

VANESSA ELVIRA BONOMETO

**ESTUDO DA HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA
ORGÂNICA DE UM CAMBISSOLO EM
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO POR
MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

PONTA GROSSA

2010

VANESSA ELVIRA BONOMETO

**ESTUDO DA HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA
ORGÂNICA DE UM CAMBISSOLO EM
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO POR
MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, área de concentração Física, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab

PONTA GROSSA

2010

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

B719e Bonometo, Vanessa Elvira
Estudo da humificação da matéria orgânica de um cambissolo em diferentes sistemas de manejo por meio de técnicas espectroscópicas / Vanessa Elvira Bonometo. Ponta Grossa, 2010.
91f.
Dissertação (Mestrado em Ciências , área de concentração Física), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr . Sérgio da Costa Saab

1. MOS. 2. FIL. 3. Ácido Húmico. 4. Fluorescência I. Saab, Sérgio da Costa. II. T

CDD: 544.6

TERMO DE APROVAÇÃO

VANESSA ELVIRA BONOMETO

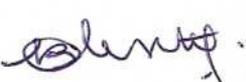
“ESTUDO DA HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DE UM CAMBISSOLO EM DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO POR MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS”

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 Física, UEPG/ PR


Prof. Paulo Irajara Borba Carneiro
Departamento Química, UEPG/ PR


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

Ponta Grossa, 22 de junho de 2010

Dedico este trabalho aos meus pais Valdomiro, Simonelli e Maria Luiza, à minha irmã, Tatiane, ao meu namorado Samyr pelo suporte, carinho e incentivo aos estudos.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Sérgio da Costa Saab, pela incrível compreensão, paciência e bom humor com que me atura desde a iniciação científica.

Ao meu namorado Samyr, pela compreensão, auxílio na diagramação do trabalho e incentivo desde a graduação.

Ao professor Dr. André Maurício Brinatti pelo incentivo e por ter me amparado quando estive “órfã” de orientador.

Aos amigos e colegas de grupo, em especial MSc. Talita e MSc. Elisandra e Aline, pelo imenso auxílio durante todo o trabalho.

À Jose, secretária do programa de pós-graduação em Ciências/Física, por sempre estar um passo a frente e nunca se negar a ajudar.

À Dr. Neyde Fabíola Balarezo Giarola e ao MSc. Dácio Antônio Benassi, pelo fornecimento das amostras e de esclarecimentos.

Ao Laboratório de Matéria Orgânica do Departamento de Ciências do Solo e Engenharia Agrícola pelas análises de C e N.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária e à Prof. Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori pelas análises de FIL.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais e ao técnico Douglas pelas medidas de IV.

Ao técnico Nilson do Laboratório Multiusuário pelo auxílio no fracionamento químico das amostras.

Aos amigos e colegas de graduação e de mestrado, por compartilharem angústias, alegrias e conhecimentos.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Sei lá. O melhor é não procurar muito.
Tragam pacotinhos vazios. A paz deve es-
tar lá dentro”. Carlos Drummond de An-
drade

Resumo

Os estoques e a estabilidade da matéria orgânica do solo (MOS), mesmo representando cerca de 5% do total do solo, são indicadores da qualidade e da sustentabilidade do sistema de manejo ao qual o solo está submetido, pois tem influência na disponibilidade de nutrientes para as plantas, auxilia na retenção de processos erosivos, aumenta a estabilidade de agregados e auxilia no sequestro de carbono. À medida que a MOS lábil torna-se estável por meio do processo de humificação, afetado pelo clima, tipo de solo e sistemas de manejo, as estruturas moleculares ganham complexidade, resultando na formação de grupos fluorescentes como anéis aromáticos e quinonas, que podem ser avaliados por técnicas espectroscópicas. O objetivo dessa pesquisa foi utilizar técnicas espectroscópicas para medir a humificação da matéria orgânica de um Cambissolo Háplico, proveniente do município de Irati - PR, submetidos a dois sistemas de manejo: plantio convencional e plantio direto (de seis anos e de nove anos). Foi utilizada a mata para comparação. Foram realizadas análises de fluorescência induzida a laser (FIL) nas amostras de solo inteiro (sem nenhum tratamento físico ou químico) e das suas frações obtidas através de fracionamento físico granulométrico: $<2 \mu m$ (argila), $2 - 20 \mu m$ (silte) e $20 - 53 \mu m$ (areia fina) e $53 - 1000 \mu m$ (areia grossa). Também foram realizadas análises de fluorescência dos ácidos húmicos, obtidos por meio de fracionamento químico do solo, e espectroscopia de absorção de UV-Visível (razão E_4/E_6). Os resultados destas análises mostram que não houve diferença no grau de humificação da MOS entre os sistemas de manejo.

Palavras-chave: MOS. FIL. Ácido Húmico. Fluorescência.

Abstract

Stocks and stability of soil organic matter (SOM), even accounting approximately 5% of soil total, are indicators of quality and sustainability of the management system to which the soil is submitted, it has influence on nutrient availability for plants, assists in erosion retention, increases aggregates stability and assists in carbon sequestration. As labile SOM becomes stable through the humification process, affected by climate, soil type and management systems, the molecular structures gain complexity, resulting in the formation of groups such as fluorescent aromatic rings and quinones, which can be evaluated by spectroscopy techniques. The purpose of this research was to use spectroscopic techniques to measure the humification of organic matter in a Cambisol, which comes from Irati - PR, submitted to two management systems: conventional tillage and no-tillage (six years and nine years). The forest was used as comparison. Analysis were performed using laser induced fluorescence (LIF) in whole soil (no chemical or physical treatment), and fractions obtained by physical fractionation by granulometry: $< 2 \mu m$ (clay), $2 - 20 \mu m$ (silt) and $20 - 53 \mu m$ (fine sand) and $53 - 1000 \mu m$ (sand). The samples were also analyzed for fluorescence of humic acids, obtained by chemical fractionation of soil and absorption spectroscopy, UV-Visible (E_4/E_6 ratio). The results of these tests show no difference in the degree of humification of SOM between management systems.

Keywords: SOM. LIF. Humic acid. Fluorescence.

Lista de Figuras

1	Composição de um solo ideal.	21
2	Horizontes em um perfil completo de solo (adaptada de REICHARDT; TIMM, 2004).	21
3	Fluxograma das frações químicas do solo.	23
4	Modelo bidimensional proposto por Schulten e Schnitzer (1993) para a estrutura dos ácidos húmicos	27
5	Modelo tridimensional proposto por Schulten e Schnitzer (1997) para a estrutura dos ácidos húmicos. Na representação temos o carbono em azul, o oxigênio em vermelho, o nitrogênio em preto e hidrogênio em branco. As letras A, B e C são espaços vazios.	28
6	Modelo <i>supramolecular</i> , de Simpson et al. (2002), para substâncias húmicas. As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as pretas os polissacarídeos, as azuis os polipeptídios, as verdes as cadeias alifáticas e as marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.	28
7	Tamanhos de partículas, em mm das frações físicas do solo, de acordo com a escala de Atterberg.	30
8	Solo sob plantio direto. (Adaptado de Segnine, 2007).	32
9	Plantio convencional. (a) Processo de aragem do solo. (b) Plantação sob o solo após a aragem (SEGNINE, 2007).	32
10	Espectro eletromagnético nas faixas do ultravioleta, visível e infravermelho.	36
11	Diagrama energético do fenômeno da fluorescência. S_0 é o nível fundamental, S_1 é o primeiro nível excitado, V_1 , V_2 e V_3 são os subníveis vibracionais do S_1 (Adaptado de Novotny, 2002). $E = hf$ é a energia absorvida pelo elétron e $E' = hf'$ é a energia emitida, sendo h a constante de Planck e f e f' são a frequência da radiação incidente e emitida, respectivamente.	37

12	Diagrama energético do fenômeno da fosforescência. S_0 é o estado singlete fundamental, S_1 é o primeiro estado singlete excitado, T_1 é o primeiro estado tripleto excitado (Adaptado de Novotny, 2002).	38
13	Os quartos A_1 e A_4 de um espectro de fluorescência de AH (u.a. significa unidade arbitrária).	40
14	A área abaixo da curva em um espectro de fluorescência de AH, com excitação de 465 nm.	41
15	Sistema para a medida de FIL (MILORI et al. (2002a)): laser de argônio (1), prisma (2), espelhos (3,4 e 5), lente (6), modulador óptico (“optical chopper”) (7), filtro (8), monocromador (9), fotomultiplicadora (10), amplificador lock-in (11), microcomputador (12).	43
16	Emissão de fluorescência de uma amostra de solo medida em laboratório. Em azul o espectro do solo; em vermelho, o espectro do mesmo solo após tratamento para a retirada da matéria orgânica: (a) por calcinação; (b) por tratamento com H_2O_2 . (MILORI et al., 2002a).	44
17	Diagrama de excitações eletrônicas que podem ocorrer em moléculas orgânicas (FIALHO, 2007).	45
18	Espectros de absorção eletrônica do benzeno, naftaleno, fenantreno, antraceno e naftaceno (adaptado de SILVERSTEIN et al., 1994).	46
19	Exemplo de espectro de absorção de UV-Visível e indentificação das intensidades de 465 nm e 665 nm ($\log \epsilon$ é proporcional à absorção).	47
20	Alguns modos de vibração moleculares (adaptado de STUART, 1996).	48
21	Representação do fenômeno de RPE. (a) Desdobramento energético dos spins de um elétron. (b) Sinal registrado pelo equipamento de RPE para a absorção da radiação incidente. (c) Primeira derivada do sinal registrado, que permite a identificação de g . (FIALHO, 2007)	51
22	Níveis de energia para um núcleo de momento angular $l = 1/2$ sob ação de um campo magnético H (SAAB, 1999).	52
23	Perfil do solo utilizado (retirado de BENASSI (2008)).	54
24	Encrostamento superficial da Terra Branca Batumadeira. (a) Vista superficial. (b) Vista lateral (retirado de BENASSI (2008)).	55

25	Tubos de PVC para fracionamento físico. (a) Representação esquemática evidenciando os 5 cm de decantação. (b) Fotografia da mesa de fracionamento.	58
26	(a) Janela de quartzo. (b) Mesa óptica para FIL.	62
27	Comparação entre as porcentagens de fração para cada sistema de manejo. (a) fração argila, (b) fração silte, (c) fração areia fina e (d) fração areia grossa. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	65
28	Espectros de IV para os ácidos húmicos das amostras: (a) MA (mata); (b) PC (plantio convencional); (c) P6 (plantio direto de seis anos) e (d) P9 (plantio direto de nove anos).	68
29	Espectro de IV para os ácidos húmicos da amostra plantio direto de seis anos, com única purificação. Em destaque estão os picos referentes às impurezas minerais.	69
30	Espectro de IV para os ácidos húmicos da amostra plantio direto de nove anos, com dupla purificação. Em destaque estão os picos referentes às moléculas orgânicas.	69
31	Espectro de IV para os ácidos húmicos da amostra plantio convencional, com dupla purificação. Em destaque está o pico referentes ao CO_2 .	70
32	Teor de C e de N comparativo entre os sistemas de manejo para o solo inteiro. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	71
33	Comparativo da razão C/N entre os sistemas de manejo para o solo inteiro. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	72
34	Teor de C e de N comparativo entre os sistemas de manejo e frações físicas. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos, P9 = plantio direto de nove anos, ar = argila, sl = silte, af = areia fina e ag = areia grossa.	74
35	Comparativo da razão C/N entre os sistemas de manejo e frações físicas. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos, P9 = plantio direto de nove anos, ar = argila, sl = silte, af = areia fina e ag = areia grossa.	75

36	Espectros de emissão de fluorescência obtidos por FIL para as amostras de solo inteiro. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	76
37	Índice de humificação obtidos por FIL (H_{FIL}) comparativo para o solo inteiro entre os sistemas de manejo: MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	77
38	Espectros de emissão de fluorescência obtidos por FIL. a) Frações físicas da Mata. b) Frações físicas do Plantio convencional. c) Frações físicas do Plantio direto de 6 anos. d) Frações físicas do Plantio direto de 9 anos.	78
39	Índice de humificação (H_{FIL}) comparativo entre os sistemas de manejo e frações físicas. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos, P9 = plantio direto de nove anos, ar = argila, sl = silte, af = areia fina e ag = areia grossa.	80
40	Espectros de fluorescência dos AH dos quatro sistemas de plantio, obtidos pelo método de (a) Zsolnay et al. (1999), excitação em 240 nm e (b) Milori et al. (2002b), excitação em 465 nm. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	81
41	Espectro de fluorescência da célula de quartzo.	81
42	Diagrama representativo dos índices de humificação dos AH para os quatro sistemas de plantio, obtidos pelo método de (a) Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1) e (b) Milori et al. (2002b) (A_{465}). MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	82
43	Espectros de absorção de luz UV-Visível das amostras de AH. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	83
44	Comparativo entre os índices de humificação obtidos pela razão E_4/E_6 da espectroscopia de absorbância de UV-Visível das amostras de AH. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.	84

Lista de Tabelas

1	Principais grupos de absorção no infravermelho, entre 4000 e 400 cm^{-1} , das substâncias húmicas (SAAB, 1999; SENESI, 2003).	49
2	Absorção no infravermelho de impurezas inorgânicas, entre 4000 e 400 cm^{-1} (SAAB, 1999).	50
3	Tamanho das partículas para cada fração física do solo, utilizada neste trabalho.	57
4	Porcentagem da fração granulométrica em relação à massa total de solo, por sistema de plantio.	64
5	Teores de cinza dos AH.	66
6	Teor de C N e razão C/N para as amostras de solo inteiro e fracionado.	71
7	Teor de C , N e razão C/N para as amostras do solo.	73
8	Índice de humificação obtidos por FIL (H_{FIL}) das amostras de solo inteiro.	76
9	Índice de humificação obtidos por FIL (H_{FIL}) das frações físicas.	79
10	Humificação dos AH para os quatro sistemas de plantio, obtidos por fluorescência, pelo método de (a) Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1) e (b) Milori et al. (2002b) (A_{465}).	82
11	Humificação dos AH para os quatro sistemas de plantio, obtidos pela razão E_4/E_6 da espectroscopia de absorbância de UV-Visível.	84

Lista de Siglas

A_1	Área do primeiro quarto do espectro de fluorescência de ácido húmico, obtido pelo método de Zsolnay et al. (1999)
A_4	Área do quarto quarto do espectro de fluorescência de ácido húmico, obtido pelo método de Zsolnay et al. (1999)
A_4/A_1	Razão do espectro de fluorescência de ácido húmico, obtido pelo método de Zsolnay et al. (1999)
A_{465}	Área abaixo do espectro de fluorescência de ácido húmico, obtido pelo método de Milori et al. (2002b)
AF	Ácido Fúlvico
af	Fração areia fina
A_{FIL}	Área abaixo do espectro de fluorescência induzida por laser
ag	Fração Areia Grossa
AH	Ácido Húmico
ar	Fração Argila
C	Carbono orgânico
C/N	Razão entre os teores de carbono e nitrogênio
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
E_4/E_6	Razão entre as intensidades da absorção em 465 nm e 665 nm do espectro de absorção de luz UV-Visível
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FASCA	Física aplicada a solos e ciências ambientais
FIL	Fluorescência induzida por laser
H	Hidrogênio
H_{FIL}	Humificação obtida por Fluorescência induzida por laser
HU	Humina
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
IV	Infravermelho com Transformada de Fourier

