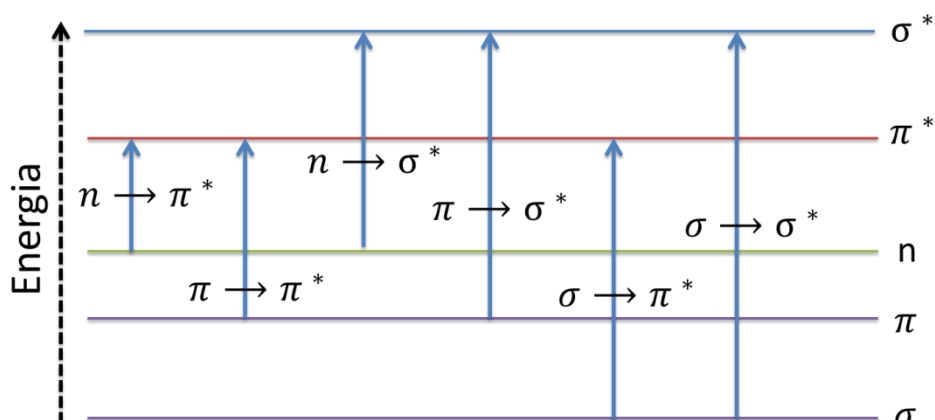
3.6. ESPECTROSCOPIA NO UV-VISÍVEL

A energia da radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 200 – 400 nm (UV) e 400 – 800 nm (luz visível) promove transições eletrônicas entre estados ligantes (σ e π) e os não ligantes (n) do estado fundamental para os estados excitados antiligantes (σ^* e π^*), conforme Figura 9.

As bandas de absorção associadas a transições eletrônicas deveriam ser bem definidas, uma vez que a energia de transição é quantizada, contudo, a radiação na região do UV-Vis provoca também mudanças nos estados vibracionais da molécula que alargam as bandas formando bandas de absorção (ATKINS, 2003).

Na Figura 9 estão esquematizadas as transições eletrônicas possíveis em moléculas orgânicas.

Figura 9 - Diagrama com as inúmeras transições eletrônicas possíveis em moléculas orgânicas.



Fonte: Adaptado de Fialho (2007).

A informação física de interesse na técnica de espectroscopia UV-Vis está contida na posição e na intensidade da banda de absorção. A posição de absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para que ocorra a transição eletrônica. A intensidade, por sua vez é proporcional à probabilidade de ocorrência da transição e à concentração da molécula em estudo (SILVERSTEIN; BASSLER, 1994; FIALHO, 2007).

Segundo Chen et al. (1977) a absorção no UV-Vis depende do pH, do tipo de solvente e da concentração salina do meio. Recomenda-se manter o pH entre 7 e 8.

O comprimento de onda da absorção de luz UV-Visível para compostos orgânicos aumenta com o aumento da condensação dos anéis aromáticos. Esse aumento pode ser entendido considerando-se a molécula como um poço quadrado infinito de lado L .

Pela equação de Schroedinger as energias permitidas no poço quadrado infinito são dadas por

$$E = \left(\frac{h^2}{8mL^2} \right) n^2$$

Onde n é o número quântico principal, m é a massa do elétron L é o tamanho do poço e h a constante de Plank. Sendo $\Delta E = E - E_0$ a energia de separação entre dois orbitais. Ao absorver um foton de energia ΔE , o elétron passa do orbital de energia E_0 para o de energia E . Portanto:

$$\Delta E = \left(\frac{h^2}{8mL^2} \right) (n^2 - n_0^2).$$

Como a energia do fóton absorvida é dada por $E = \frac{hc}{\lambda}$, então:

$$\lambda = \left(\frac{8cm}{h(n^2 - n_0^2)} \right) \cdot L^2$$

Ou seja,

$$\lambda \propto L^2$$

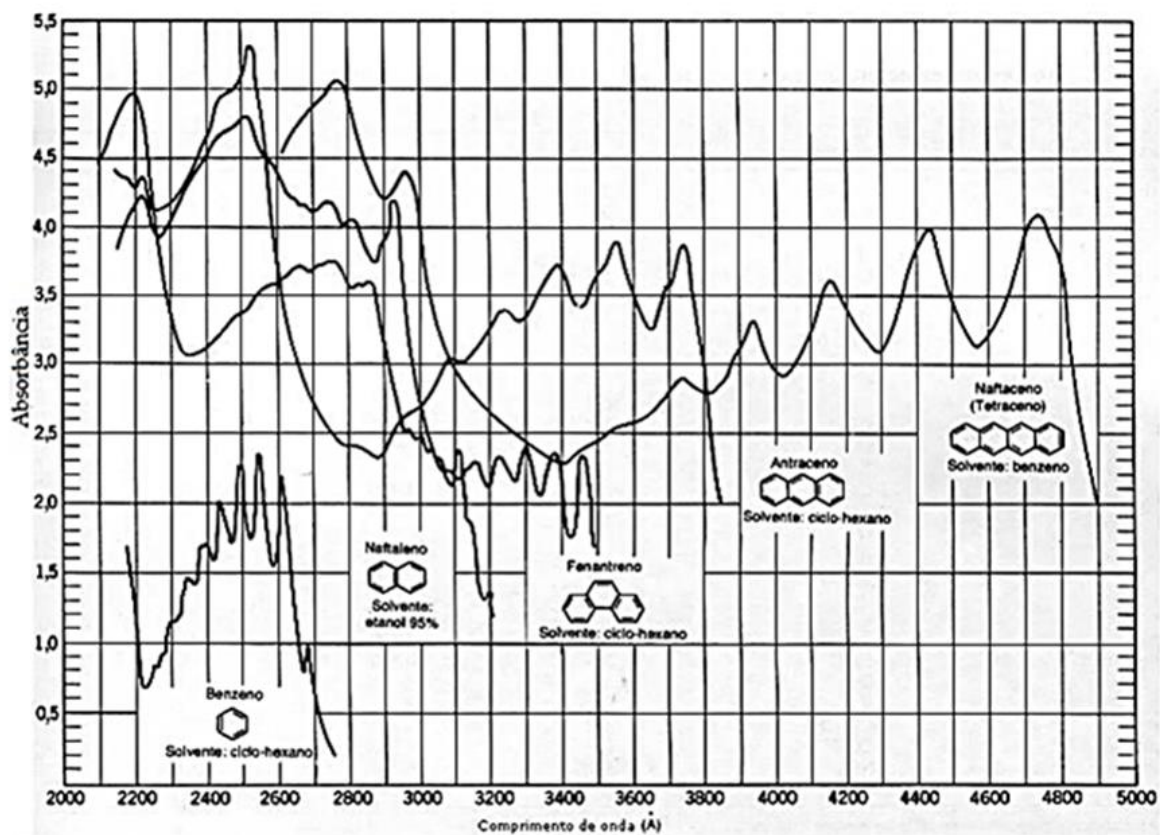
O comprimento de onda absorvido é proporcional ao tamanho do poço (molécula).

Considerando que a complexidade e o tamanho das moléculas das substâncias húmicas aumenta com o grau de decomposição da MOS, utiliza-se a razão E_4/E_6 entre a absorção em 465 nm (E_4) e em 665 nm (E_6) como um índice de humificação da MOS. Assim, valores altos de E_4/E_6 indicam presença de mais estruturas alifáticas, enquanto valores baixos indicam alto grau de condensação dos anéis aromáticos. Em suma:

$$\frac{E_4}{E_6} \downarrow \leftrightarrow \uparrow \text{ Humificação}$$

A Figura 10 mostra um exemplo de espectro de absorção no UV-Visível de diversas moléculas orgânicas, obtido por Silverstein; Bassler e Morril (1994).

Figura 10 – Espectro de absorção na região do ultravioleta e do visível.



Fonte: Adaptado de Silverstein; Bassler e Morrill (1994) .

Na Figura 10 o sinal atribuído as moléculas orgânicas se desloca em direção a maiores comprimentos de onda à medida que as os anéis aromáticos encontram-se mais condensados.

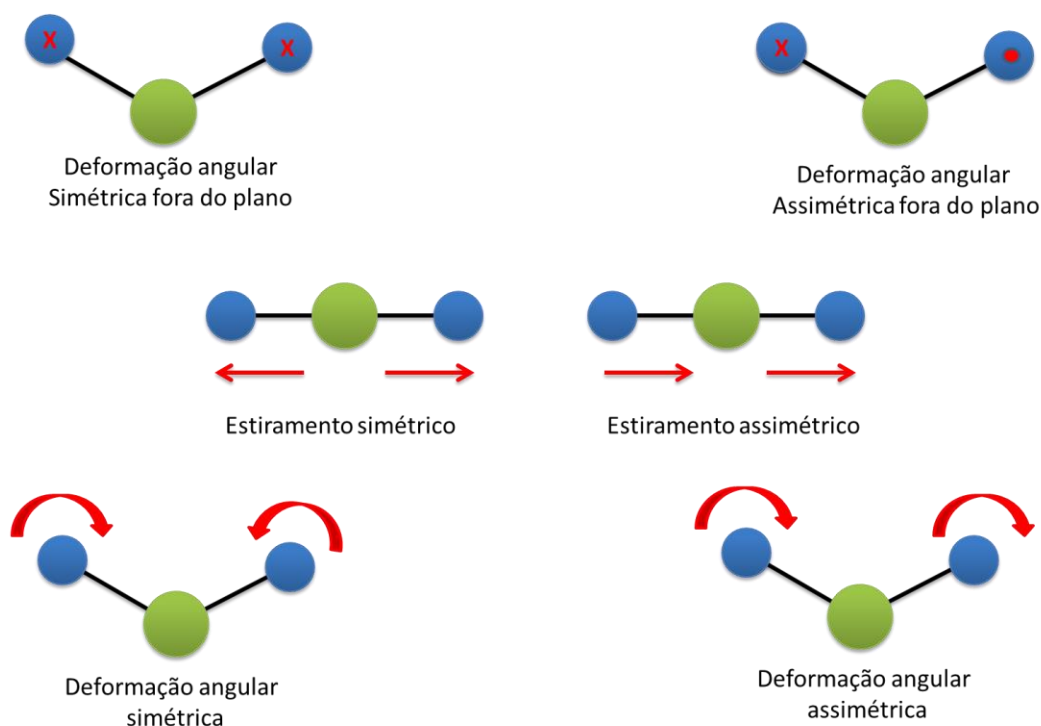
3.7. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), assim como a espectroscopia UV-Visível, é um tipo de espectroscopia de absorção, mas que usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Ao contrário da radiação da região do ultravioleta e do visível, a radiação no infravermelho não provoca transições eletrônicas na amostra e sim produz alterações em seus modos vibracionais.