MA	Mata
MO	Matéria Orgânica
MOS	Matéria Orgânica do Solo
N	Nitrogênio
P6	Plantio Direto de 6 anos
P9	Plantio Direto de 9 anos
PC	Plantio Convencional
PD	Plantio Direto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SH	Substâncias Húmicas
sl	Fração silte
UV-Visível	Radiação na faixa do Ultravioleta e do Visível

Sumário

1	Introdução	17
2	O solo: aspectos gerais	20
2.1	Composição do solo	20
2.1.1	Horizontes do solo	20
2.1.2	Classificação do solo	22
2.2	Matéria orgânica do solo (MOS)	22
2.2.1	Grau de humificação	25
2.2.2	A estrutura das substâncias húmicas	26
2.3	MOS e frações químicas	28
2.4	MOS e frações físicas	29
2.5	MOS e Sistemas de Manejo	31
	Plantio Direto:	31
	Plantio Convencional:	32
3	Técnicas de análise da humificação e caracterização da MOS	34
3.1	Análise elementar: razão C/N	34
3.2	Técnicas espectroscópicas de análise da humificação e caracterização da MOS	35
3.2.1	Espectroscopia de fluorescência	36
3.2.1.1	O fenômeno da fluorescência	36
3.2.1.2	Espectroscopia de fluorescência de AH	39
	Método de Zsolnay et al. (1999)	40

Método de Milori et al. (2002b)	41
3.2.1.3 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL)	42
3.2.2 Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível (razão E_4/E_6)	44
3.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV)	47
3.3 Outras técnicas de análise da humificação da MOS	50
3.3.1 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	50
3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{13}C)	52
4 Material e métodos	54
4.1 Amostragem	54
4.2 Fracionamento físico	56
4.3 Fracionamento químico	59
4.3.1 Análise de teor de cinzas das amostras de AH	60
4.4 Análise elementar: razão C/N	60
4.5 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL)	61
4.6 Espectroscopia de fluorescência de AH	62
4.7 Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível (razão E_4/E_6)	63
4.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV)	63
5 Resultados e discussão	64
5.1 Fracionamento físico	64
5.2 Fracionamento químico	66
5.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV)	67
5.4 Análise elementar: razão C/N	71
5.4.1 Solo inteiro	71
5.4.2 Frações físicas do solo	73
5.5 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL)	75

5.5.1	Solo inteiro	75
5.5.2	Frações físicas do solo	78
5.6	Espectroscopia de fluorescência de AH	80
5.7	Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível (razão E_4/E_6)	83
6	Conclusão	85
	Referências	86

1 *Introdução*

A matéria orgânica (MO) é um componente fundamental do solo que afeta as características físicas, químicas, biológicas e mineralógicas do solo e é influenciada por elas. Por estar intimamente relacionada ao fornecimento de nutrientes, capacidade de retenção de cátions, atividade microbiana, estabilidade de agregados, mitigação dos processos erosivos e contribuir para o sequestro de carbono da atmosfera entre outros, seu estudo é de grande interesse em âmbitos de fertilidade e ambientais, especialmente processos erosivos, reações e associações com pesticidas, metais pesados e pesticidas e efeito estufa (MARTIN-NETO; ANDRIULO; TRAGHETTA, 1996; MILORI, 2002b; 2004).

Um dos fatores que tem grande influência na qualidade e quantidade da matéria orgânica do solo (MOS) é o sistema de manejo adotado, sendo que esta influência depende do tipo de solo e das condições climáticas regionais (BAYER, 2003). Técnicas de manejo que minimizam a degradação do solo, em geral, aumentam a quantidade e a qualidade da MOS. Essas técnicas são chamadas de conservacionistas por manterem no solo os resíduos vegetais, e entre elas destaca-se o sistema plantio direto (PD) (MARTINS, 2009). O entendimento dos sistemas de manejo entre outros aspectos gerais da ciência do solo, necessários para a compreensão do trabalho, serão descritos no capítulo 2.

Devido à importância da matéria orgânica na qualidade do solo e do ambiente e na produtividade das culturas, a demanda por sensores que possam avaliar quantidade e qualidade de MOS cresceu muito nos últimos anos (MILORI, 2002b). Esta avaliação é feita por meio de técnicas espectroscópicas que verificam mudanças na complexidade das moléculas que constituem a MOS. Quanto mais complexas as moléculas, mais humificada é a MOS. As frações lábeis e as recalcitrantes (estáveis ou humificadas) da matéria orgânica do solo são afetadas pela prática de manejo do solo (SEGNINI, 2007).

Em regiões de clima temperado existe uma quantidade expressiva de informações sobre a dinâmica da MO em solos (MILORI, 2004). No Brasil, autores como Bayer et al. (2000, 2002a, 2002b, 2003), COSTA et al. (2003), González-Perez et al. (2004), Milori et al.

(2002a, 2002b, 2004, 2006), Saab (2007, 2008), entre outros tem se dedicado ao assunto. No entanto não há um entendimento completo desta dinâmica, e há poucos estudos sobre solos pouco desenvolvidos, como os Cambissolos, solos estes onde boa parte da agricultura familiar está assentada no Brasil.

A hipótese é que solos sob sistemas mais revolvidos (como o plantio convencional (PC)) apresentem maior grau de humificação que solos sob sistemas menos ou intensamente modificados (como o PD).

O solo em estudo é proveniente de uma região pouco abastada do estado do Paraná, onde predomina a agricultura familiar com características pouco favoráveis à agricultura. Os Cambissolos desta região são unidades pouco estudadas e estão submetidos à sistemas de plantio direto e de plantio convencional. O estudo desse solo é importante devido ao uso intensivo e revolvimento para a produção de culturas para o mercado interno, como feijão, milho, cebola e batata e por ser um solo com elevada degradação da estrutura dos horizontes superficiais. É um solo com encrostamento superficial, o que dificulta a penetração das raízes e a infiltração de água (BENASSI, 2008).

O objetivo dessa pesquisa foi utilizar técnicas espectroscópicas para avaliar o comportamento da matéria orgânica do solo em função da sua estabilidade, ou seja, obter o grau de humificação da MO de um Cambissolo Háptico, proveniente do município de Irati - PR, submetido a dois sistemas de manejo: plantio convencional e plantio direto (de seis e de nove anos), por meio de técnicas espectroscópicas.

Para auxiliar nessa compreensão e minimizar a interferência da fração mineral, podemos estudar a MOS por compartimentos, físicos ou químicos. O fracionamento físico não promove mudanças nas características químicas do solo e permite o estudo da MOS associada aos compostos minerais. Já o fracionamento químico separa a MOS em húmica (HU), ácido fúlvico (AF) e ácido húmico (AH) a partir de critérios de solubilidade utilizando como substâncias extratoras ácidos e bases fortes. Nas frações químicas, o estudo concentrou-se no AH, que corresponde somente a uma das frações mais humificadas da MOS (CANELLAS et al., 2005).

O melhor método para medir o grau de humificação é ainda motivo de debates pois não há um modelo bem definido para as estruturas das substâncias húmicas (MILORI et al., 2002b). Por isso foram utilizadas a análise elementar (razão C/N), e a espectroscopia Fluorescência Induzida a Laser (FIL), do solo sem nenhum tratamento físico ou químico e das suas frações físicas. Para verificar a validade dos resultados obtidos, foram realizadas também medidas por espectroscopia de fluorescência dos AH, e espectroscopia de

absorção de UV-Visível (razão E_4/E_6). Essas técnicas possuem aspectos diferentes mas, entre outras existentes, permitem avaliar qualitativamente - em comparação com outras amostras - a humificação da MOS.

Outra técnica utilizada foi a espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV), que permite a caracterização dos compostos orgânicos presentes no AH. O capítulo 3 é dedicado ao estudo dessas técnicas e o capítulo 4 à descrição do instrumental utilizado. Por fim, o capítulo 5 é destinado à análise dos resultados obtidos com o uso dessas técnicas e o capítulo 6 à conclusão.

2 O solo: aspectos gerais

Neste capítulo, serão discutidos alguns temas relacionados ao solo, imprescindíveis para a compreensão deste trabalho. Os temas abordados são: a composição do solo, com ênfase em seus horizontes e sua classificação; a MOS, especialmente o grau de humificação desse material e a estrutura das substâncias húmicas (SH); a relação da MOS com as frações físicas e químicas do solo e os sistemas de manejo.

2.1 Composição do solo

Entende-se como solo a camada externa e agricultável da superfície terrestre, composta pelo material mineral e orgânico inconsolidado na superfície da terra e que serve como um meio natural para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Este material tem suas características determinadas por fatores genéticos e ambientais, pelo material de origem, pelo clima (incluindo efeitos de umidade e de temperatura), pela ação de macro e microorganismos e pela topografia, todos atuando durante um período e produzindo um novo solo, diferente do material do qual é derivado em muitas propriedades físicas, químicas, mineralógicas, biológicas e morfológicas, desenvolvidas por meio de desintegração, decomposição e recombinação (CURI, 1993; MIELNICZUK et al., 2003).

Um solo ideal é composto por 45% de compostos minerais, 30 a 35% de solução do solo, fase líquida, 15 a 20% de gases e 5% de matéria orgânica (MEURER, 2000), como mostra a Figura 1.

2.1.1 Horizontes do solo

Perfil do solo é a seção vertical de solo através de uma série de camadas superpostas, chamadas de horizontes, e estendendo-se para o material de origem (CURI, 1993).

Um solo completo apresenta um perfil formado de cinco horizontes (Figura 2), O, A, B, C e D, que diferem entre si pela cor, textura, estrutura, composição, e variam em

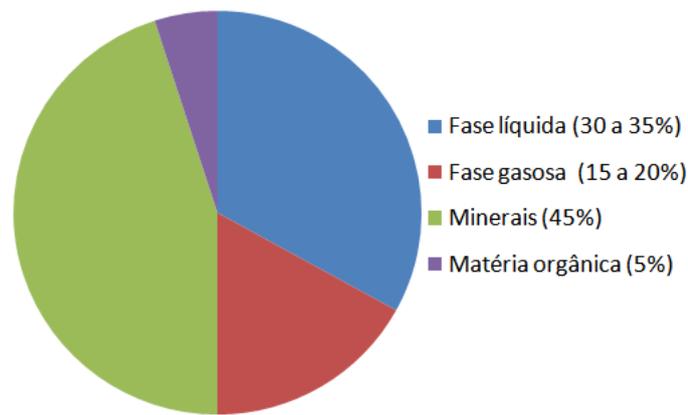


Figura 1: Composição de um solo ideal.

espessura. Esses horizontes refletem o histórico da evolução do solo e dependem do tipo de solo e dos processos pedogênicos e podem ser ainda subdivididos.

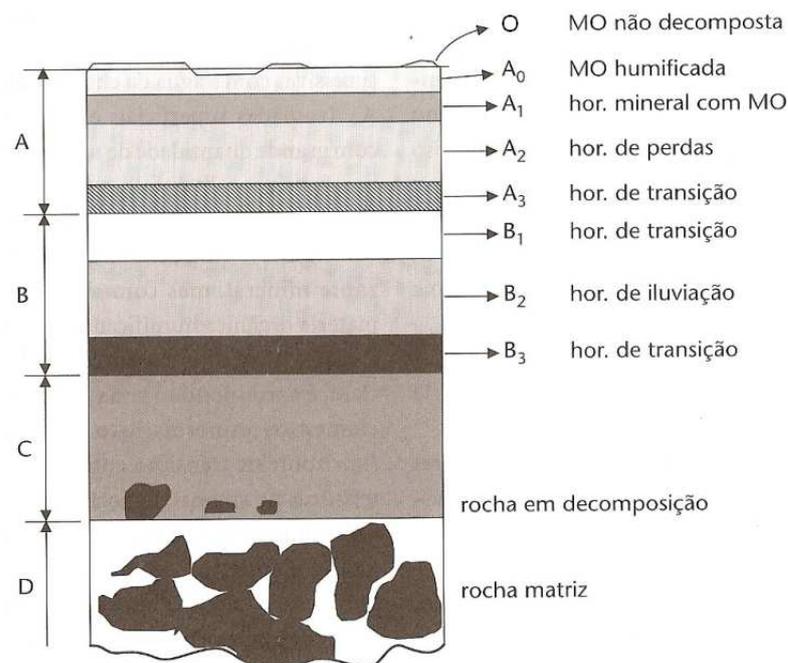


Figura 2: Horizontes em um perfil completo de solo (adaptada de REICHARDT; TIMM, 2004).

O horizonte O é a camada superficial e a de coloração mais escura. Possui constituição predominantemente orgânica por apresentar matéria orgânica fresca ou em decomposição, e por isso é denominado horizonte orgânico.

No horizonte A, ou horizonte de eluviação, a matéria orgânica decomposta está intimamente associada à fração mineral. Apresenta alta atividade biológica e coloração escura e perde elementos químicos por lavagens sucessivas pela água da chuva.

O horizonte B, ou horizonte de iluviação, é pobre em matéria orgânica e rico em argilas

ou em minerais de ferro, provenientes dos horizontes superiores e que são depositados neste horizonte pelo processo de iluviação. É caracterizado por uma coloração mais clara que o horizonte A.

O horizonte C corresponde principalmente à rocha matriz decomposta. É uma camada mineral de material inconsolidado e de profundidade. Sofre poucos processos pedogenéticos.

O horizonte D corresponde à rocha consolidada.

Além desses existem horizontes de transição (AB, BC, entre outros) e mistos (A/B, B/C...) além de denominações específicas para horizontes com características especiais (CURI, 1993; MARTINS, 2009, REICHARDT; TIMM, 2004).

2.1.2 Classificação do solo

Os solos são dispostos em classes determinadas primeiramente pelo tipo de clima em que se originaram. O solo analisado nesta pesquisa é um Cambissolo, que tem como característica ser um solo com menor profundidade, de 0,5 a 1,5 metros, ainda em processo de desenvolvimento e com material de origem na massa do solo e baixo grau de intemperização o que faz com que apresente teores de silte altos. Estão presentes os horizontes A, B e C, sendo que o horizonte B é dito incipiente, o que significa que o horizonte mineral superficial sofreu alteração em grau não muito avançado, mas com desenvolvimento de cor e estrutura (CURI, 1993; EMBRAPA, 1999).

2.2 Matéria orgânica do solo (MOS)

Embora represente uma pequena parcela na composição do solo - cerca de 5% (MEURER, 2000) -, a matéria orgânica é extremamente importante por ser responsável pela disponibilidade de nutrientes para as plantas, afetar atividade microbiana e estabilidade de agregados, influenciar fatores de pH e capacidade de troca iônica, adsorver elementos poluentes e pesticidas e auxiliar no sequestro de carbono, sendo o o maior reservatório deste elemento químico, com importantes implicações para diminuir o efeito estufa, entre outras funções.

A MOS é fonte de N, S e P às plantas e possui grande superfície específica, reativa em virtude da dissociação de grupos $COOH$, OH e NH_2 , produzindo complexos com Fe , Mn , Ca , Mn e outros (REICHARDT; TIMM, 2004; ZECH et al., 1997).