Como as demais técnicas espectroscópicas, a técnica de FTIR pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. A técnica baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico (SILVERSTEIN; BASSLER, 1994; ATKINS, 2003; FIALHO, 2007).

As vibrações moleculares, representados na Figura 11, podem ser de formações axiais (estiramento) ou angulares. Os modos de vibração possíveis são: estiramento simétrico, estiramento assimétrico, estiramento angular simétrico, estiramento angular assimétrico, estiramento angular fora do plano simétrico, estiramento angular fora do plano assimétrico.

Figura 11 – Modos de vibração molecular. Os sinais (X) e (·) indicam movimentos para dentro e para fora do plano do desenho, respectivamente.



Fonte: O autor

Como a energia dos níveis vibracionais é quantizada, quando um fóton de energia igual à diferença entre dois níveis atinge a amostra, é absorvido, gerando um sinal de absorção no espectro. Contudo, devido à complexidade das amostras, a sobreposição de picos associados a cada estado vibracional resulta na formação de bandas de absorção que podem indicar diferentes grupos funcionais presentes na amostra.

Deste modo, os resultados obtidos pela técnica de FTIR devem ser correlacionados e comparados com os obtidos por outras técnicas para que possa fornecer informações mais precisas sobre a amostra.

Os grupos funcionais da matéria orgânica, bem como os minerais associados às bandas de absorção encontram-se descritos na literatura (FARMER, 1974; GADSDEN, 1975; DIXON, 1989).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

Os solos estudados neste trabalho são provenientes de uma área de várzea localizada na Estação Experimental do Instituto de Agrônomo do Paraná localizado na cidade de Ponta Grossa – PR. As amostras, coletadas em triplicata, foram divididas em três grupos conforme o histórico de uso do solo. A saber, R: reflorestamento, DCP: drenagem-cultivo e pousio; DP: drenagem e pousio. As profundidades de coleta foram: 0 – 10 cm, 10 – 20 cm e 20 – 30 cm. A Tabela 1 mostra a nomenclatura das amostras estudadas nesse trabalho.

Tabela 1 – Nomenclatura das amostras de solo.

Amostra	Área de Coleta	Profundidade
R ₁	Reflorestamento	0 – 10 cm
R ₂	Reflorestamento	10 – 20 cm
R ₃	Reflorestamento	20 – 30 cm
DP ₁	Drenagem e pousio	0 – 10 cm
DP ₂	Drenagem e pousio	10 – 20 cm
DP ₃	Drenagem e pousio	20 – 30 cm
DCP ₁	Drenagem, cultivo e pousio	0 – 10 cm
DCP ₂	Drenagem, cultivo e pousio	10 – 20 cm
DCP ₃	Drenagem, cultivo e pousio	20 – 30 cm

Fonte: O autor.

A área de reflorestamento (R), não havia sido cultivada até o ano de 1987, quando nela foram plantados eucaliptos. Esta área, nunca cultivada com espécies anuais, foi alvo de queimadas clandestinas inúmeras vezes, por se encontrar no meio do percurso dos pescadores de um rio próximo da região.

A área DP, drenagem e pousio, foi drenada no ano de 1978, através da implantação dos drenos principais e secundários, modelo espinha de peixe. As valetas mestras foram abertas com trator retroescavadeira, enquanto que as

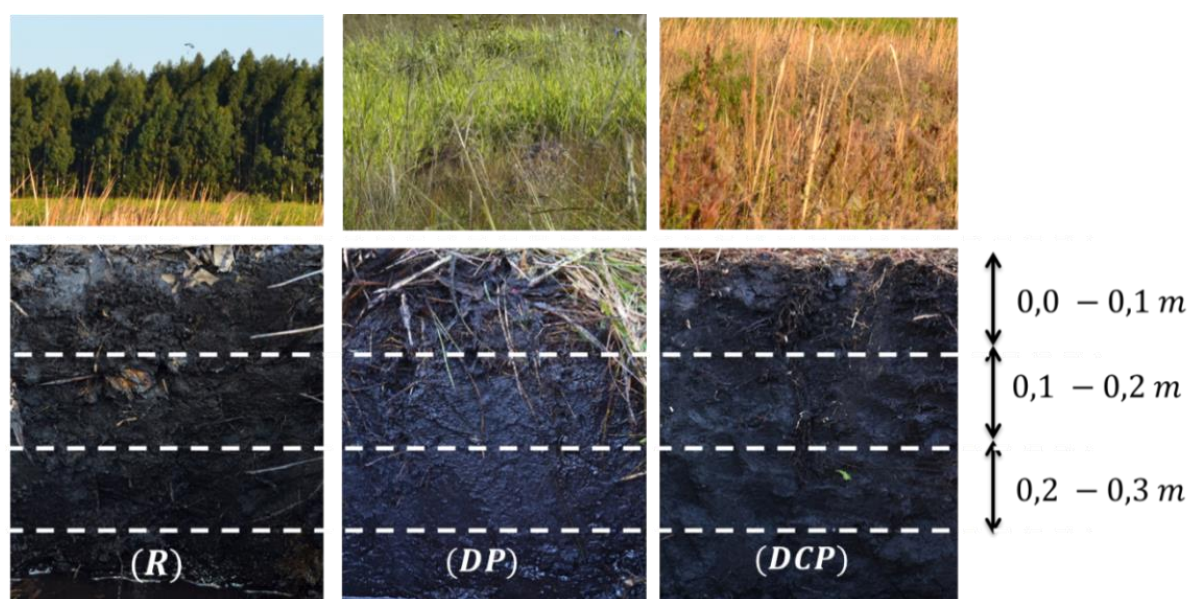
espinhas de peixe (valetas secundárias) foram realizadas com valetadeira rotativa no trator, e aprofundadas manualmente. Esta área nunca foi cultivada e encontra-se em pousio desde que foi drenada. Os drenos passaram por manutenção todos os anos (limpeza e aprofundamento do canal para baixar o lençol freático).

A área DCP, drenagem cultivo e pousio, foi drenada nas mesmas condições da área DP, contudo, nela foram realizados cultivos intensos por dez anos, após sua abertura e drenagem em 1978. Esta área recebeu os drenos mais profundos, sendo melhor drenada do que as demais áreas da várzea. Da safra 1978/1979 até a safra 1987/1988, foi cultivada efetivamente no período de verão. Em todas as operações de semeadura foram colocados fertilizantes químicos, com doses variadas entre 280 a 320 kg/há. Em sua maioria, a formulação de adubo adotada para uso na semeadura foi 04 – 30 – 10, ou seja 4% de nitrogênio, 30% de fósforo e 10% de potássio, os 56% restante são constituídos de material inerte. Em cobertura, ou seja, aplicado quando o arroz estava com 20 a 30 dias de nascido, aplicava-se ureia ou sulfato de amônio, onde a ureia tem 45% de nitrogênio e o sulfato de amônio possui 25% de nitrogênio.

O preparo do solo dessa área era realizado com uso de enxada rotativa, passada com trator de baixa potência, com alto poder de desagregação dos solos. Essa operação realiza um amplo revolvimento, com fragmentação e enterramento da biomassa produzida. Essa área sempre foi utilizada por cultura de arroz, que apesar de ser solo de várzea, e com alta taxa de umidade, as cultivares ali implantadas sempre foram de arroz sequeiro.

A Figura 12 mostra os locais de coleta das amostras de solo, bem como o tipo de vegetação predominante em cada uma. No momento da coleta foi possível notar a diferença no teor de umidade do solo em cada área. Em R, o lençol freático encontra-se a apenas 10 cm da superfície; em DP o lençol não está visível, mas o solo ainda se encontra bastante húmido; em DCP o solo se encontra completamente drenado.

Figura 12 - Locais de coleta das amostras de solo.



Fonte: O autor.

4.2. FRACIONAMENTO QUÍMICO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

O fracionamento químico da matéria orgânica e isolamento dos ácidos húmicos foi realizado no Laboratório de Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais (FASCA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), utilizando o método sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e por Swift (1996).

O fracionamento químico da MOS é obtido segundo critérios de solubilidade. A fração ácido húmico é solúvel em meio alcalino, a fração ácido fúlvico é solúvel em qualquer pH e a fração humina é insolúvel em qualquer pH.

Para cada amostra foram utilizados 100 g de solo, peneirado em malha de 2 mm. Ao solo adicionou-se 1 l de solução de HCl, $0,1 \text{ mol}^{-1}$ com pH entre 1 e 2. As amostras foram agitadas com bastão de vidro por 1 h e deixadas para decantação por 3 h.

O sobrenadante, ácido fúlvico, foi retirado por sifonação. O resíduo sólido foi neutralizado com 1 l de NaOH, $0,1 \text{ molL}^{-1}$ com pH entre 12 e 13. Após agitação com bastão de vidro por 4 horas, a solução decantou por 20 horas para que a

precipitação da humina. O sobrenadante foi levado à centrífuga por 10 min, a 25 °C e 10000 rpm, em rotor de 250 mL. O precipitado é humina.