Matéria orgânica do solo é a fração constituída de compostos orgânicos de origem animal e vegetal, que sofreram decomposição de forma que a fonte se tornou irreconhecível, mas que se encontram em variados graus de transformação, desde resíduos lábeis até material recalcitrante quimicamente, humificado. No estágio mais avançado, os resíduos microbianos e produtos finais são relativamente estáveis e são chamados de húmus, apresentando como características estado coloidal, cor escura e alta estabilidade no solo (PICCOLO; CONTE, 2001; SEGNINI, 2007).

Podemos portanto dizer que a MOS é constituída por duas frações distintas, como esquematizado na Figura 3. Uma delas ativa ou lábel e biodegradável, que, em sua decomposição por microorganismos disponibiliza os nutrientes necessários para as plantas, tendo tempo de vida curto no solo. São as *substâncias não húmicas* que podem ser aminoácidos, carboidratos, proteínas, ácidos orgânicos, entre outros (SILVA; CAMARGO; CERETTA, 2000). A outra fração, chamada de *substâncias húmicas* (SH), atua como um reservatório de nutrientes e ainda mantém por longo tempo o equilíbrio do solo. É composta pelas substâncias mais estáveis quimicamente da MOS (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) por não ser mais uma potencial fonte de nutrientes, sendo o produto final da ação dos microorganismos. Esta fração apresenta os componentes mais recalcitrantes da MOS, de maior massa molecular e é responsável por guardar cerca de 85 a 90% da reserva total do carbono orgânico (C).

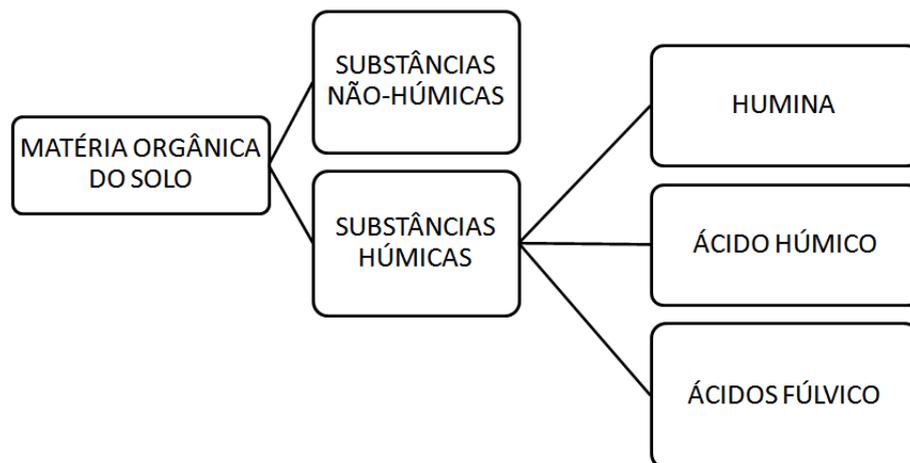


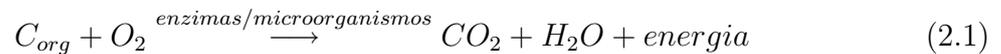
Figura 3: Fluxograma das frações químicas do solo.

A MOS é a interação complexa de processos biológicos, químicos e físicos e no solo. Esta complexidade é de importância para a fertilidade e produtividade do solo e seu conhecimento é pré-requisito para entender a estrutura, reatividade química e inerente

fertilidade dos solos para saber que tipos de fertilizantes usar e qual o manejo adequado para o solo (CHRISTENSEN, 1992).

A composição da MOS crua é muito variável, mas é possível agrupá-la, de acordo com a facilidade de transformação, em dez categorias: carboidratos (açúcares, amido, celulose e hemicelulose); ligninas; taninos; glicosídeos; ácidos, sais e ésteres orgânicos; gorduras, óleos e ceras; resinas; compostos nitrogenados, proteínas, aminoácidos, etc.; pigmentos (clorofila, xantofila, etc.); constituintes minerais (sais, ácidos, bases, etc.) (PICOLLO, 2001; REICHARDT; TIMM, 2004)

A decomposição da MOS é feita por microorganismos nativos do solo de acordo com a reação



que é o processo inverso ao da fotossíntese. Este processo leva à produção de energia, produtos simples - como o CO_2 , H_2O , sais minerais que contenham, sobretudo N e P - e húmus, constituído de numerosos compostos de elevado peso molecular.

A relação entre o teor de carbono orgânico e a estabilidade de complexos organo-minerais deve-se a matéria orgânica apresentar uma grande concentração de grupos funcionais, dentre os quais destacam-se os carboxílicos, os quais apresentam uma capacidade de estabelecer interações por ligações de coordenação com os grupos funcionais OH presentes na superfície dos minerais (CORNEJO e HERMOSÍN, 1996).

No processo de sequestro de carbono o CO_2 da atmosfera é capturado pelas plantas e, na presença de água, luz e minerais, durante a fotossíntese, é transformado em biomassa vegetal. Durante o processo biológico de decomposição dos vegetais por microorganismos, parte do carbono é devolvido à atmosfera na forma de CO_2 , parte é incorporado ao tecido microbiano e parte é convertida em húmus (SEGNINI, 2007).

Uma maior quantidade de carbono estável no solo significa diminuição da concentração de gases causadores do efeito estufa na atmosfera e o manejo adequado (plantio direto, controle da erosão, diminuição do desmatamento), pode auxiliar na retenção de carbono, impedindo a mineralização da MOS. O sequestro de carbono - transformação do carbono presente na atmosfera em carbono orgânico - ocorre por humificação, agregação ou sedimentação. Para que esse processo auxilie na redução do efeito estufa, ações como reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e sistemas de manejo conservacionistas são alternativas. Nestas situações, o aumento no teor de MO pode ser observado já com

poucos anos de adoção desses sistemas de manejo (SEGNINI, 2007). Esses sistemas em que não há revolvimento do solo e remoção dos restos de cultura, como o plantio direto, auxiliam o aporte do carbono orgânico, por favorecerem um aumento na quantidade de matéria orgânica estável, e assim no grau de humificação.

As substâncias húmicas são os componentes mais recalcitrantes da MOS, e são constituídas de uma mistura heterogênea de grupos funcionais. Estas substâncias são formadas a partir do processo de humificação, o qual altera estruturas químicas da MO pela degradação de resíduos orgânicos via lixiviação, trituração e catabolismo, sendo controlado por variáveis como temperatura, regime de água do solo (infiltração, redistribuição e condução), pH e nutrientes livres (MILORI et al., 2004).

2.2.1 Grau de humificação

Humificação é a conversão de resíduos orgânicos em humus (fração estável da MOS) por meio de atividades biológicas, síntese microbiana e reações químicas (STEVENSON, 1994). Quimicamente significa matéria orgânica decomposta. Os processos de decomposição que humificam a matéria orgânica são hidrólise, oxidação, redução e síntese por microorganismos (SEGNINI, 2007).

De acordo com Sollins et al. (1996), com o aumento do grau de humificação, a MOS torna-se mais estável, ou seja, mais resistente perante a decomposição microbiana, devido à presença de estruturas moleculares mais recalcitrantes. As estruturas aromáticas são as mais estáveis à decomposição.

O grau de humificação é avaliado por meio de medidas indiretas que analisam mudanças estruturais durante o processo de decomposição, pelo efeito do uso ou do manejo do solo (SEGNINI, 2007).

O grau de humificação está intimamente relacionado à qualidade da matéria orgânica, e por conseguinte do solo.

As SH tem influência direta na densidade aparente e agregação do solo, pois a matéria orgânica reduz a densidade aparente e solos muito densos tendem a dificultar a germinação de sementes e o crescimento de raízes, bem como a infiltração de água.

Um solo com maior quantidade de MOS apresenta maior estabilidade de agregados (SIX et al., 1999) devido à substâncias cimentantes liberadas na sua decomposição que auxiliam na formação de complexos estáveis. Estes complexos por sua vez influenciam no

tamanho e distribuição de poros que são responsáveis pela adequada infiltração e retenção de água no solo, penetração de raízes e circulação de ar (aeração) (REICHARD e TIMM, 2004).

A cor escura da maioria dos solos agrícolas é devido à estrutura das SH, e essa coloração promove maior absorção dos raios infravermelhos, favorecendo a elevação da temperatura do solo, o que influencia na germinação, crescimento e atividade microbiana.

As SH também são as principais responsáveis pela Capacidade de Troca Catiônica (CTC). Isto ocorre devido ao grande número de radicais livres presentes na estrutura das SH, associadas às substituições isomórficas no interior das argilas e pelas cargas variáveis. Ou a CTC dependente de pH que constitui-se no mais importante componente de cargas negativas dos solos tropicais, cuja magnitude aumenta com o teor de MOS. A CTC do ácido húmico varia de 250 a 400 $\text{cmol}_c \cdot \text{dm}^{-3}$.

A solubilidade das SH depende do pH do meio e da associação com materiais minerais, como argila, silte, areia e sais solúveis. Essa associação forma estruturas bi ou tridimensionais insolúveis evitando a perda de nutrientes por lixiviação em solos arenosos. Esta é uma das características da estabilidade dessas substâncias no solo.

As mudanças que ocorrem na MOS durante o processo de humificação podem estar relacionadas à oxidação preferencial dos polissacarídeos das plantas, preservando os componentes orgânicos mais recalcitrantes, como a lignina e estruturas fenólicas e compostos de origem microbiológica (MILORI et al., 2002b).

As SH aumentam a disponibilidade de nutrientes, aumentam o poder tampão, diminuem a toxicidade de *Al* às plantas, aumentam a capacidade de retenção de água no solo, reduzem as perdas de nutrientes por lixiviação (FIALHO, 2007). Os mecanismos de estabilização da MOS são a recalcitrância química, a proteção física e a interação com organo-minerais.

2.2.2 A estrutura das substâncias húmicas

No processo de humificação do solo os compostos orgânicos são parcialmente transformados em substâncias húmicas. Devido à alta complexidade dessas substâncias, várias estruturas foram propostas para explicar a composição química, forma e tamanho molecular dessas substâncias.

Schulten e Schnitzer (1993), baseados em estudos utilizando técnicas de pirólise, de-

gradação oxidativa e microscopia eletrônica propuseram uma estrutura bidimensional para o AH (Figura 4), chamado de modelo *biomacromolecular*, com características semelhantes às macromoléculas biológicas como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lignina. Segundo os autores, a composição molecular dos AH seria $C_{308}H_{328}O_{90}N_5$, com alto peso molecular, 6650, 831 g/mol e apresentando diferentes grupos funcionais como os carboxílicos, fenólicos, hidroxilas, ésteres, éteres, nitrilas entre outros.

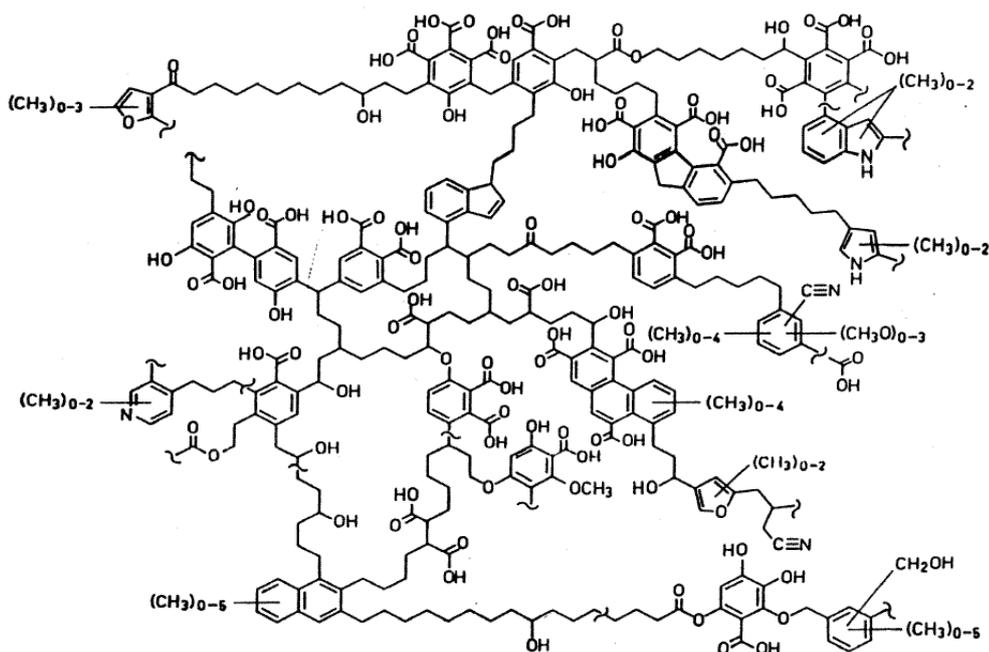


Figura 4: Modelo bidimensional proposto por Schulten e Schnitzer (1993) para a estrutura dos ácidos húmicos

Em 1997 Schulten e Schnitzer propuseram um modelo tridimensional para a molécula de AH, mostrado na Figura 5. Nesta estrutura a molécula é composta por carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio e apresenta espaços vazios onde a molécula pode interagir com outros compostos orgânicos e inorgânicos.

A representação das SH sofreu evolução e Picollo e Conte (2001) apoiaram o modelo *supramolecular*. Neste modelo as SH são moléculas pequenas e heterogêneas de várias origens que se autoorganizam, unidas entre si por forças intermoleculares fracas, o que faz essas estruturas aparentarem um grande tamanho molecular. Simpson et al. (2002) publicou uma representação para este modelo, mostrada na Figura 6. As estruturas supramoleculares crescem com o decréscimo do pH até a sua precipitação (FIALHO, 2007).

Com as pesquisas existentes até o momento, ambos os modelos, *biomacromolecular* e *supramolecular*, continuam válidos (FAVORETTO, 2007; MARTINS, 2009; SEGNINI,

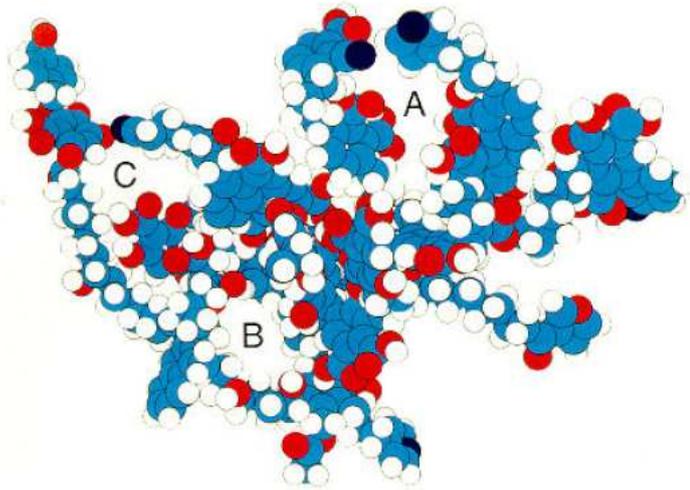


Figura 5: Modelo tridimensional proposto por Schulten e Schnitzer (1997) para a estrutura dos ácidos húmicos. Na representação temos o carbono em azul, o oxigênio em vermelho, o nitrogênio em preto e hidrogênio em branco. As letras A, B e C são espaços vazios.