Acidificou-se o sobrenadante com HCl, 6 molL⁻¹, em constante agitação para obter pH entre 1 e 1,5. A solução assentou-se por 12 – 16 horas. O sobrenadante, ácido fúlvico, foi sifonado e levou-se o restante para a centrífuga para ser totalmente retirado. O ácido húmico foi então redissolvido através da adição do menor volume possível de KOH, 0,1 molL⁻¹.

A mistura foi agitada por 2 horas. O processo de purificação iniciou-se com a adição de KCl sólido em quantidade suficiente (de acordo com o volume de KOH adicionado) para alcançar a concentração de 0,3 molL⁻¹ de K⁺.

A solução foi centrifugada para remover os sólidos suspensos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi adicionado HCl 6 molL⁻¹, pH1 para precipitar o AH. A mistura permaneceu em repouso por 12 – 16 horas e repetiu-se o procedimento.

Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o AH foi transferido para os tubos de diálise, permanecendo por 7 dias em água miliQ. Após isso, as amostras foram liofilizadas.

A purificação das amostras de AHs foi verificada através da técnica de Espectroscopia no Infravermelho.

4.3. ANÁLISE ELEMENTAR

Os teores de carbono das amostras de solo inteiro foram determinados com o Determinador Elementar de carbono e nitrogênio, TRUS PEC LECO, utilizando aproximadamente 150 mg de solo não fracionado física ou quimicamente. O aparelho faz a combustão das amostras em um forno à temperatura de 950 °C e em seguida, os resíduos gasosos da combustão são purificados e tem três porções analisados por um detector de infravermelho que mede os teores de carbono e nitrogênio através de uma célula de condutividade térmica, comparando com uma amostra cujos teores são conhecidos. As medidas foram realizadas em duplicata a partir das quais foram obtidos os valores médios e o desvio padrão.

4.4. FLUORESCÊNCIA INDUZIDA A LASER

As medidas de Fluorescência Induzida a Laser (FIL) foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – São Carlos, SP, utilizando amostras de solo inteiro, peneiradas em malha de 1 mm, secas em estufa até 45°C e pastilhadas.

Os parâmetros utilizados foram: Lock-in 100 mV, fotomultiplicador 850 V, laser de argônio da marca Coherent, modelo Innova 90-6, com comprimento de onda de 458 nm e potência de 300 mW, com varredura de 470 a 650 nm.

Foram feitas seis repetições da medida de FIL para cada amostra e, a partir destes, obtidos os valores médios e o desvio padrão.

Para o cálculo do índice de humificação por FIL, a área de fluorescência é normalizada pelo teor de carbono da amostra, este último obtido por análise elementar conforme descrito anteriormente (MILORI et al., 2006) .

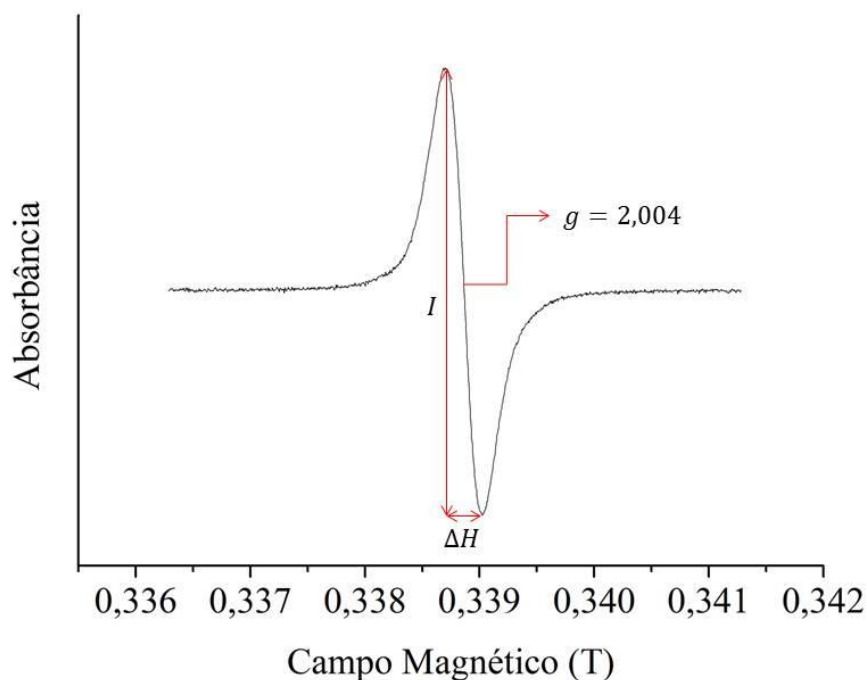
4.5. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

As medidas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia da EMBRAPA em São Carlos, SP, com o equipamento fabricado pela Bruker, modelo EMX X-band (9,0 GHz), com modulação de frequência de 100 kHz, com uso cavidade retangular. As amostras foram acondicionadas em tubos de quartzo com diâmetro de 3.5 mm, em colunas de 5 mm cuja massa para os AHs variou entre 5 e 30 mg. Todas as medidas foram realizadas em duplicata a partir das quais se calculou os valores médios e o desvio padrão.

O centro de campo magnético foi de 338 mT, $f = 9,52$ GHz, e a potência das micro-ondas de 0.201 mW com amplitude de modulação de 0,1 mT a temperatura ambiente. Os radicais livres semiquinona foram quantificados pelo método do padrão secundário, conforme SINGER (1959), usando um cristal de rubi (Al_2O_3) contendo 0,5% de Cr^{3+} cujo fator g corresponde a 1,9797 e, conseqüentemente, não interfere no sinal do radical livre semiquinona, cujo fator g é 2,003.

A Figura 13 mostra um sinal típico dos radicais livres orgânicos do tipo semiquinona. Em destaque o fator g , intensidade (I) e largura de linha (ΔH).

Figura 13 - Sinal típico dos radicais livres do tipo semiquinona. ΔH é a largura de linha e g o fator giromagnético.



Fonte: O Autor

4.6. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

As amostras de ácido húmico foram analisadas por espectroscopia de absorção de luz na região do Ultravioleta-Visível do Laboratório Multiusuário da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As análises foram realizadas com 3 mg de AH dissolvidos em solução de NaHCO_3 , 0,05 mol/L conforme sugerido em Milori et al (2002). A fim de garantir a melhor dissolução possível, a solução foi mantida em mesa agitadora por 24 horas. Todas as medidas foram realizadas em triplicata através das quais se obteve o valor médio e o desvio padrão.

Os espectros foram obtidos com o espectrômetro Varian modelo CARY 50 da Shimadzu, na região de 200 a 800 nm, com lâmpada de deutério e tungstênio. O branco (medida de referência semente com o soluto) foi obtido pelo espectro da

solução de água e bicarbonato de sódio, a mesma usada para a dissolução dos ácidos húmicos.

Para o cálculo da razão E_4/E_6 , dividiu-se as absorbâncias em 465 nm e 665 nm (SENESI; D'ORAZIO; RICCA, 2003).

4.7. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

As análises utilizando a técnica de Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), foram realizadas a partir de 60 varreduras no intervalo entre 4000 e 400 cm^{-1} utilizando o espectrômetro da marca Shimadzu, modelo IR Prestige – 2L do Laboratório Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para as medidas de FTIR preparou-se pastilhas com 200 mg de *KBr* seco e 2 mg de amostra (AH, solo inteiro, ou solo tratado com peróxido de hidrogênio). Mistura de *KBr* e amostra foi homogeneizada em almofariz e pistilo. O branco foi obtido pela obtenção do espectro de uma pastilha de *KBr* puro.

4.8. FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X – FRX

As medidas de fluorescência de raios-X foram realizadas no laboratório do Grupo de Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais da Universidade Estadual de Ponta Grossa utilizando o Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva, modelo EDX – 720, fabricado pela Shimadzu. O equipamento foi operado nas condições: 50 kV no tubo de raios-X, alvo de Rh, 10 mA, colimador de 10 mm, detector de cristal semicondutor Si(Li), resolução de energia de 155 KeV e tempo de análise de 100 segundos.

Foram utilizadas amostras sólidas de AH e solo inteiro. As amostras de solo inteiro foram maceradas e peneiradas em malha de 52 μm .

5. RESULTADOS E DUSCUSSÃO

5.1. FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

As Tabela 2 e 10 mostram os teores relativos de dos elementos Na, Ca, S, K, Al, Si, P e Fe, encontrados nas amostras de solo inteiro e AHs, respectivamente, obtidos por fluorescência de raios X (FRX). Os teores de Fe têm grande importância, pois íons de Fe^{3+} interferem nas medidas de RPE (NOVOTNY, 2002; NOVOTNY; MARTIN-NETO, 2002).

Tabela 2 – Espectroscopia por fluorescência de raios-X das amostras de solo inteiro. Valores em porcentagem.

	R ₁	R ₂	R ₃	DP ₁	DP ₂	DP ₃	DCP ₁	DCP ₂	DCP ₃
S	2,5	2,0	2,0	4,9	4,3	3,8	0,0	6,6	4,4
K	1,0	0,7	0,5	1,3	1,0	1,1	0,8	0,8	0,7
Al	29,5	31,4	34,7	26,6	28,9	35,8	25,0	23,8	30,0
Si	50,8	51,5	50,9	54,2	57,3	51,0	60,7	61,2	57,6
P	0,7	0,4	0,2	0,6	0,7	0,5	1,6	1,6	1,6
Fe	11,3	10,0	7,7	8,6	4,6	3,6	4,5	3,9	2,9
Ti	2,7	3,0	3,2	2,3	2,0	2,7	1,6	1,5	1,7

Tabela 3 – Espectroscopia por fluorescência de raios-X das amostras de ácido húmico. Valores em porcentagem.