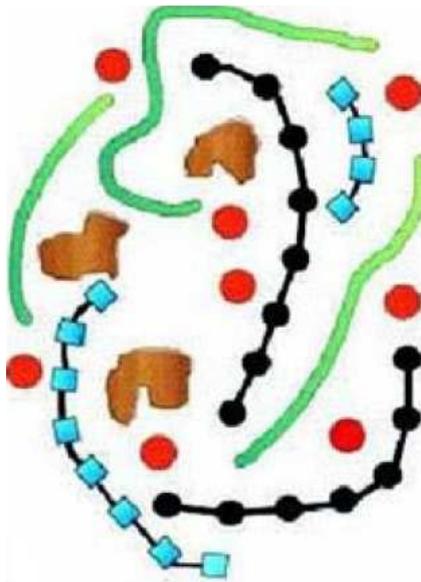


Figura 6: Modelo *supramolecular*, de Simpson et al. (2002), para substâncias húmicas. As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as pretas os polissacarídeos, as azuis os polipeptídios, as verdes as cadeias alifáticas e as marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.

2007).

2.3 MOS e frações químicas

Sabendo que as SH correspondem à fração mais humificada do solo e que podem ser separadas nas frações humina (HU), ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF), é conveniente diferenciá-las e avaliar a importância dessas frações para a compreensão da MOS.

Para obter cada uma dessas frações é utilizado o método chamado de fracionamento químico, através de propriedades de solubilidade em ácidos e bases fortes.

Humina é a fração insolúvel em qualquer pH e é muito associada à fração mineral (CLASEN et al., 1998).

Os *ácidos húmicos* correspondem à a fração escura, solúvel em meio alcalino e que precipita-se em meio ácido. São formados por polímeros, compostos aromáticos e alifáticos, de elevado peso molecular, grande CTC e densidade média de $1,6 \text{ g/cm}^3$ (ORLOV, 1974).

Os *ácidos fúlvicos* são representados pela fração colorida, solúvel em meio alcalino ou ácido diluído. Compostos por polissacarídeos, aminoácidos, compostos fenólicos, etc. Apresentam baixo peso molecular e formam complexos estáveis com *Fe*, *Cu*, *Ca* e *Mg* (MARTINS, 2009). Esta fração é a que mais sofre alterações estruturais durante o processo de humificação (CUNHA et al., 2005).

A obtenção dessas substâncias é importante pois permite a análise da MOS sem a influência da fração mineral, que pode atrapalhar algumas técnicas espectroscópicas.

Silva Neto et al. (2008) mostraram que a MOS (carbono orgânico total nas frações húmicas) é sensível à mudança no sistema de manejo em dois latossolos, sob sistema de plantio direto e que a ausência de revolvimento neste solo promove o maior contato da MOS com a matriz inorgânica, propiciando a formação de interações organominerais e conduzindo ao aumento da fração humina, em comparação ao solo sob plantio convencional.

O fracionamento químico permite a caracterização química da MOS. Esta técnica no entanto pode gerar alterações nos componentes orgânicos do solo, o que não ocorre pelo fracionamento físico que simplesmente separa as frações de acordo com o tamanho das partículas.

2.4 MOS e frações físicas

As partículas sólidas do solo variam com relação à sua qualidade e ao tamanho, e o fracionamento físico, de acordo com o tamanho dessas partículas, permite separar a MOS de acordo com a sua associação com componentes minerais, isto é, dos compartimentos da MOS que são essas frações e que possuem diferentes funções no solo.

O fracionamento por tamanho de partículas é baseado no conceito de que frações de

MOS associadas a partículas de diferentes tamanhos (e também diferentes composições mineralógicas) diferem na estrutura e função (CHRISTENSEN, 1992). A quantificação das frações permite relacionar a concentração de cada uma com o teor de C, a humificação da MOS e sistema de manejo adotado.

As técnicas de fracionamento físico são consideradas menos destrutivas, e os resultados obtidos da fração física relatam mais diretamente a estrutura e função da MOS *in situ* (CHRISTENSEN, 1992).

A divisão tradicional dessas frações, chamadas de frações texturais, é : argila (ar), silte (sl) e areia, sendo que esta última pode ser subdividida em areia fina (af) e areia grossa (ag). A Figura 7 mostra as frações do solo com base no diâmetro, de acordo com a Escala Internacional ou de Atterberg (REICHARDT; TIMM, 2004; CURI, 1993).

Figura 7: Tamanhos de partículas, em mm das frações físicas do solo, de acordo com a escala de Atterberg.

Para obter as frações do solo com as partículas de maior diâmetro é possível fazer um peneiramento do solo seco ao ar em uma sequência de peneiras. Um dos processos que permite separar as partículas de menores diâmetros é por meio de sedimentação, que se baseia no fato de que partículas de tamanhos diferentes possuem velocidades diferentes de decantação em solução aquosa. Este foi o procedimento utilizado neste trabalho e é descrito na seção 4.2.

A fração argila é a que mais influencia o comportamento físico do solo. Devido à sua maior área específica¹ a fração argila é a mais ativa nos processos físico-químicos. São essas partículas as responsáveis por absorver água e pelos processos de expansão e contração devido a essa absorção. Grande parte das partículas de argila são negativamente carregadas e há a formação de uma dupla camada iônica com a água ou com íons da solução do solo (MIELNICZUK et al., 2003; REICHARDT; TIMM, 2004), o que faz com que a matéria orgânica se estabilize fisicamente (SALTON et al., 2008).

As frações areia e silte possuem área específica relativamente pequena e por isso não apresentam grande atividade físico-química. Essas frações são responsáveis pela macroporosidade do solo e influenciam os fenômenos de distribuição de água no solo.

¹Área por unidade de massa.

Segundo Conceição et al. (2008), em solos tropicais e subtropicais sob sistema plantio direto e pastagem a proteção física da MOS por oclusão em agregados estabiliza e acumula C orgânico. Pinheiro et al. (2004) verificaram que a fração leve livre é mais sensível à degradação pelo cultivo em diferentes tipos de manejo do solo.

Em um estudo com um Cambissolo Húmico utilizando ressonância paramagnética eletrônica (RPE), Bayer et al. (2003) concluíram que a fração granulométrica 20-2 μm (fração silte) apresentou maior grau de humificação da MOS e maior interação com a fração mineral, comparativamente aos demais tamanhos de partículas.

Segundo Christensen (1992), quanto menor o tamanho da fração maior o grau de humificação associado a ela. Para Saab e Martin-Neto (2003), a fração silte é mais estável que as demais devido a maior recalcitrância da MOS ou pela sua ligação com a fração organo-mineral. Favoretto et al. (2008) atribuíram a estabilidade da MOS na fração argila à proteção física pela fração organo-mineral e não a sua humificação.

Segundo Oades (1989), a proteção física e coloidal resultantes da interação da MOS com a fração mineral, especialmente a fração argila, é a principal causa da manutenção da MOS e solos de regiões tropicais.

2.5 MOS e Sistemas de Manejo

O sistema de manejo tem influência na quantidade e na qualidade da MOS (BAYER et al., 2002b; 2003; MARTINS, 2009; SEGNINE, 2007). Discutiremos nesta seção dois sistemas de manejo relacionados a este trabalho: o plantio direto (PD) e o plantio convencional (PC) e a influência desses sistemas na MOS.

Plantio Direto: Plantio direto é uma técnica conservacionista onde o solo é mantido sempre coberto por resíduos vegetais (NOVOTNY, 2002). A semente é colocada diretamente no solo não revolvido, usando-se máquinas especiais. A deposição da semente é feita em um pequeno sulco (ou cova), com dimensões suficientes para garantir uma boa cobertura e contato da semente com o solo, sendo que não mais que 30% da superfície do solo são preparados. O extermínio de plantas daninhas antes e depois do plantio é geralmente feito com herbicidas (CURI, 1993). Manter a cobertura vegetal protege o solo do impacto das gotas de chuva, do escoamento superficial e das erosões eólica e hídrica e aumenta a atividade biológica (GASSEN; GASSEN, 1996). A Figura 8 mostra um exemplo de solo cultivado em plantio direto.



Figura 8: Solo sob plantio direto. (Adaptado de Segnine, 2007).

Plantio Convencional: No plantio convencional, o solo é preparado para receber as sementes com aração, escarificação e gradagem. Este processo descompacta o solo e retira a palha, não permitindo a formação do horizonte orgânico. A aração promove a homogeneização da camada arável e incorporação da palha (MARTINS, 2009). A Figura 9 mostra exemplos do manejo convencional.



Figura 9: Plantio convencional. (a) Processo de aragem do solo. (b) Plantação sob o solo após a aragem (SEGNINE, 2007).

Bayer et al. (1996), Favoretto (2007), Martins (2009) e Testa (1989), obtiveram aumento no teor de carbono e de nitrogênio em solos sob plantio direto, comparando com dados obtidos em solo sob plantio convencional.

No plantio direto, a entrada de material orgânico no solo é constante e maior que em sistemas de manejo convencionais (SEGNINI, 2007). Por não haver o revolvimento do solo, ocorre o favorecimento da acumulação contínua de resíduos vegetais na superfície e aumento da fração orgânica biodegradável. Assim, há sempre resíduos frescos disponíveis para os microorganismos, às vezes em maiores quantidades que a capacidade de metabolização desses microorganismos. Devido a isso, a MOS não é totalmente decomposta e é rica em cadeias alifáticas apresentando pequena quantidade de carbonos aromáticos, o que

faz com que esse sistema de manejo seja, geralmente, o menos humificado (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004, BAYER et al., 2003), com aumento da quantidade de MOS lábil.

No plantio convencional, o revolvimento e a retirada da cobertura vegetal reduz o estoque de carbono, promove o selamento superficial e não evita a erosão devido às enxurradas. A aração e a gradagem promovem maior taxa de decomposição da MOS e menor adição de resíduos (FAVORETTO, 2007). A distribuição dos resíduos na camada arável disponibiliza poucos nutrientes para os microorganismos e por isso solos sob o sistema de manejo convencional geralmente apresentam processo de humificação em estágio mais avançado, com aumento da concentração de estruturas recalcitrantes como estruturas aromáticas condensadas (BAYER, 2002b; SEGNINE, 2007). Além disso, o revolvimento propicia a estabilidade física da MOS, por meio da interação com a fração mineral.

Dependendo das práticas adotadas, o solo pode atuar como fonte ou dreno de CO_2 . Em sistemas nativos ou com plantio conservacionista, há um equilíbrio entre a absorção e a emissão de carbono pelo solo. Já em sistemas como o plantio convencional, onde há arações e gradagens, a população de microorganismos é ativada. Estes consomem mais rapidamente a MOS, chegando até mesmo ao carbono estocado no húmus, liberando gases geradores de efeito estufa e diminuindo o grau de humificação. A estabilidade física da MO é eliminada devido à ruptura de agregados organo-minerais e ao aumento da oxigenação do solo (SEGNINI, 2007).

3 *Técnicas de análise da humificação e caracterização da MOS*

A seguir, serão descritas técnicas utilizadas neste trabalho, começando pela análise elementar, a razão C/N , e fazendo também uma breve descrição das técnicas espectroscópicas.

3.1 *Análise elementar: razão C/N*

A razão C/N é uma importante característica da MOS que varia muito de acordo com a sua origem e estabelece a disponibilidade do nitrogênio para as plantas e microorganismos, e por isso permite estimativas do grau de humificação da MOS. Quanto menor a razão, maior o grau de humificação (H), pois as taxas de C diminuem com relação à quantidade de N no processo de decomposição.

$$\frac{C}{N} \downarrow \iff H \uparrow \quad (3.1)$$

Na decomposição, os microorganismos utilizam o carbono como fonte de energia e síntese de biomoléculas, e o nitrogênio é consumido em seu metabolismo a uma taxa muito menor para a síntese de proteínas. Um alto teor de N com relação ao de C indica estado de decomposição mais avançado e portanto a matéria orgânica está mais estável, com caráter aromático do carbono mais acentuado. O nitrogênio também é liberado por processos de mineralização, e vai para a solução do solo na forma de NO_3 .

Reichardt e Timm (2004) afirmam que, independente do valor da razão C/N dos resíduos, a transformação da MOS leva a um abaixamento exponencial da relação. O valor ideal para a decomposição é 30/1 e pode chegar a valores de 10/1 a 12/1, típicos do húmus, sendo que o tempo de transformação varia com o tipo de resíduo. Esta relação

indica a aromaticidade da SH, determina o grau de estabilidade da MOS e estabelece uma previsão da taxa de decomposição da SH (; FAVORETTO, 2007 MARTINS, 2009; SEGNINI, 2007).

Autores como Bayer (1996), Favoretto (2007), Martins (2009) e Segnini (2007) utilizaram a análise da razão C/N , em conjunto com outros métodos, para estudar a humificação da MOS. Segnini (2007) afirma que a diferença de C é maior nas camadas superficiais devido à maior entrada e ao acúmulo de biomassa de plantas. Favoretto (2007) encontrou valores para esta razão em acordo com os resultados obtidos por outras técnicas, ou seja, no PD o valor da razão C/N foi superior ao encontrado para o PC, indicando maior humificação do solo sob PC. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins (2009), que também analisou a razão de acordo com a profundidade, e verificou que as amostras de camadas superficiais (entre 0 e 5 cm de profundidade) são as menos humificadas. Ao analisar frações por tamanho de partículas por este método, o mesmo autor obteve maior humificação para a fração areia e ao analisar a correlação da humificação obtida pela razão C/N e por fluorescência induzida a laser (FIL) obteve $r^2 = 0,85$.

3.2 Técnicas espectroscópicas de análise da humificação e caracterização da MOS

Métodos espectroscópicos não são destrutivos e fornecem resultados de alta precisão por meio dos quais pode-se determinar a estrutura química, os elementos e grupos funcionais de uma substância. A espectroscopia a ser utilizada depende da natureza dos compostos analisados, e a análise é feita comparando os espectros de absorção ou emissão da substância com certos parâmetros de referência.

As técnicas espectroscópicas permitem a análise de materiais devido à transmissão, absorção ou reflexão da radiação incidente. Essa análise é feita por meio do gráfico da intensidade de radiação (transmitida, absorvida ou refletida) por comprimento de onda, frequência ou número de onda. Este gráfico é chamado de espectro.

A Figura 10 mostra as características da radiação ultravioleta, luz visível e na faixa do infravermelho, utilizadas nesse trabalho.

Discutiremos agora as técnicas espectroscópicas utilizadas nesta pesquisa: espectroscopia de fluorescência, de AH e induzida a laser (FIL); espectroscopia de absorção de luz UV-Visível (razão E_4/E_6) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV).

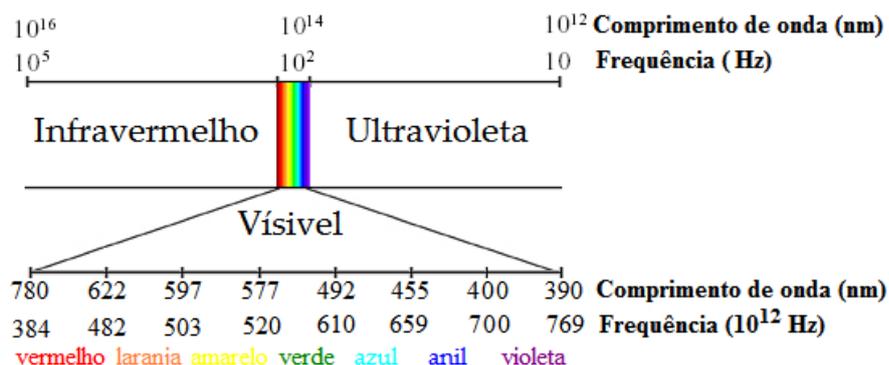


Figura 10: Espectro eletromagnético nas faixas do ultravioleta, visível e infravermelho.