	R ₁	R ₂	R ₃	DP ₁	DP ₂	DP ₃	DCP ₁	DCP ₂	DCP ₃
Na	51,1	40,0	15,8	40,9	42,2	37,5	36,0	0,0	45,7
Ca	8,7	24,2	15,8	18,9	24,4	20,9	34,1	37,4	20,9
S	11,4	15,9	16,6	24,6	17,6	25,4	14,3	31,9	16,6
K	7,3	3,0	25,3	3,8	1,8	4,0	3,4	7,8	2,6
Al	0	6,6	6,1	2,8	7,5	3,4	3,1	4,1	4,9
Si	2,8	3,6	4,9	2,9	2,4	3,1	2,8	5,8	2,8
P	3,4	3,6	4,0	3,9	3,1	4,2	2,7	5,5	3,6
Fe	13,7	1,1	23,3	1,0	0,3	1,2	1,4	2,0	0,3

Fonte: O Autor

Como mostram as Tabela 2 e 3 as amostras R₁ e R₃ possuem os mais elevados teores relativos de Fe. Contudo, os dados de RPE mostrados seção 5.6 mostram que a presença do metal não afetou significativamente os espectros de RPE, o que indica que o Fe presente na amostra não está na forma Fe^{3+} . Segundo Souza e Vahl (2009), em solos com elevado teor de umidade, como o da amostra R, boa parte dos óxidos de Fe^{3+} livres presentes no solo é rapidamente reduzido para Fe^{2+} .

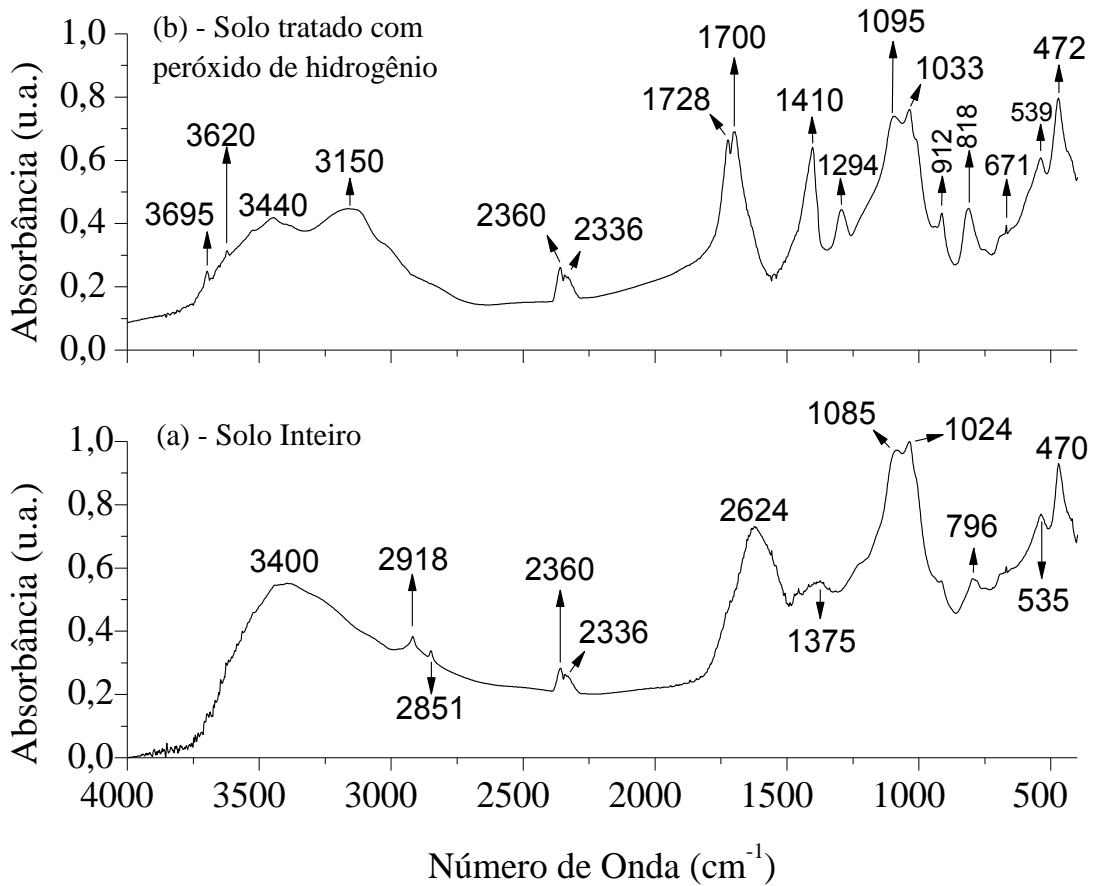
5.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

O processo de fracionamento químico da MOS tem como objetivo isolar e purificar as substâncias húmicas (AH, AF e HU). Neste trabalho a ocorrência de impurezas minerais persistentes após o processo de extração e purificação dos AHs pelo fracionamento químico, foi verificada utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para tanto as bandas de absorção associadas a minerais nas amostras de solo inteiro e de solo tratado com peróxido de hidrogênio (livre de matéria orgânica) foram comparadas aos espectros FTIR das amostras de ácido húmico. Pode-se verificar o sucesso do fracionamento pela não ocorrência de bandas associadas a minerais nas amostras de AH.

Na Figura 14 é apresentado o espectro de FTIR da amostra DCP₁. A amostra foi escolhida aleatoriamente dentre as demais, por não haver diferença significativa entre os espectros FTIR das amostras de solo inteiro e tratadas com peróxido de hidrogênio. Em (a) temos a amostra de solo inteiro e em (b) o espectro da amostra de solo inteiro tratada com peróxido de hidrogênio para a eliminação dos compostos orgânicos.

Dentre as bandas indicados no espectro, alguns são atribuídos aos minerais, Caulinita e Gibbsita. No espectro, a banda em 3695 cm^{-1} é atribuído aos minerais Caulinita. A banda em 3624 cm^{-1} é também atribuída a presença de Caulinita. As bandas em 3440 , 2369 , 571 e 539 cm^{-1} são atribuídos à presença de Gibbsita (FARMER, 1974; GADSDEN, 1975; DIXON, 1989).

Figura 14- Espectro de FTIR da amostra DCP, solo inteiro (a) e solo tratado com peróxido de hidrogênio para remoção dos compostos orgânicos (b).



Fonte: O Autor.

A Figura 15 mostra os espectros de FTIR das nove amostras de ácidos húmicos. A comparação com os espectros da Figura 14 e com os resultados obtidos por Saab (1999), Senesi (2003) e Bonometo (2010), mostra que os mesmos são coerentes com amostras de AHs livres de impurezas minerais. A comparação com os resultados obtidos pelos autores citados acima foi possível também identificar os grupos funcionais da matéria orgânica mostrados na Tabela 4

Figura 15 – Espectros de absorção no infravermelho das amostras de ácido húmico.

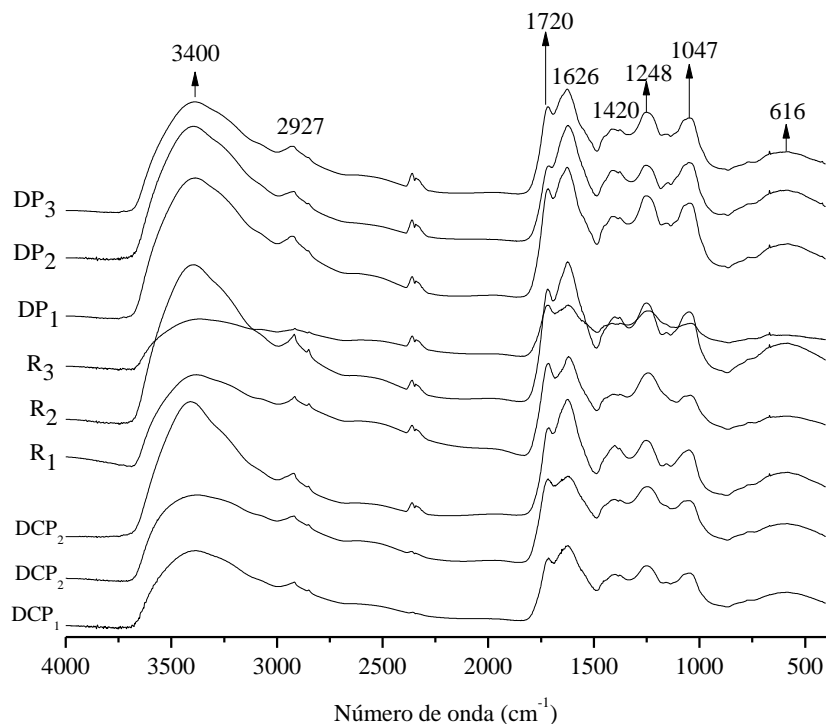


Tabela 4 - Principais grupos funcionais de absorção no infravermelho identificados nos espectros FTIR dos AHs mostrados na Figura 15.

Banda (cm ⁻¹)	Grupo de absorção
3400	Estiramento <i>O - H</i> , estiramento <i>N - H</i> e estiramento <i>OH</i> ligado.
2927	Estiramento <i>C - H</i> alifático.
1720	Estiramento <i>C = O</i> das cetonas e dos ácidos <i>COOH</i> .
1626	Estiramento <i>C = C</i> dos anéis aromáticos e estiramento assimétrico <i>C - O</i> dos íons carboxilato <i>COO⁻</i> .
1420	Estiramento <i>C = N</i> de amidas I.
1248	Estiramento simétrico <i>C - O</i> e deformação <i>OH</i> dos <i>COOH</i> , estiramento <i>C - O</i> de álcoois, éteres, esteres e fenóis.
1047	Estiramento <i>C - O</i> de polissacarídeos.

Fonte: O autor

5.3. ESTUDO DA HUMIFICAÇÃO DO SOLO INTEIRO

A seguir são apresentadas as análises realizadas com as amostras de solo não fracionadas física ou quimicamente – a saber: análise elementar (C), fluorescência induzida a laser, ressonância paramagnética eletrônica.

5.4. Análise Elementar

Na Tabela 5 – Conteúdo de carbono das nove amostras As medidas foram feitas em duplicata, a partir das quais calculou-se o desvio padrão;

Tabela 5 – Conteúdo de carbono das nove amostras de solo inteiro.

Amostra	Teor de C (g/kg)	Desvio padrão (g/kg)
R ₁	155,6	± 6,7
R ₂	126,3	± 2,4
R ₃	102,4	± 0,5
DP ₁	97,0	± 0,5
DP ₂	123,7	± 2,4
DP ₃	127,9	±10,2
DCP ₁	87,2	± 7,8
DCP ₂	190,1	± 0,8
DCP ₃	189,6	± 2,3

Fonte: O autor

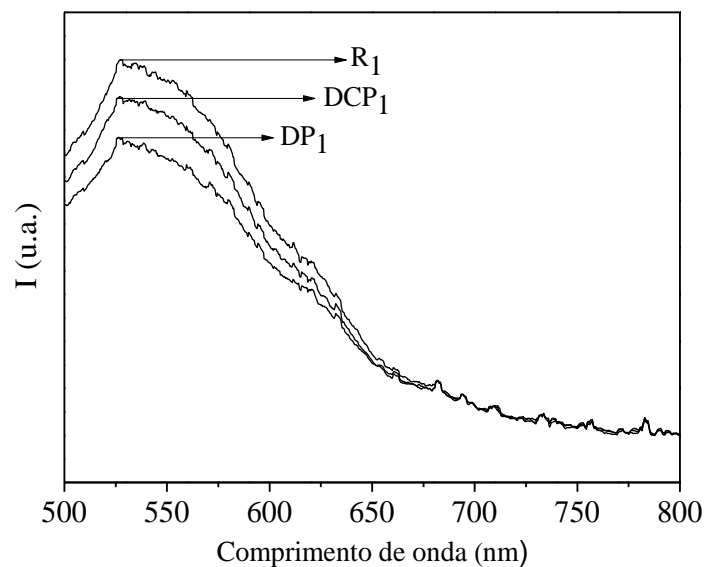
A drenagem de áreas de várzea tem sido apontada como um fator responsável por elevadas perdas de carbono (KALBITZ; GEYER e GEYER, 1999; LAIHO, 2006; EBELING et al., 2011; HELLER; ZEITZ, 2012). Neste trabalho, como mostra a Tabela 5, o solo não drenado apresenta maior teor de carbono que os demais, na profundidade 0 – 0,10 m corroborando com resultados encontrados na literatura. O teor de carbono na superfície da amostra R é maior em relação aos perfis mais profundos, o que está associado às características da material orgânico depositado no solo, proveniente das árvores de eucalipto e, portanto, rico em lignina e de difícil decomposição (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Ademais, o aporte de

matéria orgânica dessa área é maior que das áreas drenadas, onde a vegetação é composta principalmente por gramíneas.

5.5. Fluorescência induzida a laser

A Figura 16 mostra o espectro de emissão de fluorescência, obtidos pela técnica FIL, de amostras de solo não fracionados física ou quimicamente. A razão entre a área sob a curva do espectro normalizada pelo teor de carbono da amostra pode fornecer um parâmetro que permite estimar o grau de humificação da matéria orgânica do solo (MILORI et al., 2002, 2006). Alguns trabalhos tem encontrado uma boa correlação entre a humificação avaliada por FIL e outras técnicas como RPE e razão C/N (MARTINS et al., 2011).

Figura 16 – Espectro de emissão de fluorescência, obtidos por FIL de três amostras de solo orgânico não fracionadas física ou quimicamente nas condições experimentais: comprimento de onda 458 nm e potência de 300 mW.



Fonte: O autor

Na Figura 16 o pico máximo de fluorescência está na região de 520 nm. Milori et al. (2006) mostrou que o espectro de fluorescência está diretamente relacionada com a concentração de C, porém o carbono a que se refere é devido a estruturas rígidas, como anéis aromáticos e grupos quinona. Assim somente esses

carbono são detectados pela FIL. A intensidade da curva de fluorescência está relacionada com a quantidade de carbono aromáticos presentes nas amostras, quanto maior a intensidade maior a concentração e, assim, mais humificada será a MOS (Milori et al., 2002; Martins et al., 2009)

Na Tabela 6 se encontram os índices de humificação (H_{FIL}) obtidos por fluorescência induzida a laser, que indicam que o grau de humificação nas áreas R e DCP são maiores na superfície que nas profundidades 0,1 – 0,2 m e 0,2 – 0,3 m. O oposto é observado para a área DP, onde dados indicam que o grau de humificação da MOS é aumenta com a profundidade. Resultados semelhantes também foram obtidos em trabalhos com solos alagados, como por Segnini et al. (2010) e em Rosa et al. (2005).

Tabela 6 – Índices de humificação – H_{FIL} de amostras de solo orgânico não fracionados física ou quimicamente obtidos por Fluorescência Induzida a Laser – FIL.

Amostra	H_{FIL} (u,a)	Desvio Padrão
R ₁	315	± 14
R ₂	142	± 11
R ₃	149	± 14
DP ₁	151	± 15
DP ₂	181	± 17
DP ₃	231	± 31
DCP ₁	303	± 19
DCP ₂	243	± 20
DCP ₃	255	± 21

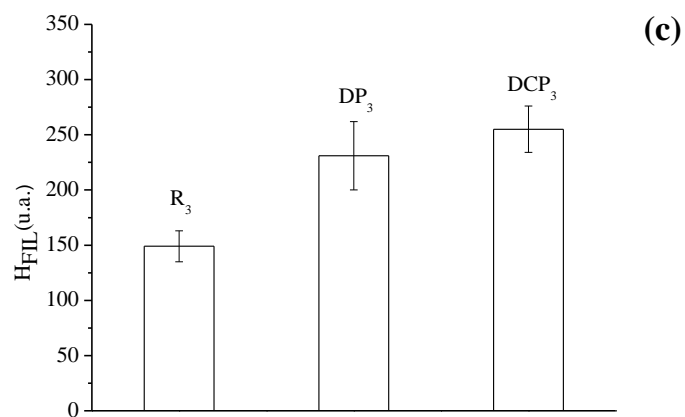
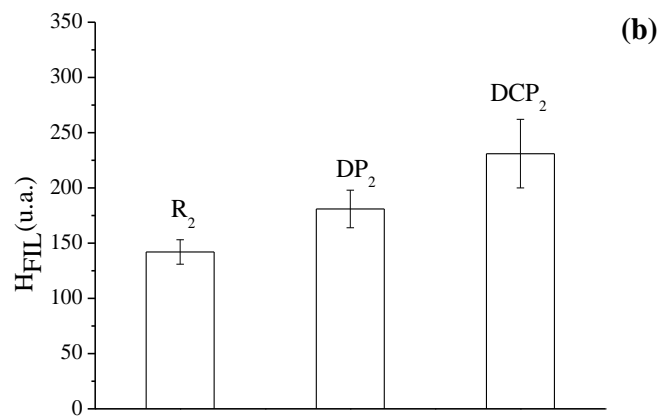
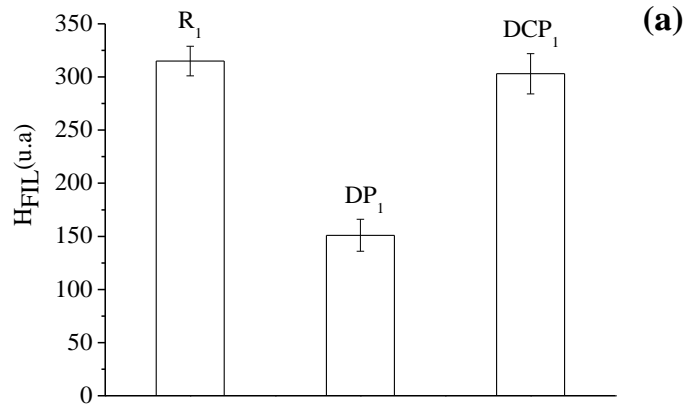
Fonte: O autor.

Segnini et al. (2010) em trabalho com solos permanentemente e sazonalmente inundados, verificaram índices H_{FIL} maiores nos perfis mais profundos do solo, bem como, valores menores de H_{FIL} em solos permanentemente alagados em comparação aos solos alagados sazonalmente. Neste trabalho, ao menos para as amostras R e DCP, onde os índices H_{FIL} são maiores na profundidade 0 – 0,1 m que nas demais. Contudo, os menores valores de H_{FIL} foram obtidos para as amostras R₂ e R₃.

As técnicas de RPE, FIL e análise elementar foram usadas por Rosa et al. (2005) em estudo do grau de humificação da MOS de solos alagados e não alagados da Amazônia brasileira. Os autores verificaram que o grau de humificação dos ácidos húmicos varia consideravelmente com a profundidade, porém sendo maior nos perfis 0 – 10 cm e 10 – 20 cm.

Na Figura 17 estão representados os índices H_{FIL} mostrados na Tabela 6. Tendo em vista o estado de drenagem do local onde cada amostra foi coletada, é possível notar que grau de humificação aumenta com a diminuição do teor de humidade de solo. Na área de reflorestamento, onde o solo é bastante encharcado, o grau de humificação diminui com a profundidade. A área DP, onde o solo é mais seco que na área R e mais úmida que na área DCP, o grau de humificação é intermediário. Finalmente, a área DCP, cuja drenagem é mais eficiente, tem os mais elevados valores de H_{FIL} nos perfis seguintes à superfície.

Figura 17 - Índices de H_{FIL} de amostras de solo de várzea, não fracionadas física ou quimicamente, com diferentes históricos de uso.