3.2.1 Espectroscopia de fluorescência

São descritos a seguir o fenômeno da fluorescência e as técnicas de fluorescência de AH, com seus dois métodos, e a de fluorescência induzida a laser (FIL).

3.2.1.1 O fenômeno da fluorescência

O fenômeno físico fluorescência consiste na emissão de um fóton quando um elétron que adquiriu energia devido a um processo de excitação (térmica, mecânica, eletromagnética, química ou biológica) retorna ao seu estado inicial, instantaneamente, ou seja, com um intervalo de tempo muito curto (10^{-8} s) entre a excitação e a emissão¹.

As moléculas apresentam diferentes níveis energéticos e aos elétrons é permitido transitar entre esses níveis desde que absorvam ou emitam um fóton de energia igual à energia de separação entre dois níveis. A energia necessária para que as transições eletrônicas ocorram é da ordem de diversos eV, e por isso os fótons emitidos ou absorvidos quando tais alterações ocorrem estão na região do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (ATKINS, 1998, SENESI, 1990).

Considerando o caso em que um fóton de energia $E = hf$ (onde h é a constante de Planck e f a frequência da radiação) é absorvido por um sistema de átomos ou moléculas. Se essa energia é suficiente para que o sistema sofra uma transição para um estado excitado, os elétrons saltam para níveis energéticos superiores com relação ao nível inicial do sistema. Para retornar ao estado fundamental (estado de menor energia) a energia deve ser dissipada, o que normalmente ocorre por decaimentos não radioativos onde o excesso de energia é convertido internamente em energia térmica por meio vibrações, rotações

¹Há casos em que o tempo entre a excitação e a emissão é mais longo e o processo é chamado de fosforescência (SHARMA; SCHULMAN, 1999).

e translações. A fotoluminescência ocorre quando o descarte de energia é feito com a emissão de um fóton (ATKINS, 1998, NOVOTNY, 2002).

A Figura 11 esquematiza o processo. Nela, a absorção de um fóton provoca a transição eletrônica do estado fundamental (S_0) para o primeiro estado excitado (S_1). Por meio de colisões com as moléculas vizinhas ocorre a dissipação não radioativa de parte dessa energia, em transições entre os subníveis vibracionais (na Figura, V_3 , V_2 e V_1) até atingir V_1 , o subnível de menor energia do primeiro estado excitado. A molécula então emite um fóton, de energia menor (e portanto maior comprimento de onda) que a do absorvido, retornando ao estado fundamental - fenômeno da fluorescência (ATKINS, 1998, SENESI, 1990).

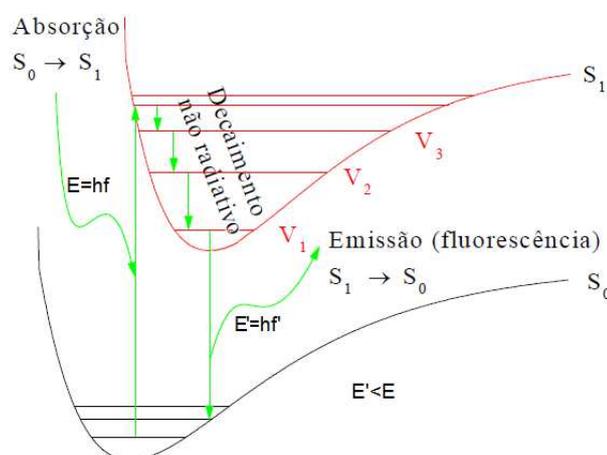


Figura 11: Diagrama energético do fenômeno da fluorescência. S_0 é o nível fundamental, S_1 é o primeiro nível excitado, V_1 , V_2 e V_3 são os subníveis vibracionais do S_1 (Adaptado de Novotny, 2002). $E = hf$ é a energia absorvida pelo elétron e $E' = hf'$ é a energia emitida, sendo h a constante de Planck e f e f' são a frequência da radiação incidente e emitida, respectivamente.

Quando após uma excitação eletromagnética ocorre a emissão de fótons com a mesma frequência da radiação estimulante, sem a necessidade de relaxação vibracional, a fluorescência é chamada de ressonante (EWING, 1972). Se o estado excitado não é o primeiro acima do fundamental, o sistema reemite o excesso de energia ao sofrer uma transição para outro estado de menor energia ou para o estado fundamental com a emissão espontânea de um ou mais fótons, sofrendo relaxação vibracional em cada estado excitado (EWING, 1972; TIPLER et al., 2001).

No estado fundamental, os elétrons compartilham o mesmo orbital e tem spins anti-paralelos ou emparelhados ($\uparrow\downarrow$), resultando no spin total S nulo ($S' = -1/2 + 1/2 = 0$). A multiplicidade deste estado, dada por $|2S| + 1$, é 1, e um estado com essa característica é chamado de singlete. Quando os elétrons estão em orbitais diferentes seus spins são paralelos ($\uparrow\uparrow$ ou $\downarrow\downarrow$), o spin total S é $+1$ ou -1 e a multiplicidade é 3. O estado é então

chamado de tripleto. Um estado singleto pode ser convertido em tripleto se houver um cruzamento entre sistemas que desemparelhe os elétrons do estado singleto, o que ocorre no ponto onde as curvas de energia potencial desses dois estados se interceptam (Figura 12). Estas transições podem ocorrer na presença de acoplamento spin-órbita (ATKINS, 1998, SENESI, 1990).

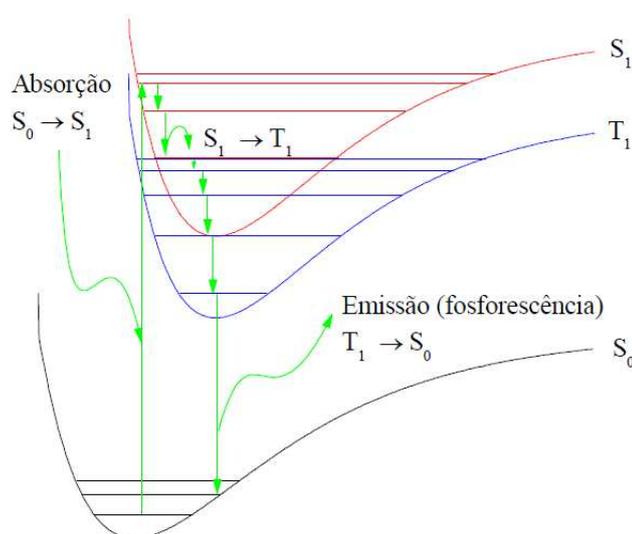


Figura 12: Diagrama energético do fenômeno da fosforescência. S_0 é o estado singleto fundamental, S_1 é o primeiro estado singleto excitado, T_1 é o primeiro estado tripleto excitado (Adaptado de Novotny, 2002).

Se a molécula excitada sofre a transição $S_1 \rightarrow T_1$, ela passa a sofrer relaxação dos subníveis vibracionais do estado tripleto, até o de menor energia. A transição deste subnível para o S_0 só é permitida devido a quebra da regra de seleção (que diz que a variação de spin, ΔS , da molécula deve ser nula) devido ao acoplamento spin-órbita, responsável pelo cruzamento entre sistemas. A emissão então é fraca e duradoura, e é chamada de fosforescência (ATKINS, 1998, NOVOTNY, 2002).

Para que este fenômeno ocorra, é necessário que elétrons não ligantes (n) ou ligantes (π) sejam promovidos à orbitais antiligantes (π^*). Estes processos são prováveis em moléculas que contenham átomos com pares de elétrons não compartilhados, o que é o caso do nitrogênio e do oxigênio em estruturas aromáticas e sistemas alifáticos, com deslocalização eletrônica, como é o caso das SH. Com o aumento da complexidade do sistema (humificação), a separação energética entre o S_1 e o S_0 tende a cair, e o comprimento de onda da emissão fluorescente torna-se maior (SENESE, 1991).

Assim, entre as moléculas orgânicas, apresentam fluorescência as que tem estruturas grandes, rígidas e multicíclicas (EWING, 1972) o que faz com que as técnicas espectroscópicas que utilizam este fenômeno sejam adequadas para avaliar o grau de humificação

da MOS, já que a MOS humificada é composta de moléculas com estas qualidades (anéis aromáticos e quinonas são estruturas fluorescentes intrínsecas às moléculas húmicas) (MILORI et al., 2002b).

O espectro de fluorescência consiste da soma de espectros individuais de diferentes focos emissores presentes na molécula (MILORI et al., 2002a) e a sua análise demonstra grande sensibilidade por ser uma técnica bastante seletiva, pois os comprimentos de onda de excitação e emissão dependem do composto de interesse, o que faz com que o sinal obtido seja característico de cada molécula. Variações neste sinal podem indicar transformações sofridas pelo composto (FIALHO, 2007).

Destacada a importância das SH, é necessário discutir um meio de medir o grau de humificação da MOS. Técnicas como Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), entre outras, podem ser utilizadas, no entanto é necessário realizar o fracionamento químico do solo, um processo lento e trabalhoso e que pode alterar as características do solo (FELLER; BEARE, 1997).

A técnica de fluorescência tem vantagens sobre as demais por ser mais seletiva, ter potencial para ser quantitativa e qualitativa, e não ser afetada pela presença de água ou teor de ferro. Esta característica é importante para os solos brasileiros que, especialmente os latossolos, em geral, ricos em Fe^{3+} , uma substância paramagnética que precisa ser retirada da amostra para a realização de análises de RMN e RPE.

Uma das técnicas utilizadas nesse trabalho analisa o espectro de fluorescência de ácidos húmicos para obter o grau de humificação da MOS, obtido por fracionamento químico.

Um método alternativo é a Fluorescência Induzida a Laser (FIL) que permite a análise de solos inteiros, isto é, a amostra do solo é coletada, moída e peneirada, sem a necessidade de maiores tratamentos. A espectroscopia de FIL pode também ser aplicada em solos com alto teor de ferro e sem tratamento químico. A análise feita é qualitativa.

3.2.1.2 Espectroscopia de fluorescência de AH

Esta técnica para determinação do grau de humificação utiliza-se AH em solução. De acordo com Milori et al. (2002b), estas análises podem ser feitas utilizando três métodos: Método de Zsolnay et al. (1999), Método de Milori et al (2002b) e o método proposto por Kalbitz et al. (1999). Apresentam-se aqui os dois primeiros, utilizados neste trabalho.

Método de Zsolnay et al. (1999) Neste método é utilizado o comprimento de onda para excitação de 240 nm e a varredura ocorre entre 350 e 650 nm. O espectro total de emissão é dividido em quatro regiões e o grau de humificação é calculado pela razão entre a área do último quarto A_4 (entre 570 e 641 nm) e a área do primeiro quarto A_1 (entre 356 e 432 nm), ambos mostrados na Figura 13.

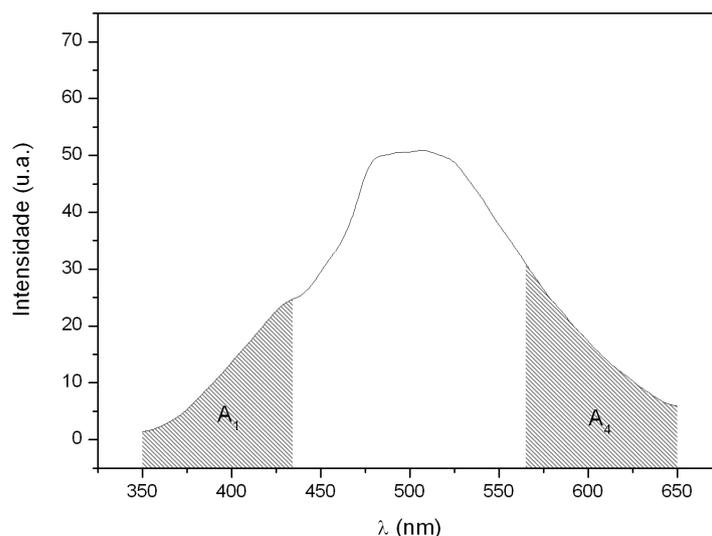


Figura 13: Os quartos A_1 e A_4 de um espectro de fluorescência de AH (u.a. significa unidade arbitrária).

Este método baseia-se na ideia de que, quando as moléculas tornam-se mais condensadas, seu espectro de emissão² tende a deslocar-se para maiores comprimentos de onda (menor energia). Assim A_4 representa a fluorescência de estruturas mais humificadas e A_1 a de estruturas mais simples e A_4/A_1 deve aumentar com o aumento da concentração de moléculas mais condensadas, ou seja, com o aumento da humificação (MILORI et al., 2002b; ZSOLNAY et al., 1999).

$$\frac{A_4}{A_1} \uparrow \iff H \uparrow \quad (3.2)$$

O problema encontrado por Milori et al. (2002b) para esta metodologia é que, nesta faixa do espectro, muitas estruturas fluorescentes são excitadas.

Utilizando métodos de fluorescência de AH para estudar o processo de compostagem, Fialho (2007) identificou reações de transformação de moléculas orgânicas mais simples para estruturas mais complexas, com base na análise do espectro que mostrou uma di-

²O espectro de emissão é obtido medindo-se a intensidade relativa da radiação emitida como função do comprimento de onda, mantendo-se constante o comprimento de onda de excitação.

minuição da intensidade das bandas de emissão de comprimentos de onda menores com simultâneo aumento da intensidade de regiões de maiores comprimentos de onda.

Método de Milori et al. (2002b) Milori et al. (2002b) propuseram um método alternativo, baseando-se no fato de que, utilizando comprimentos de onda na faixa do azul para a fonte de excitação, a absorção é mais ressonante com estruturas cuja concentração aumenta com o avanço do processo de humificação da MOS. Assim, a área total do espectro de fluorescência A_{465} , apresentada na Figura 14, é proporcional ao grau de humificação, nas condições: concentração de AH de 20 mg/L e o pH em torno de 8.

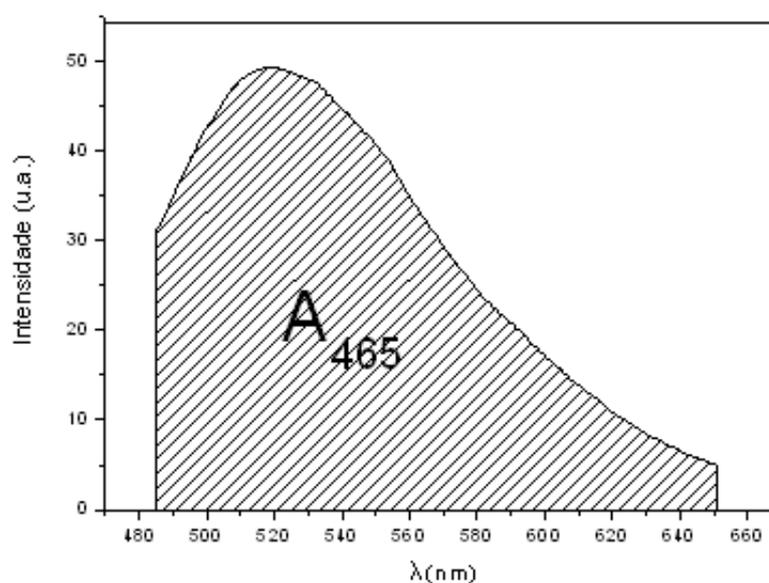


Figura 14: A área abaixo da curva em um espectro de fluorescência de AH, com excitação de 465 nm.

Neste método, uma alta intensidade de fluorescência está relacionada a um alto grau de humificação. Comparando com os demais métodos de fluorescência e com dados de humificação medidos utilizando RPE, Milori e colaboradores verificaram que este método, que utiliza excitação em 465 nm e a varredura entre 485 e 650 nm, é eficiente.

Ainda segundo os mesmos autores, este método torna-se uma alternativa interessante por ser rápido, relativamente barato, e acessível a um grande número de laboratórios quando comparado à outros métodos para medir grau de humificação da MOS. Além disso, a tecnologia necessária para obtenção de luz azul é mais simples que a para obter radiação na faixa do ultravioleta, utilizada no método anterior.

3.2.1.3 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL)

Ainda de mais fácil obtenção é o grau de humificação dado por FIL, já que não há necessidade de fracionamento químico do solo nem de preparação de solução, pois esta técnica permite a análise do solo inteiro³.

A técnica consiste em excitar o solo com um laser cuja emissão está na região do ultravioleta/azul (458 nm) o que resulta na fluorescência de grupos funcionais da matéria orgânica relacionados com o processo de humificação, que ocorre na região do visível com pico em aproximadamente 510 nm. Assim, a fluorescência total é obtida medindo-se a área sob a curva (MILORI et al., 2006).

A intensidade do sinal é relacionada à presença de estruturas aromáticas condensadas e por isso fornece informação sobre a magnitude da recalcitrância da MOS. Para comparar a intensidade de fluorescência de diferentes amostras de solo intacto é necessário normalizar esse valor pelo conteúdo de carbono do solo, já que a humificação é também proporcional à quantidade de *C* orgânico. Esta normalização é similar a trabalhar com soluções de mesma concentração, da mesma forma que foi feito para se aplicar o índice A_{465} . O grau de humificação da MOS (H_{FIL}) é obtido dividindo a área sob a curva de emissão (A_{FIL}) pelo teor de carbono (C), obtido por análise elementar (MILORI et al. 2004):

$$H_{FIL} = \frac{A_{FIL}}{C} \quad (3.3)$$

Assim, variações na intensidade de emissão do espectro normalizado podem ser associadas à variações estruturais dos fluoróforos. Como a excitação é na região do azul/ultravioleta próximo, a área sob a emissão de fluorescência normalizada deve ser proporcional ao grau de humificação.

Para obter o espectro é utilizado o sistema de FIL mostrado na Figura 15. A montagem experimental consiste em um laser de argônio, para excitação da amostra, diante dele é utilizado um prisma, para separação da emissão laser da fluorescência do gás. Espelhos conduzem a radiação até amostras de solo. Uma lente é utilizada para coletar e focalizar a fluorescência até um modulador óptico (“optical chopper”). A fluorescência passa então por um filtro para suprimir a excitação no sistema de detecção e por um monocromador (CVI, L=25 cm). A detecção é feita por uma fotomultiplicadora e o sinal elétrico passa por um amplificador lock-in. Um microcomputador dotado de uma placa de aquisição

³Como solo inteiro entende-se um solo que não passou por tratamento físico ou químico, sendo o mais próximo possível de suas condições naturais.

e software de controle faz a aquisição dos dados (MILORI et al., 2002a,2006; SEGNINI, 2007).

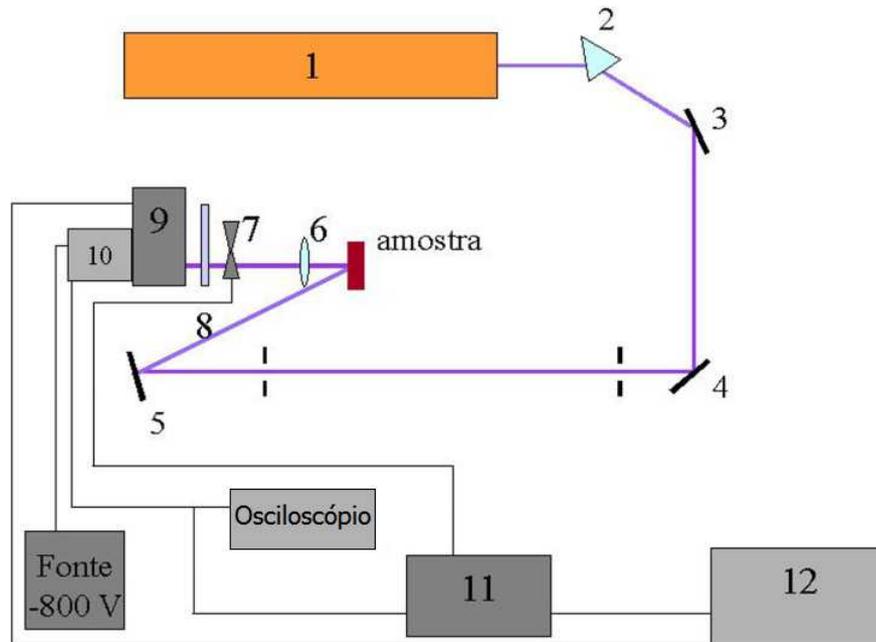


Figura 15: Sistema para a medida de FIL (MILORI et al. (2002a)): laser de argônio (1), prisma (2), espelhos (3,4 e 5), lente (6), modulador óptico (“optical chopper”) (7), filtro (8), monocromador (9), fotomultiplicadora (10), amplificador lock-in (11), microcomputador (12).

Para comprovar que a origem do sinal de fluorescência é realmente a matéria orgânica do solo, Milori et al. (2002a, 2006) fizeram duas medidas de fluorescência. Uma para o solo sem tratamento e a outra com o mesmo solo submetido a calcinação e tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para a retirada da matéria orgânica. O resultado está na Figura 16 onde pode-se verificar que o sinal da fluorescência praticamente se anula quando não há matéria orgânica, comprovando que o espectro, proveniente da excitação do solo por luz ultravioleta/azul, é devido somente a matéria orgânica.

Utilizando esse procedimento MILORI et al., (2002a, 2006) analisaram as camadas superficiais de solos submetidos a plantio direto, cerrado nativo e plantio convencional e constataram que o grau de humificação é maior para o último desses, devido à uniformização dessa camada por ocasião das operações de lavração e gradagem.

Martins (2009) e Favoretto (2007), utilizando FIL para estudar latossolos, verificaram que amostras de solo inteiro sob PC apresentaram os maiores índices de humificação e as amostras sob PD apresentaram menor grau de humificação. Para as frações do solo, a fração areia apresentou-se como a mais humificada e a fração argila menos humificada.

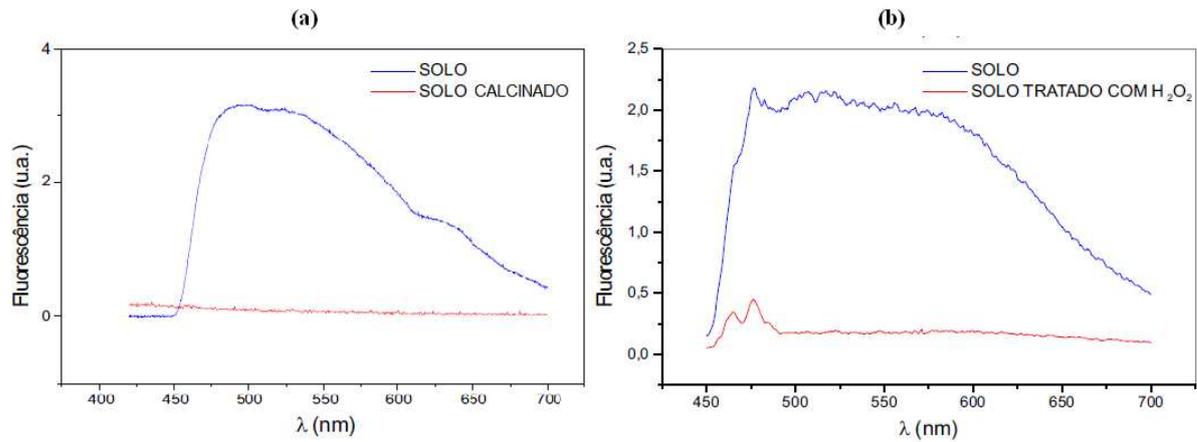


Figura 16: Emissão de fluorescência de uma amostra de solo medida em laboratório. Em azul o espectro do solo; em vermelho, o espectro do mesmo solo após tratamento para a retirada da matéria orgânica: (a) por calcinação; (b) por tratamento com H_2O_2 . (MILORI et al., 2002a).

3.2.2 Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível (razão E_4/E_6)

As espectroscopias nas faixas da luz visível e do ultravioleta baseiam-se na excitação eletrônica das ligações químicas e utilizam radiações de comprimentos de onda na faixa de 10^{-6} a 10^{-7} m e 10^{-7} a 10^{-9} m, respectivamente.

A intensidade da luz cai exponencialmente quando passa através da amostra. Experimentalmente, sua intensidade é medida utilizando a *lei de Beer - Lambert* para um certo comprimento de onda:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon cl \quad (3.4)$$

onde I_0 é a radiação incidente na amostra e I a radiação transmitida pela amostra, assim, $I_0 - I$ é a radiação absorvida. O valor de c indica a concentração da amostra, l é o caminho ótico que a radiação percorre pela cela e ϵ é absorvidade molar (SAAB, 1999).

A absorção molecular na região do ultravioleta (200 – 400 nm) e do visível (400 – 800 nm) depende da estrutura eletrônica da molécula. A energia é absorvida de forma quantizada e induz a passagem dos elétrons ligantes (σ e π) e os não ligantes (n) para orbitais mais energéticos em um estado excitado (σ^* e π^*), denominados antiligantes, como mostra a Figura 17 (SILVERSTEIN et al., 1994).

Mesmo a absorção de energia sendo quantizada, o espectro de absorção é de bandas, obtido pela fusão de linhas discretas devido à multiplicidade de subníveis vibracionais e rotacionais em moléculas complexas. Essas bandas têm posição e intensidade definidas.

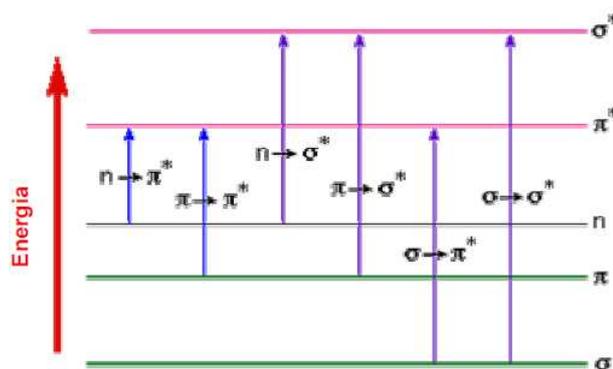


Figura 17: Diagrama de excitações eletrônicas que podem ocorrer em moléculas orgânicas (FIALHO, 2007).

A posição corresponde ao comprimento de onda necessário para que a transição eletrônica ocorra. A intensidade é proporcional à probabilidade de ocorrência da transição, à concentração da molécula em estudo e depende da diferença entre os estados fundamental e excitado (SILVERSTEIN et al., 1994).

O comprimento de onda da absorção de luz UV-Visível para compostos orgânicos aumenta proporcionalmente ao aumento da condensação dos anéis aromáticos, como pode-se avaliar na Figura 18.

Este aumento no comprimento pode ser explicado, analisando a molécula como um poço de potencial infinito de largura L , ao qual um elétron está submetido. A equação de Schroedinger diz que o modo fundamental (cuja energia é $E_1 = \frac{\pi^2 \hbar^2}{2mL^2}$) possui comprimento de onda $\lambda = L/2$. Portanto, quanto maior for à largura do poço (no caso em estudo, da molécula) maior será o comprimento de onda no estado fundamental (TIPLER et al., 2001).

Utilizando esta propriedade, o estudo da humificação de substâncias húmicas do solo utiliza a razão E_4/E_6 , entre a absorção a 465 nm (E_4) e 665 nm (E_6). Como as moléculas dessas substâncias são complexas, a intensidade da absorção a 665 nm deve aumentar relativamente à intensidade em 465 nm em substâncias mais humificadas, o que promove o decréscimo desta razão. Assim, uma razão E_4/E_6 alta indica presença de mais estruturas alifáticas e baixa razão indica um alto grau de condensação dos constituintes aromáticos, e por conseguinte, alto grau de humificação, sendo que, para ácidos húmicos, esta razão costuma ter um valor menor que 5 (FIALHO, 2007; MARTIN-NETO et al. 1998).

$$\frac{E_4}{E_6} \downarrow \iff H \uparrow \quad (3.5)$$

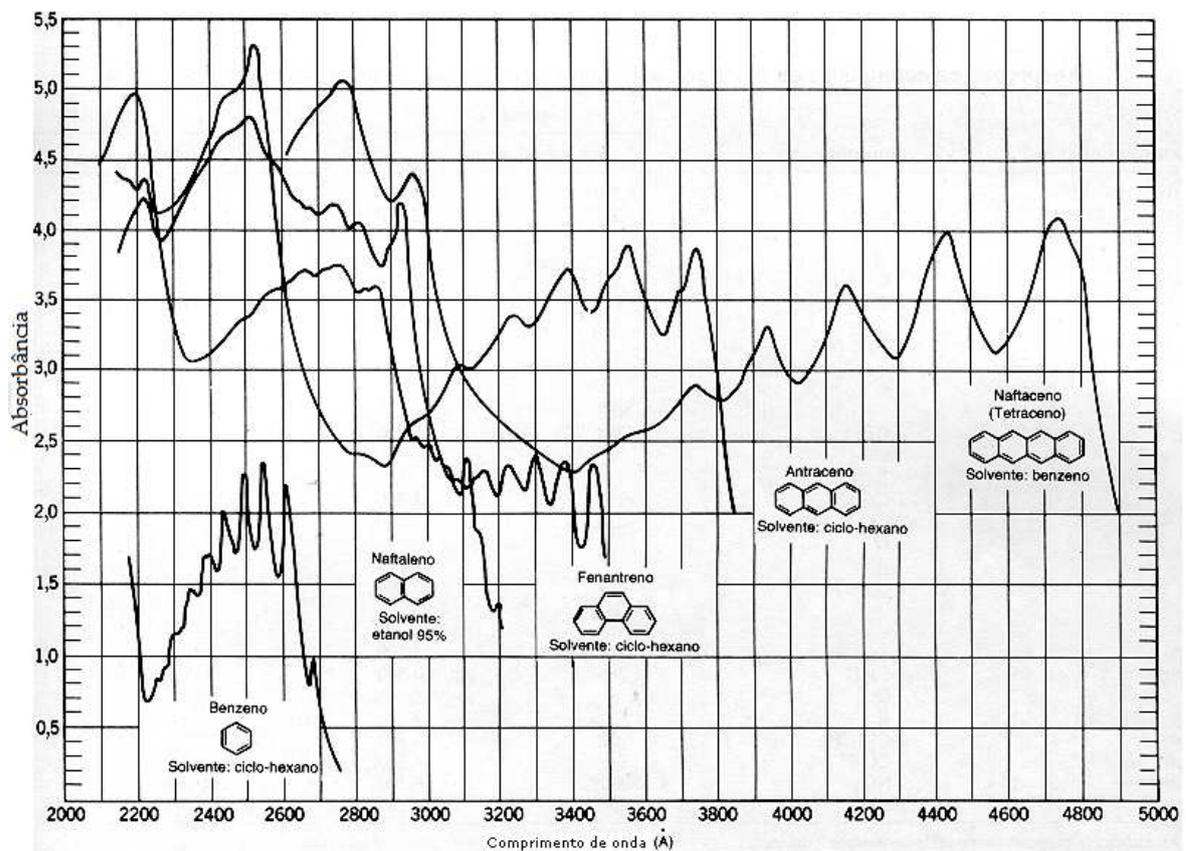


Figura 18: Espectros de absorção eletrônica do benzeno, naftaleno, fenantreno, antraceno e naftaceno (adaptado de SILVERSTEIN et al., 1994).