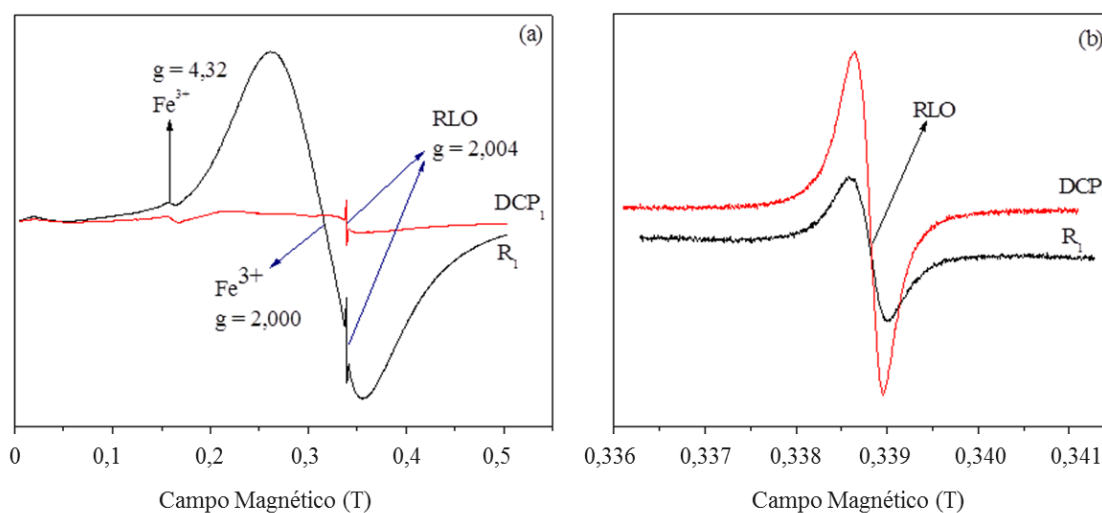


Fonte: O autor

5.6. Ressonância paramagnética eletrônica – solo inteiro

A Figura 18 mostra o espectro de RPE de duas das nove amostras estudadas nesse trabalho, R_1 e DCP_1 . Dentre todas, R_1 possui a maior concentração relativa de Fe (dados obtidos por FRX). O sinal correspondente ao fator giromagnético $g = 2,004$ é característico do radical livre orgânico – RLO, possivelmente conjugado com anéis aromáticos da matéria orgânica do solo (Saab e Martin-Neto, 2008). Os sinais em $g = 4,320$ e $g = 2,000$ são atribuídos à presença de Fe^{3+} na amostra. A Figura 18b mostra o detalhe do sinal do RLO de ambas as amostras, realizados nas mesmas condições experimentais, indicando que apesar da presença do íon Fe^{3+} , o sinal do RLO é detectado, permitindo estudo da humificação da MOS por RPE sem a necessidade de fracionamento físico ou químico (BAYER et al., 2002; SAAB e MARTIN-NETO, 2008; SEGNINI et al., 2010).

Figura 18 – Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica de amostras de solo orgânico, não fracionados física e quimicamente, obtidos nas mesmas condições experimentais. Em (a) o espectro das amostras de solo não fracionado DCP_1 e R_1 . Em destaque os sinais do Fe^{3+} .

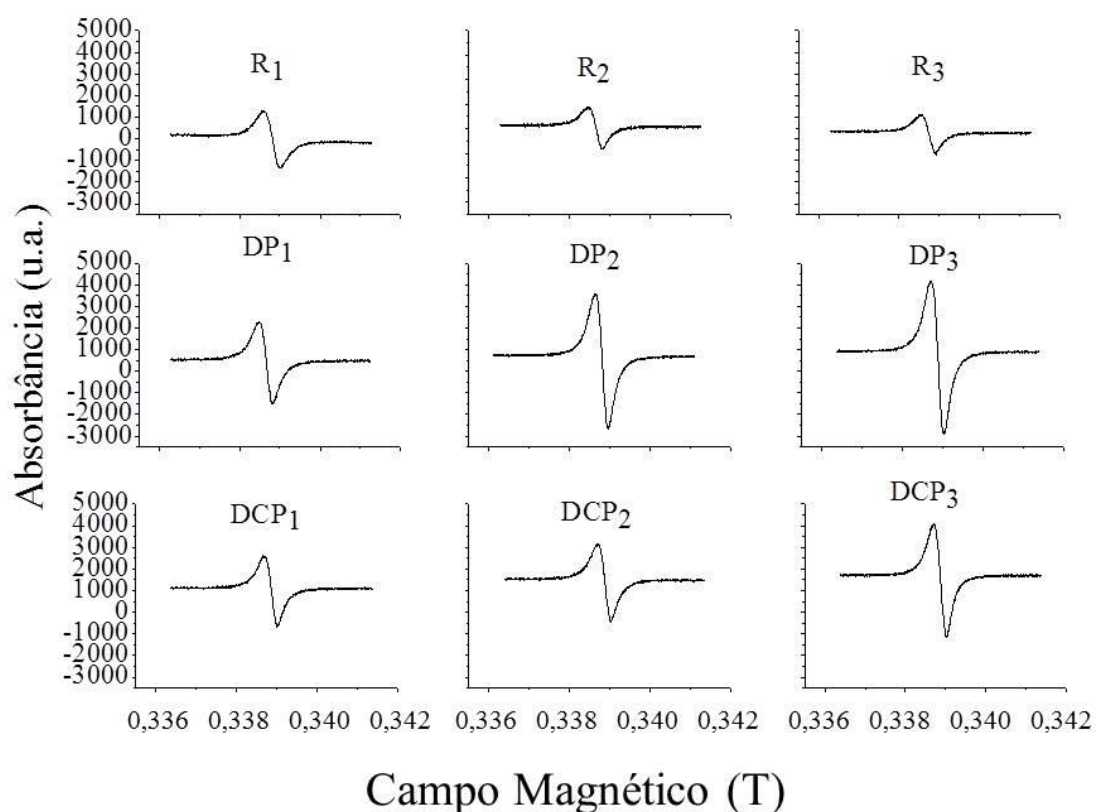


Fonte: O Autor

Em solos com baixos teores de matéria orgânica, como os Latossolos, a presença de íons paramagnéticos, como Fe^{3+} , provoca o alargamento e distorção do sinal dos RLO (BAYER et al., 2002; SAAB e MARTIN-NETO, 2003, 2004). Nestes casos o uso da técnica só é possível após o fracionamento das amostras. Contudo,

como mostra a Figura 18, devido ao elevado teor de carbono das amostras, mesmo aquelas com maior concentração de Fe^{3+} apresentam sinal de RLO com boa intensidade e alta relação sinal ruído.

Figura 19 – Sinal do radical livre orgânico das amostras de solo não fracionados obtidos por ressonância paramagnética eletrônica nas mesmas condições experimentais.



Fonte: O Autor

Na Tabela 7 é apresentada a concentração de spins por grama de carbono das amostras de solo inteiro. A área do sinal de RPE pode ser aproximada pela multiplicação do sinal de absorbância (I) pela largura de linha (ΔH^2), como usado em Bayer et al. (2002), mas nesse trabalho foi obtida por integração. A concentração de spins foi obtida utilizando um padrão de rubi sintético, calibrado com um padrão de KCl (*strong pitch*) de concentração de radicais livres conhecida e posteriormente normalizada pelo teor de carbono de cada amostra (WEBER; JIANG e BARR, 1998).

Os dados na Tabela 7 mostram que o grau de humificação das amostras das áreas DCP e DP, aumenta do perfil 0 – 0,10 m para o perfil 0,20 – 0,30 m. Porém, na área Reflorestamento, observa-se o oposto, ou seja, a diminuição do grau de humificação com a profundidade, corroborando com os resultados obtidos por FIL nesta amostra.

O solo da área R encontra-se saturado com água já a poucos centímetros da superfície, provocando a redução na oxigenação e conseqüente diminuição da atividade microbiana por organismos aeróbicos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002; SIX et al., 2006). Tal fato, acrescido das características químicas do material de origem, proveniente principalmente das arvores de eucalipto ricos em lignina, justifica o a alta concentração de spins (FIALHO et al., 2010) e o acúmulo de carbono orgânico na superfície. Este resultado está em acordo com o obtido por Rosa et al. (2005) que também utilizou técnicas espectroscópicas no estudo da MO de solos de várzea.

Tabela 7 – Indicadores de humificação da matéria orgânica do solo nas amostras de solo inteiro

Amostra	RLO ($\times 10^{18} \text{ spin/g}_c$)	Desvio Padrão ($\times 10^{18} \text{ spin/g}_c$)
R ₁	1,68	$\pm 0,12$
R ₂	1,06	$\pm 0,07$
R ₃	1,39	$\pm 0,05$
DP ₁	2,63	$\pm 0,14$
DP ₂	1,76	$\pm 0,02$
DP ₃	3,21	$\pm 0,01$
DCP ₁	2,39	$\pm 0,09$
DCP ₂	1,23	$\pm 0,01$
DCP ₃	3,25	$\pm 0,23$

Fonte: O autor.