Um exemplo do espectro obtido por absorção de UV-Visível de ácidos húmicos é mostrado na Figura 19, com marcações nas intensidades de 465 nm e 665 nm.

Utilizando a razão E_4/E_6 da absorção de UV-Vísivel para estudar o processo de compostagem, Fialho (2007) identificou reações de transformação de moléculas orgânicas mais simples para estruturas mais complexas, através da diminuição da intensidade das bandas de emissão de comprimentos de onda menores com simultâneo aumento da intensidade de regiões de maiores comprimentos de onda.

Saab e Martin-Neto (2007) realizaram um estudo que teve como objetivo correlacionar os resultados de aromaticidade obtidos por RMN de ^{13}C de AH extraídos de gleissolos com resultados obtidos com RPE (concentração de radicais livres) e a razão E_4/E_6 da absorção de UV-Visível e obtiveram boa correlação entre os métodos, mostrando que a espectroscopia de absorção de luz UV-Visível pode ser utilizada no estudo da humificação da MOS.

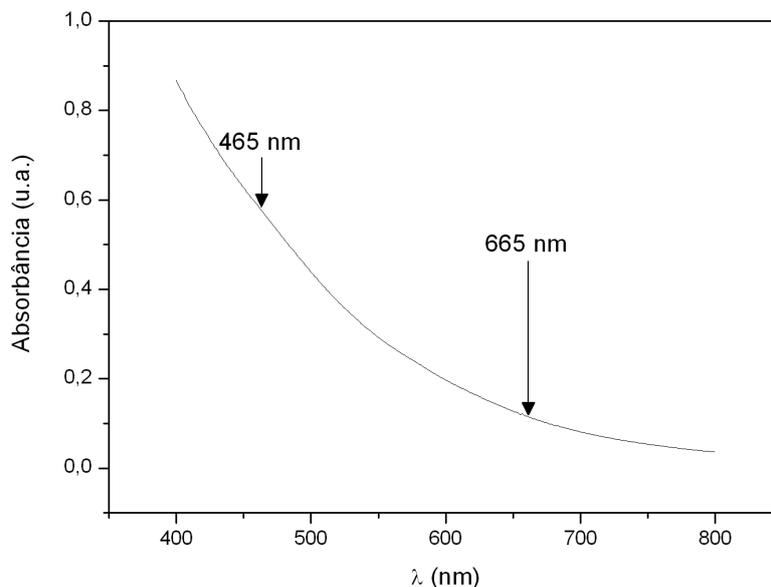


Figura 19: Exemplo de espectro de absorção de UV-Visível e identificação das intensidades de 465 nm e 665 nm (*log ϵ* é proporcional à absorção).

3.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV)

A espectroscopia no infravermelho empregada na caracterização de compostos orgânicos utiliza números de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} . Os espectros obtidos são complexos, mesmo para moléculas de estrutura simples, e a análise é feita por meio de uma correlação pico a pico comparando o espectro da substância em estudo a um espectro padrão, pois o comprimento de onda característico da absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força e da geometria dos átomos (SILVERSTEIN et al., 1994).

Nessa região do infravermelho, a radiação absorvida, converte-se em energia de vibração molecular. O espectro molecular vibracional é obtido quando a frequência de oscilação de uma molécula, representada como mola em movimento em torno de um ponto de equilíbrio, coincide com a frequência da luz absorvida, o que resulta em ressonância. Mesmo sendo o processo quantizado, o espectro resulta em uma série de bandas pois, cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis rotacionais, ocasionando uma sobreposição das linhas, que geram as bandas de vibração- rotação (PAVIA et al., 1996).

As vibrações moleculares podem ser deformações axiais (estiramento) ou angulares (chamada simplesmente de deformação). Os estiramentos ocorrem ao longo do eixo da

ligação molecular, em um movimento rítmico que aumenta e diminui as distâncias interatômicas. As deformações variam o ângulo de ligação, entre dois átomos ou entre conjuntos de átomos (FIALHO, 2007; PAVIA et al., 1996; SILVERSTEIN et al., 1994). Exemplos dessas vibrações estão na Figura 20.



Figura 20: Alguns modos de vibração moleculares (adaptado de STUART, 1996).

Quando luz infravermelha de mesma frequência de vibração de estiramento ou de deformação incide na amostra a energia é absorvida e a amplitude de vibração é aumentada. Devido à energia de absorção na frequência de ressonância, o detector do espectrômetro de infravermelho grava um pico de absorção naquele comprimento de onda (SAAB, 1999).

As deformações que provocam alterações rítmicas no momento dipolar da molécula geram um campo elétrico alternado, devido à mudança na distribuição de cargas produzida pela vibração, resultando em absorção da energia incidente. Devido a isso, são essas as deformações que podem ser observadas na espectroscopia de infravermelho convencional. Assim, de um número previsto teoricamente de vibrações fundamentais, que depende do número de elementos envolvidos, somente algumas são observadas (PAVIA et al., 1996).

Outros fatores que contribuem para a diminuição do número de vibrações observadas é a existência de vibrações harmônicas (múltiplas da frequência fundamental), vibrações de combinação (somadas e diferenças de bandas fundamentais), bandas que estão fora da região estudada do espectro, bandas com baixa intensidade, vibrações fundamentais com comprimento de onda muito próximos e bandas degeneradas (SILVERSTEIN et al., 1994).

As intensidades das bandas obtidas podem ser expressas em transmitância (T) ou absorvância (A). Transmitância é a razão entre a energia transmitida pela amostra e a energia que nela incidiu. A absorvância é dada por

$$A = \log_{10} \frac{1}{T}. \quad (3.6)$$

A posição de cada banda no espectro é dada em número de onda (cm^{-1}), e é proporcional à energia de vibração (FIALHO, 2007). A Tabela 1 traz bandas características dos espectros de IV para substâncias húmicas, na região entre 4000 e 400 cm^{-1} .

Tabela 1: Principais grupos de absorção no infravermelho, entre 4000 e 400 cm^{-1} , das substâncias húmicas (SAAB, 1999; SENESI, 2003).

Número de onda (cm^{-1})	Grupo de absorção
3395 - 3400	estiramento $O - H$, estiramento $N - H$ e estiramento OH ligado
3080 - 3030	estiramento $C - H$ aromático, estiramento $N - H$ e estiramento OH ligado
2950 - 2840	estiramento $C - H$ alifático
1725 - 1710	estiramento $C = O$ das cetonas e dos ácidos $COOH$
1660 - 1630	estiramento $C = O$ de grupos de amidas I e de quinonas e/ou ligações de hidrogênio cetonas conjugadas
1620 - 1600	estiramento $C = C$ dos anéis aromáticos e estiramento assimétrico $C - O$ dos íons carboxilato COO^-
1540 - 1519	deformação $N - H$ e estiramento $C = N$ de amida II, estiramento $C = C$ dos anéis aromáticos
1460 - 1440	deformação $C - H$ alifático dos $-CH_2$ e $-CH_3$
1420	estiramento $C = N$ de amidas I
1400 - 1380	estiramento $C - O$ de OH fenólico, deformação $O - H$ e estiramento simétrico dos íons COO^-
1260 - 1200	estiramento simétrico $C - O$ e deformação OH dos $COOH$, estiramento $C - O$ de álcoois, éteres, esteres e fenóis
1170 - 1120	estiramento $C - OH$ do $O - H$ alifático
1080 - 1030	estiramento $C - O$ de polissacarídeos
975 - 775	deformação do $C - H$ aromático fora do plano

Nesta região podem aparecer sinais referentes às impurezas inorgânicas, cujo comprimento de onda característico para o espectro de IV é mostrado na Tabela 2.

Vibrações de deformação geralmente requerem menos energia e são encontradas em frequências menores do que as vibrações de estiramento. Estiramento devido à tripla ligação é mais forte do que duplas ligações e estas são mais fortes do que ligações simples (SAAB, 1999).

Apesar da complexidade, a análise da espectroscopia de infravermelho é importante pois a maior parte dos laboratórios acadêmicos e industriais dispõe de espectrômetros capazes de realizá-las.

Tabela 2: Absorção no infravermelho de impurezas inorgânicas, entre 4000 e 400 cm^{-1} (SAAB, 1999).

Número de onda (cm^{-1})	Grupo de absorção
3700	estiramento axial de OH externo da estrutura da caulinita
3620	estiramento axial de OH interno da estrutura da caulinita
3520, 3445 e 3390	estiramento OH em gibbsita
1100 - 1090	estiramento $Si - O - Si$ de silicatos; quartzo
800 - 770	caulinita, glauconite, montmorilonite, quartzo

Esta técnica foi utilizada por Senesi et al. (2003) no estudo de grupos de absorção de infravermelho de ácidos húmicos de eurosolos. Fialho (2007) usou IV no estudo do processo da compostagem.

3.3 Outras técnicas de análise da humificação da MOS

As técnicas de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{13}C), brevemente descritas a seguir também são métodos importantes para o estudo da estabilidade de substâncias húmicas.

3.3.1 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Elétrons desemparelhados de um átomo, molécula ou íon⁴ absorvem energia quando na presença de um campo magnético. Este fenômeno é chamado de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), e tem como base o *Efeito Zeeman*, fenômeno físico que ocorre quando há interação entre o spin de um elétron desemparelhado e um campo magnético.

Quando um átomo, molécula ou íon é submetido a um campo magnético externo, a energia do elétron desemparelhado varia devido à interação entre o seu momento magnético e o campo magnético, causando um desdobramento dos níveis de energia que é o *Efeito Zeeman* (TIPLER et al., 2001). A variação de energia necessária para a mudança de estado de spin (ΔE) é dada por

$$\Delta E = g\beta H \quad (3.7)$$

⁴São ditas paramagnéticas as espécies que possuem elétrons desemparelhados (SAAB, 1999).

onde β é o magnéton de Bohr, g é o fator giromagnético do elétron e H o campo magnético sobre o material.

Essa energia faz com que o momento magnético transicione de uma posição paralela ao campo magnético H para uma posição antiparalela a este. A obtenção dessa energia é feita normalmente através da exposição a um campo de frequência fixa (entre 10^9 e 10^{12} Hz, na faixa de microondas) e varia-se o campo magnético perpendicular H , até que haja ressonância entre a radiação incidente e transição eletrônica do sistema em estudo.

A técnica de RPE é baseada na detecção da absorção que resulta nesta transição eletrônica que, no solo, ocorre para os íons de metais de transição paramagnéticos como Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e os compostos magnéticos radicais livres, que na MOS podem estar presentes nas frações húmica e não húmica. O espectro de RPE é apresentado como a primeira derivada do sinal.

Na fração húmica os radicais livres são representados principalmente por semiquinonas, e do seu espectro obtido por RPE, pode-se obter o número de elétrons desemparelhados, que é um índice de aromaticidade. Este número é obtido através da área do sinal de RPE, calculada pela aproximação da multiplicação da intensidade do sinal (I) pela largura de linha do sinal de RPE (ΔH) ao quadrado, ou seja, $I \times \Delta H^2$, em comparação aos dados obtidos utilizando um rubi sintético como padrão secundário.

A medição da largura de linha (H) permite avaliar diferenças entre os radicais livres das SH, pois está relacionada ao tempo de relaxação dos spins. O valor g é calculado a partir da magnitude do campo magnético no centro do sinal, e auxilia na caracterização da natureza química do radical orgânico. A Figura 21 traz um exemplo do fenômeno de RPE.

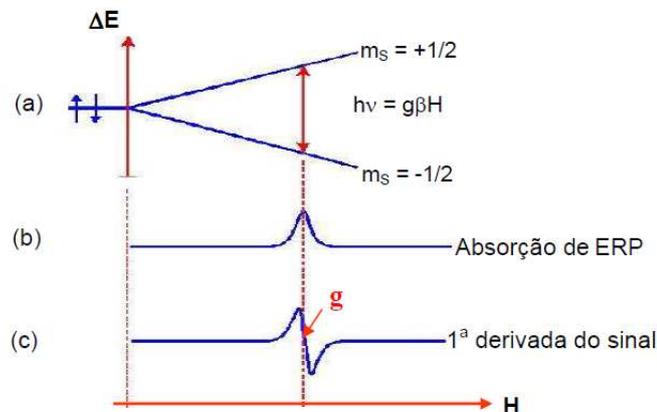


Figura 21: Representação do fenômeno de RPE. (a) Desdobramento energético dos spins de um elétron. (b) Sinal registrado pelo equipamento de RPE para a absorção da radiação incidente. (c) Primeira derivada do sinal registrado, que permite a identificação de g . (FIALHO, 2007)

Esta técnica permite a utilização de amostras sólidas, líquidas e gasosas, no entanto, apresenta a desvantagem de limitar seu uso a solos fracionados quimicamente, já que solos em que ocorrem em grandes quantidades metais paramagnéticos, em especial o Fe^{3+} , tem os sinais de RPE correspondentes sobrepondo os sinais dos radicais livres, não sendo possível detectá-los (BAYER, 1996; DIECKOW et al., 2005; FIALHO, 2007; MARTINS, 2009).

Bayer et al. (2003) utilizaram RPE para estudar o efeito dos sistemas de manejo plantio convencional, plantio direto e preparo mínimo sobre o grau de humificação da MOS nas frações granulométricas da camada superficial de um Cambissolo Húmico e determinaram maior humificação na fração silte e menor no plantio direto.

3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{13}C)

Na seção anterior vimos que o fenômeno RPE utiliza o efeito Zeeman que ocorre devido à interação entre os momentos magnéticos de elétrons desemparelhados e um campo magnético. Como alguns núcleos atômicos também possuem momento magnético, seus níveis de energia também podem ser desdobrados por um campo magnético.

A energia potencial de um momento magnético em um campo magnético é mínima quando são paralelos e máxima quando em sentidos opostos. O momento magnético do próton pode estar paralelo ao campo magnético (spin para cima) ou antiparelo (spin para baixo).