A humificação da MOS das áreas drenadas, DCP e DP, também pode ser devido ao estado de oxigenação do solo. As amostras dessa área encontram-se drenadas em comparação a área de reflorestamento (R), favorecendo a oxigenação do solo, que por sua vez, beneficia a atividade de micro-organismos aeróbicos acelerando o processo de decomposição da MOS (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

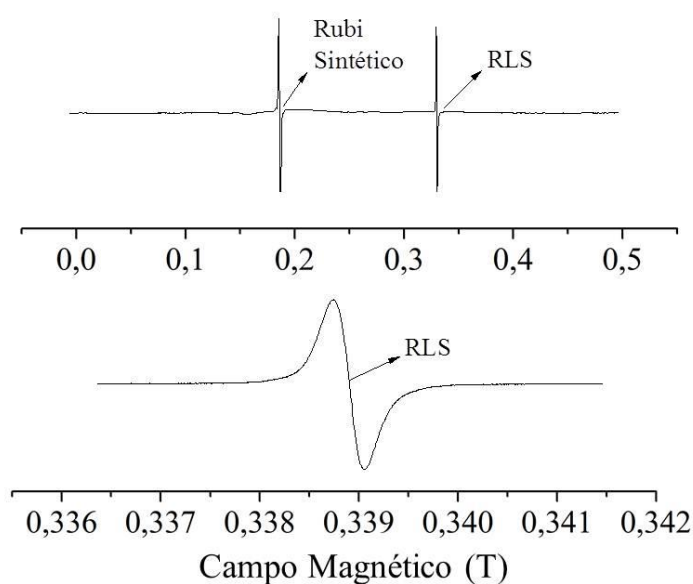
5.7. ESTUDO DA HUMIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁCIDO HÚMICO

São apresentados a seguir os resultados referentes as análises dos ácidos húmicos, AHs, por RPE, UV/Vis.

5.8. Ressonância paramagnética eletrônica dos ácidos húmicos

A Figura 20 apresenta os espectros de RPE de amostra de ácido húmico. Em (a) a medida realizada de 0 – 0,5 T, evidenciando a ausência do sinal de Fe^{3+} e o radical livre semiquinona (RLS). Em 0,2 T o sinal do rubi sintético utilizado na quantificação dos RLS pelo método do padrão secundário. Em (b) o sinal do RLS.

Figura 20 – Espectros de ressonância paramagnética eletrônica de amostra de ácido húmico enfatizando.



Fonte: O autor.

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica foi usada também para quantificar os radicais livres semiquinona das amostras de ácido húmico. Os dados obtidos estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 – Indicadores de humificação da fração ácido húmico por ressonância paramagnética eletrônica.

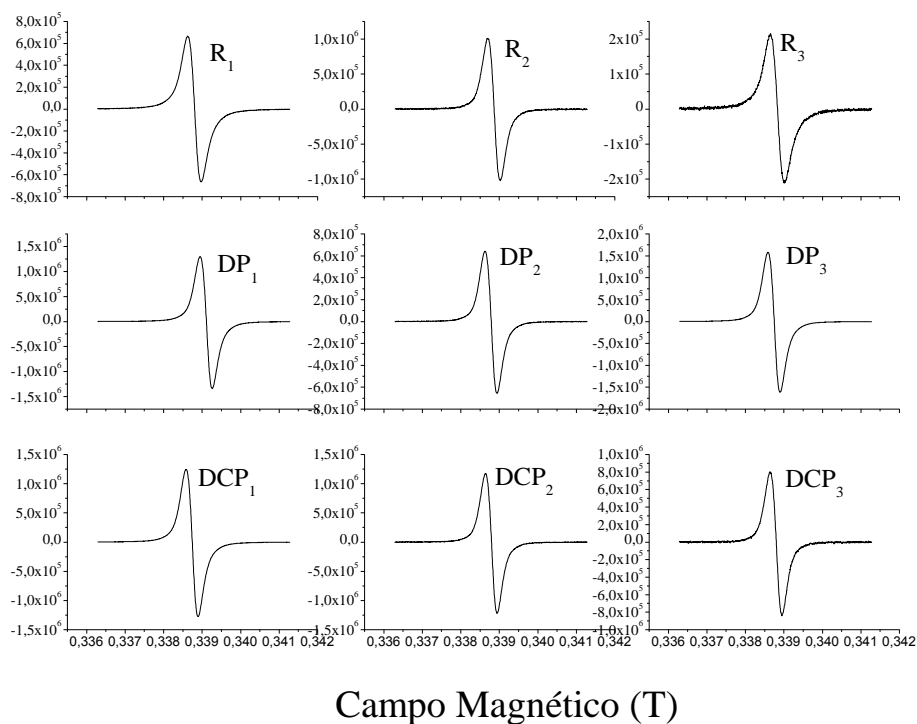
Amostra	RLO ($\times 10^{18}$ Spin/g)	Desvio Padrão ($\times 10^{18}$ Spin/g)
R ₁	2,4	$\pm 0,1$
R ₂	2,50	$\pm 0,06$
R ₃	0,88	$\pm 0,04$
DP ₁	0,35	$\pm 0,00$
DP ₂	2,1	$\pm 0,8$
DP ₃	0,39	$\pm 0,03$
DCP ₁	0,34	$\pm 0,00$
DCP ₂	2,62	$\pm 0,07$
DCP ₃	1,9	$\pm 0,1$

Fonte: O autor

Os dados na Tabela 8 indicam que assim como observado para as amostras de solo inteiro, o grau de humificação na área R diminui da superfície para os perfis mais profundos. Não obstante, para as áreas DP e DCP observa-se maior grau de humificação na profundidade 0,1 – 0,2 m, que por sua vez, não foi observada no estudo por RPE das amostras solo inteiro. Este resultado pode ser explicado pelo fato do solo inteiro possui todas as frações da substância húmica (AH, AF e HU) contribuindo de forma mais eficaz no resultado da quantificação da humificação da MOS. Outra hipótese é a não normalização das áreas dos espectros dos AHs com o teor de carbono dos mesmos, como foi realizado no solo inteiro.

A Figura 21 mostra o sinal dos RLS das nove amostras de ácido húmico. A intensidade do sinal observada no espectro é proporcional a quantidade de amostra utilizada, que por sua vez, variou de 5 a 25 mg. Deste modo, apesar de todas as medidas terem sido realizadas nas mesmas condições experimentais, a intensidade do sinal mostrado no espectro não pode ser associado ao grau de humificação das amostras.

Figura 21 – Sinal do radical livre semiquinona das amostras de ácido húmico por ressonância paramagnética eletrônica. Todas as medidas foram realizadas nas mesmas condições experimentais, contudo a massa das amostras variou de 5 a 25 mg.



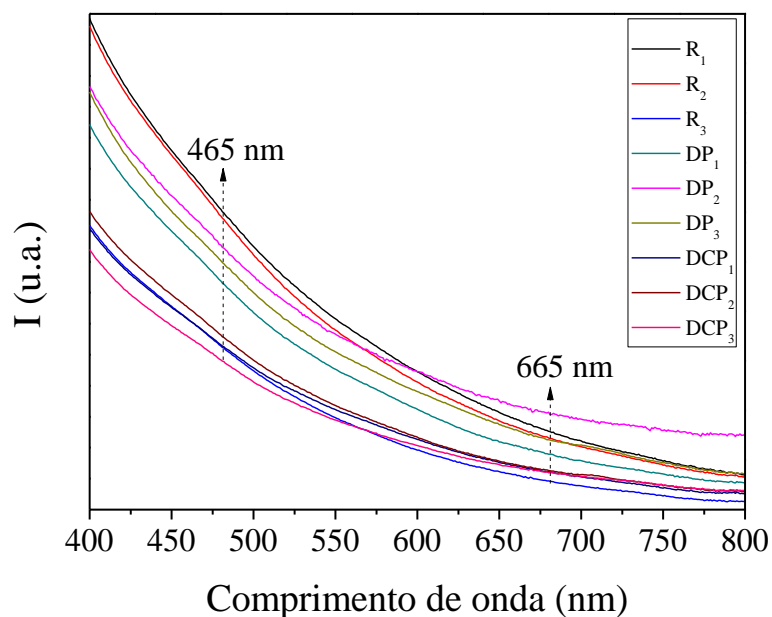
Fonte: O autor

5.9. Espectroscopia no ultravioleta e visível

A Figura 22 mostra a curva de absorção de radiação UV e Visível pelas amostras de ácido húmico. Em destaque a absorção da radiação eletromagnética nos comprimentos de onda 465 nm (E_4) e 665 nm (E_6), associados, respectivamente, à presença de grupos alifáticos e à condensação dos carbonos aromáticos, (SAAB; MARTIN-NETO, 2007).

Os valores da razão E_4/E_6 fornecem, portanto, um índice inversamente relacionado ao grau de condensação das macromoléculas de ácido húmico e a seu grau de humificação (SENESI; D'ORAZIO e RICCA, 2003; BONOMETO, 2010).

Figura 22 - Espectro de absorção de radiação UV e Visível pelas amostras de AHs dos solos de várzea.



Fonte: O autor

Na Tabela 9 são apresentados os dados que fornecem o grau de humificação das amostras de AHs pela razão E_4/E_6 .

Tabela 9 – índices de humificação E_4/E_6 das amostras de ácidos húmicos de solos de várzea, obtidos por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível.

AMOSTRA	E_4/E_6	Desvio Padrão
R1	3,79	± 0,01
R2	4,08	± 0,01
R3	5,76	± 0,06
DP1	4,16	± 0,02
DP2	3,13	± 0,33
DP3	3,58	± 0,00
DCP1	4,43	± 0,05
DCP2	4,55	± 0,04
DCP3	4,12	± 0,00

Fonte: O autor

O índice E_4/E_6 diminui com o aumento do grau de humificação da amostra, deste modo, pela Tabela 9 vê-se que as amostras da área R são humificadas na superfície que nos perfis mais profundos. O oposto ocorre nas amostras DP e DCP, drenadas, cujo grau de humificação aumenta com a profundidade. Este resultado é similar aos obtidos por FIL e RPE para as amostras de solo inteiro.

6. CONCLUSÃO

O grau de humificação da MOS avaliado pelas técnicas espectroscópicas de RPE, FIL e absorção UV/Visível revela que o solo não drenado da área R, têm menor taxa de decomposição nos perfis mais profundos, onde a disponibilidade de O₂ é menor. Nas áreas drenadas, DP e DCP, o grau de humificação da MOS na perfil 0,0 – 0,1 m é sempre o menos humificado, como verificado por todas as técnicas. Estes resultados corroboram a hipótese inicial da pesquisa e estão de acordo com o relatado na literatura em outras áreas de solos de várzea.

7. TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão de trabalhos futuros pode ser feito o estudo por RPE, FIL e UV-Vis e RMN das frações húmica e ácido fúlvico, não contempladas nesse trabalho. Através da Técnica de ¹³C RMN CP/MAS utilizando amostras sólidas de AH e solo inteiro pode-se inferir aspectos quantitativos de Carbonos ligados a grupos diferentes tais como alifáticos e aromáticos.

REFERÊNCIAS

ABREU JUNIOR, C. H. et al. Métodos Analíticos Utilizados em Química do Solo. In: MELO, V. F. (Ed.). **Química e Mineralogia do Solo**. 1. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. cap. 21, p.685.

ATKINS, P. W. **Físico - Química Fundamentos**. 2. ed. Oxford: LTC, 2003. 476 p.

BARRIQUELLO, M. F. et al. Electron Paramagnetic Resonance Characterization of a Humic Acid-Type Polymer Model. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2302-2307, 2010.

BASTOS, R. S. et al. Formação e estabilização de agregados do solo influenciados por ciclos de umedecimento e secagem após adição de compostos orgânicos com diferentes características hidrofóbicas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 21-31, 2005.

BAYER, C. et al. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. **Geoderma**, v. 105, n. 1-2, p. 81-92, Jan 2002.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S. C. Humification decrease of soil organic matter under no-tillage. **Revista Brasileira De Ciencia Do Solo**, v. 27, n. 3, p. 537-544, May-Jun 2003.

BENITES, V. D. M. et al. Properties of black soil humic acids from high altitude rocky complexes in Brazil. **Geoderma**, v. 127, n. 1-2, p. 104-113, 7// 2005.

BONOMETO, V. E. **Estudo da humificação da matéria orgânica de um cambissolo em diferentes sistemas de manejo por meio de técnicas espectroscópicas**. 2010, 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Física). Programa de Pós-Graduação em Ciências: Física, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2010.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; SANTOS, G. D. A. **Humosfera, tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. ed. Campos dos Goytacazes: Soropédica, 2005. 309 p.

CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information Provided on Humic Substances by E4-E6 Ratios. **Soil Science Society of America Journal**, v. 41, n. 2, p. 352-358, 1977.

DIXON, J. B. Kaolin and Serpentine Group Minerals. In: AMERICA, S. S. S. O. (Ed.). **Minerals in Soil Environments** ed. Madison: S. B. Weed, 1989. cap. 467-525,

EBELING, A. G. et al. Chemical Properties, Organic Carbon and Humic Substances of Histosols in Different Regions of Brazil. **Revista Brasileira De Ciencia Do Solo**, v. 35, n. 2, p. 325-336, Mar-Apr 2011.

EBELING, A. G. et al. Atributos químicos, carbono orgânico e substâncias húmicas em organossolos háplicos de várias regiões do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, 2011.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Brasília: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2006. 306 p.

FARMER, V. C. **The Infrared Spectra of Minerals**. ed. London: 1974. 539 p.

FAVORETTO, C. M. et al. Determination of Humification Degree of Organic Matter of an Oxisol and of Its Organo-Mineral Fractions. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1994-1996, 2008.

FIALHO, L. L. **Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos**. 2007, 170 f. (Doutor). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. 2007.

FIALHO, L. L. et al. Interference of Lignin in the Quantification of Free Radicals in the Process of Composting. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 364-369, 2010.

GADSDEN, J. A. **Infrared spectra of minerals and related inorganic compounds**. ed. London: Butterworth, 1975. 277 p.

GONZALEZ-PEREZ et al. A laser-induced fluorescence spectroscopic study of organic matter in a Brazilian Oxisol under different tillage systems. **Geoderma**, v. 138, n. 1-2, p. 20-24, Feb 2007a.

GONZALEZ-PEREZ, M. et al. A laser-induced fluorescence spectroscopic study of organic matter in a Brazilian Oxisol under different tillage systems. **Geoderma**, v. 138, n. 1-2, p. 20-24, Feb 15 2007b.

HELLER, C.; ZEITZ, J. Stability of soil organic matter in two northeastern German fen soils: the influence of site and soil development. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, n. 8, p. 1231-1240, Sep 2012.

JASTROW, J. D. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 4-5, p. 665-676, Apr-May 1996.

KALBITZ, K.; GEYER, W.; GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances - a reflection of land use history in a fen area. **Biogeochemistry**, v. 47, n. 2, p. 219-238, Nov 1999.

KOLOKASSIDOU, C. et al. Thermal stability of solid and aqueous solutions of humic acid. **Thermochimica Acta**, v. 454, n. 2, p. 78-83, 3/15/ 2007.

LAIHO, R. Decomposition in peatlands: Reconciling seemingly contrasting results on the impacts of lowered water levels. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2011-2024, Aug 2006.

MARTINS, T. **Caracterização mineralógica e da matéria orgânica do solo por técnicas espectroscópicas e DRX**. 2009, 177 f. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2009.

MARTINS, T. et al. Soil organic matter humification under different tillage managements evaluated by Laser Induced Fluorescence (LIF) and C/N ratio. **Soil & Tillage Research**, v. 111, n. 2, p. 231-235, Jan 2011.

MBAGWU, J. S. C.; PICCOLO, A. Changes in soil aggregate stability induced by amendment with humic substances. **Soil Technology**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 3// 1989.

MICHEL, R. F. M et al. Ornithogenic gelsols (cryosols) from Maritime Antarctica: Pedogenesis, vegetation, and carbon studies. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 4, p. 1370-1376, Jul-Aug 2006.

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, n. 1, p. 57-63, Jan-Feb 2006.

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, Nov 2002.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Soil Microbiology and Biochemistry**. ed. Lavras: 2002. 623 p.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, n. 11, p. 1527-1536, Nov 2002.

NOVOTNY, E. H. **Estudos Espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo**. 2002, 215 f. (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2002.

NOVOTNY, E. H.; MARTIN-NETO, L. Effects of humidity and metal ions on the free radicals analysis of peat humus. **Geoderma**, v. 106, n. 3-4, p. 305-317, Apr 2002.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy, Vol 75**, v. 75, p. 57-134, 2002.

PICCOLO, A.; PIETRAMELLARA, G.; MBAGWU, J. S. C. Effects of coal derived humic substances on water retention and structural stability of Mediterranean soils. **Soil Use and Management**, v. 12, n. 4, p. 209-213, Dec 1996.

RAWLS, W. J. et al. Effect of soil organic carbon on soil water retention. **Geoderma**, v. 116, n. 1-2, p. 61-76, Sep 2003.

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. **Geoderma**, v. 127, n. 1-2, p. 1-10, Jul 2005.

SAAB, S. C.; MARTIN-NETO, L. Studies of semiquinone free radicals by ESR in the whole soil, HA, FA and humin substances. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 1, p. 34-37, Jan-Feb 2004.

_____. Characterization by electron paramagnetic resonance of organic matter in whole soil (Gleysoil) and organic-mineral fractions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 413-417, 2008.

_____. Use of the RPE technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 497-498, Jul-Aug 2003.

_____. Condensed aromatic rings and E-4/E-6 ratio: Humic acids in gleysoils studied by NMR CP/MAS C-13, and dipolar dephasing. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 260-263, Mar-Apr 2007.

SCHAUMANN, G. E. Soil organic matter beyond molecular structure Part I: Macromolecular and supramolecular characteristics. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 169, n. 2, p. 145-156, Apr 2006.

_____. Molecular modeling of soil organic matter: Squaring the circle? **Geoderma**, v. 166, n. 1, p. 1-14, Oct 30 2011.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. 3-Dimensional Models for Humic Acids and Soil Organic Matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, n. 11, p. 487-498, Nov 1995.

SEGNINI, A. et al. Spectroscopic Assessment of Soil Organic Matter in Wetlands from the High Andes. **Soil Science Society of America Journal**, v. 74, n. 6, p. 2246-2253, Nov-Dec 2010.

SENESI, N. Fluorescence Spectroscopy Applied to the Study of Humic Substances from Soil and Soil Related Materials - a Review. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 199, p. 8-Envr, Apr 22 1990.

SENESI, N.; D'ORAZIO, V.; RICCA, G. Humic acids in the first generation of EUROSOILS. **Geoderma**, v. 116, n. 3-4, p. 325-344, Oct 2003.

SILVERSTEIN, R. N.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos**. 5. ed. São Paulo: Guanabara, 1994. 387 p.

SILVERSTEIN, R. N.; BASSLER, G. C. M., T. C. **Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos**. 5. ed. São Paulo: Guanabara, 1994. 387 p.

SIMPSON, A. et al. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 2, p. 84-88, 2002.

SIMPSON, A. J. et al. Improvements in the two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of humic substances. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 2, p. 388-392, Mar-Apr 2002.

SINGER, L. S. Synthetic Ruby as a Secondary Standard for the Measurement of Intensities in Electron Paramagnetic Resonance. **Journal of Applied Physics**, v. 30, n. 9, p. 1463-1464, 1959.

SIX, J.; FREY, S. D.; THIET, R. K.; BATTEN, K. M. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 2, p. 555-569, Mar-Apr 2006.

SOUSA, R. O. D.; VAHL, L. C.; OTERO, X. L. Química dos Solos Alagados. In: MELO, V. D. F. e ALLEONI, L. R. F. (Ed.). **Química e Mineralogia do Solo**ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. cap. XX, p.486-512.

STEVENSON , F. J. **Humus Chemistry. Genesis, composition, reactions.** ed. New York: Wiley, 1994. p.

WEBER, R. T.; JIANG, J.; BARR, D. P. **EMX User's Manual.** Billerica: Bruker Instruments, Inc.: 245 p. 1998.

WHITELEY, G. M. Effects of colloidal lignite on the stability of soil aggregates. **Soil Technology**, v. 6, n. 4, p. 321-327, 12// 1993.