Quando uma coleção de átomos é irradiada com fótons de energia ΔE , a diferença de energia entre as duas possíveis orientações, alguns dos núcleos realizam transições do estado inferior para o superior por absorção ressonante. Ao decair para o estado inferior, os núcleos reemitem fótons com energia ΔE (Figura 22).

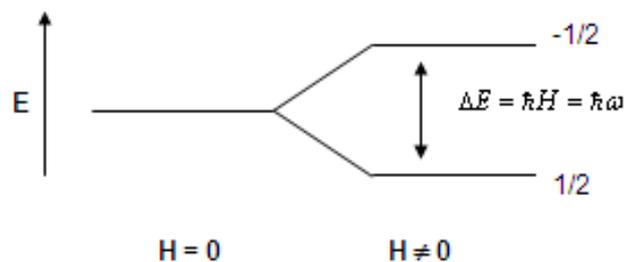


Figura 22: Níveis de energia para um núcleo de momento angular $l = 1/2$ sob ação de um campo magnético H (SAAB, 1999).

A frequência correspondente a essa energia está na faixa da radiofrequência (cerca de

4 a 900 MHz), e a medida desta para a ressonância de prótons livres pode ser utilizada para determinar o momento magnético do próton.

Em uma molécula, o campo magnético sentido pelo próton resulta do campo externo e do produzido pelos elétrons e núcleos vizinhos. A medida da frequência fornece informações a respeito do campo magnético interno da molécula, e esta é a técnica conhecida como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (TIPLER et al., 2001).

Para que o fenômeno ocorra, são necessários isótopos que contêm spin nuclear $l \neq 0$, como é o caso do 1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , entre outros. Com a técnica de RMN de ^{13}C , é possível obter informações sobre o grau de aromaticidade e alifaticidade das amostras, fazer caracterização estrutural e identificar compostos como ligninas, carboidratos, grupos alquil, metoxílicos, fenólicos e carboxilícos entre outros. Além disso, a espectroscopia de RMN permite medidas de pequenas diferenças de energia, as quais refletem pequenas diferenças na estrutura molecular. Em espectroscopia de alta resolução por RMN, separação de linhas de 0,1 Hz podem ser detectadas (SAAB,1999).

É possível aplicar esta técnica em amostras sólidas e líquidas, com algumas limitações, especialmente no estado sólido. Outro problema é que o isótopo ^{13}C é pouco abundante nesse tipo de amostra (FIALHO, 2007; MARTINS, 2009; SILVERSTEIN, 1994).

Canellas et al. (2007) e González-Pérez et al. (2007) utilizaram RMN, RPE e Fluorescência para determinar a qualidade da MOS de amostras de Cambissolo e encontraram uma grande relação entre as técnicas. Autores como Ferreira et al., (2004); Martin-Neto et al, (1998) e Narimoto, (2006) e também utilizam a técnica de RMN para avaliar a qualidade da MOS, por meio da quantificação de C aromáticos e da proporção de outros grupos funcionais presentes.

4 *Material e métodos*

Este capítulo é destinado à descrição dos materiais e dos métodos utilizados, iniciando pela amostragem, onde são dadas informações sobre o solo estudado; o fracionamento físico e o fracionamento químico e a verificação do teor de cinzas das amostras de AH; a análise elementar (razão C/N); as técnicas espectroscópicas FIL, fluorescência de AH, absorção de UV-Visível (razão E_4/E_6) e infravermelho.

4.1 Amostragem

As amostras de solo são provenientes do município de Irati, região centro-sul do Paraná no segundo planalto paranaense. As amostras Mata e plantio convencional foram coletadas na comunidade de Barra Mansa, distrito de Gonçalves Junior, com coordenadas aproximadas $S 25^{\circ} 27' S$ e $W 50^{\circ} 45' S$. As amostras de solo sob plantio direto foram coletadas na comunidade de Cerro da Ponte Alta, com coordenadas aproximadas $S 25^{\circ} 28' S$ e $W 50^{\circ} 54' S$ Oeste. Um perfil do solo é apresentado na Figura 23 (BENASSI, 2008).



Figura 23: Perfil do solo utilizado (retirado de BENASSI (2008)).

O clima é classificado como Cfb subtropical úmido mesotérmico, e tem como características verões frescos, geadas e não apresentar estações secas. As temperaturas médias da região nos meses mais frio e mais quente são, respectivamente, inferiores a 18 e 22 °C. As médias mensais regionais de precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar são 193,97 mm e 79,58% e a altitude local está entre 800 e 836 m. O relevo é suave ondulado (BENASSI, 2008).

A vegetação original da região era a Floresta Ombrófila Mista. Predominam materiais pertencentes à formação Teresina, do período Permiano e Carbonífero. O solo se originou de siltitos e atualmente não é pedregoso nem rochoso e varia entre moderado e bem drenado (BENASSI, 2008). O solo apresenta severas limitações ao uso agrícola, como o encrostamento superficial, que pode ser observado na Figura 24.

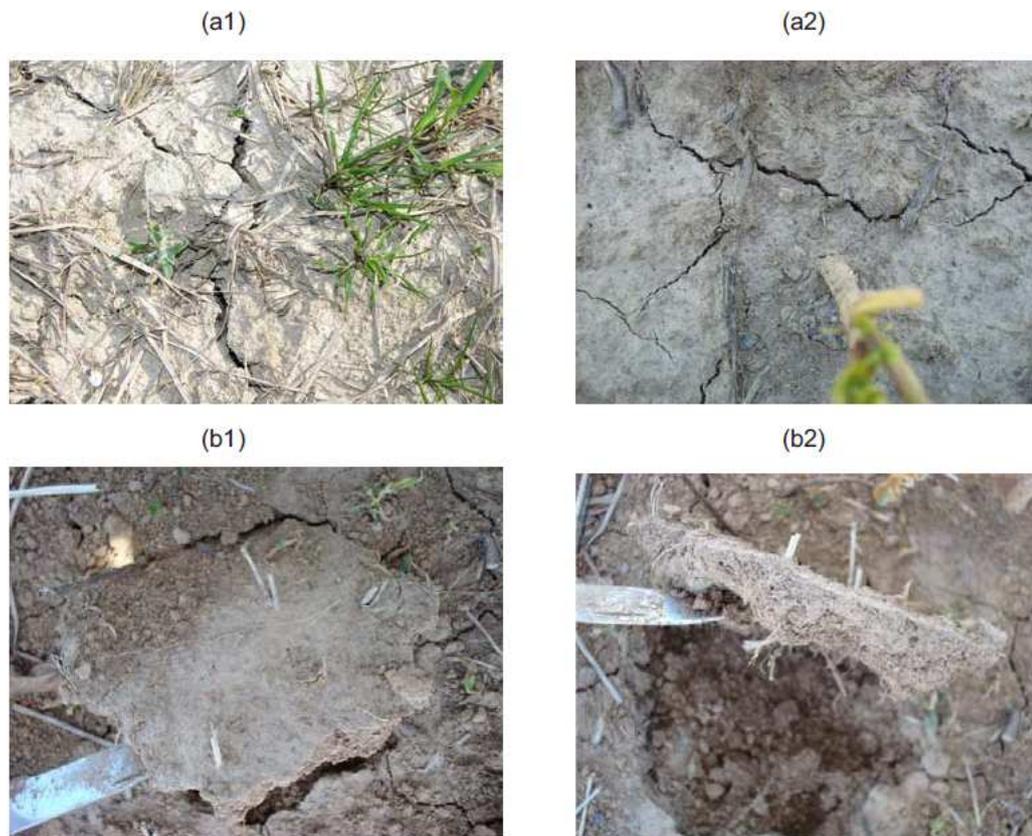


Figura 24: Encrostamento superficial da Terra Branca Batumadeira. (a) Vista superficial. (b) Vista lateral (retirado de BENASSI (2008)).

Formalmente o solo é classificado como Cambissolo, de acordo com Benassi (2008). Cambissolo por ter horizonte B incipiente e Háplico pois a quantidade de carbono orgânico total não é suficiente para qualificar o solo como húmico, e não é flúvico por não ser de origem sedimentar de rio.

Foram estudadas as amostras: *Mata (MA)*, *plantio convencional (ME)*, *Plantio direto*

de 6 anos (P6) e *Plantio direto de 9 anos (P9)*.

A área de mata é área de floresta secundária que foi cultivada pela última vez a cerca de 35 anos, sem nunca ter havido revolvimento do solo e por isso os dados desta área foram utilizados como referência para comparação.

O sistema plantio convencional, foi cultivado em plantio direto de milho no verão e adubos verdes de inverno (aveia, ervilhaca, azevem e nabo) por 7 anos e nos últimos 2 anos foi realizado o plantio convencional de fumo (aração e gradagem) e revolvimento com grade niveladora para plantio de aveia e destruição da soqueira de fumo.

O plantio direto de 6 anos teve o plantio de soja por 5 anos e milho por 1 ano.

O plantio direto de 9 anos teve cultivo de milho nos 3 primeiros anos, 5 anos de soja e 1 ano de milho, nestas duas áreas no inverno sempre foi utilizado aveia + ervilhaca, centeio e nabo.

O solo sob plantio direto sofreu revolvimento de três em três anos (BENASSI, 2008).

Para coleta do solo foram abertas trincheiras no solo após a distinção e separação dos horizontes e camadas, foram coletadas amostras deformadas de solo e acondicionadas em sacos plásticos para posterior análise (BENASSI, 2008). Somente o horizonte A, no centro da camada 0 – 20 cm foi utilizado neste trabalho, por ser o que apresenta maiores quantidades de matéria orgânica. As amostras de solo são representativas da região.

4.2 Fracionamento físico

O fracionamento físico das amostras, para os quatro sistemas de manejo, foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais (FASCA) do Departamento de Física da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A obtenção das frações físicas foi feita de acordo com a Tabela 3, que mostra os tamanhos de partículas, baseados na Escala de Atterberg, da forma como foram utilizadas neste trabalho¹, utilizando o procedimento descrito por Martin-Neto et al. (1994).

As amostras foram preparadas moendo-se os torrões de solo em almofariz com pistilo de ágata e então o solo foi seco em estufa, a temperaturas menores que 60 °C, pois a MOS é destruída em temperaturas maiores que 60, 70 °C (ORLOV, 1974). Porções de 20 g de cada amostra, em duplicata, foram separadas e então submetidas a processos

¹O limite entre as frações areia fina e areia grossa é dado pela malha da peneira utilizada.

Tabela 3: Tamanho das partículas para cada fração física do solo, utilizada neste trabalho.

Fração	Limite de diâmetro das partículas (μm)
argila	0 – 2
silte	2 – 20
areia fina	20 – 53
areia grossa	53 – 1000

de dispersão para manter as partículas separadas e as frações obtidas não contivessem somente as partes mais facilmente dispersas, excluindo os compostos de agregados e que são, na verdade, uma composição de partículas menores (CHRISTENSEN, 1992).

Na dispersão química, as amostras foram postas em soluções contendo 200 mL de água destilada e 10 mL de $NaOH$, 1 mol/L, agitadas manualmente e reservadas, permanecendo em repouso por cerca de 24 horas. As soluções foram então submetidas ao processo físico de dispersão, o tratamento ultra-sônico, utilizando o processador ultrassônico Vibra-Cell da Sonics, com potência média de 40,89 W e tempo total de 20 min em duas sessões de 10 min para as amostras de mata, plantio convencional e plantio direto de 9 anos, somando a energia total média de 49,07 J. Para o plantio direto de 6 anos a potência média utilizada foi de 11,58 W e tempo total de 70 min em sessões de 10 min, somando a energia total média de 46,69 J.

Com aplicação de ultra-som, ocorre o rompimento das ligações argila-matéria orgânica-argila em microagregados tamanho silte ou maiores, sendo a energia necessária para a dispersão total do solo em partículas primárias (areia, silte e argila) relacionada à intensidade e ao tipo de ligações existentes nos complexos organo-minerais (CHRISTENSEN, 1992). Como este tratamento causa aumento de temperatura na solução de solo, esta permaneceu em banho de água gelada, pois o aquecimento também reduz o desempenho do aparelho o que pode trazer redução nos níveis de argila (CHRISTENSEN, 1992). Sá et al. (1999) mostraram que o índice de desagregação está relacionado com as características de cada solo, entre elas a composição mineralógica e o teor de C orgânico, principalmente em baixos níveis de energia.

Imediatamente após a dispersão das partículas do solo, cada amostra foi lavada com água destilada em uma peneira de 53 μm até que a água saísse limpa para separar a fração areia grossa que foi reservada em placas de Petri para secar. A solução que passou pela peneira contém as demais frações e foi levada aos tubos de PVC (Figura 25) para fracionamento por sedimentação.

Cada amostra sofreu agitação mecânica para manter a dispersão, e permaneceu em



Figura 25: Tubos de PVC para fracionamento físico. (a) Representação esquemática evidenciando os 5 cm de decantação. (b) Fotografia da mesa de fracionamento.

repouso durante o tempo t (s) (dependente da temperatura) necessário para que somente partículas de diâmetro desejado permanecessem acima da marcação. Este tempo é dado pela *Lei de Stokes*:

$$t = \frac{18h\eta}{gD^2(d_p - d_l)} \quad (4.1)$$

onde h é a distância de decantação (5 cm); η é a viscosidade de água (poise), um valor tabelado que depende da temperatura do líquido (TANNER; JACKSON, 1947); g é a aceleração local da gravidade (978 cm/s^2); D é o tamanho máximo da partícula desejada ($2 \mu\text{m}$ ou $2 \times 10^{-4} \text{ cm}$ para a fração argila e $20 \mu\text{m}$ ou $2 \times 10^{-3} \text{ cm}$ para a fração silte); d_p é a densidade da partícula ($2,54 \text{ g/cm}^3$) e d_l é a densidade da água (1 g/cm^3).

Durante este tempo, as partículas movem-se em velocidade constante, devido à resistência do fluido, que é maior para partícula de maiores massas, e portanto, maiores diâmetros. Esta velocidade de equilíbrio é atingida quase que instantaneamente, e o tempo dado pela equação (4.1) pode ser empregado para a obtenção das frações físicas ou para a determinação da distribuição das partículas do solo, considerando as partículas esféricas, de densidade uniforme, que decantem individualmente, que o fluxo de fluido ao redor delas é laminar e que as partículas são grandes o suficiente para sofrer intervenções pelos movimentos térmicos das moléculas do fluido.

A alíquota retirada foi então guardada em recipientes, e, para cada litro da fração argila, foram adicionados 10 mL de solução de CaCl_2 1 mol/L. Este procedimento leva à floculação da argila para posterior sifonação. As amostras foram então reservadas.

Os tubos de PVC foram preenchidos novamente com água destilada e o procedimento

repetiu-se por 52 vezes até que a água saísse clara, indicando que toda a fração argila já havia sido retirada. A coleta da fração silte foi feita pelo mesmo procedimento, porém sem a necessidade da utilização de $CaCl_2$, totalizando 30 coletas para cada amostra.

O material remanescente no tubo consistia na fração areia fina. Todas as amostras foram secas em estufa a temperaturas menores que 60 °C. A massa de cada fração foi obtida em balança analítica de precisão (MARTINS, 2009; FAVORETTO, 2007).

4.3 Fracionamento químico

A extração e purificação dos AH via fracionamento químico ocorreu, para os quatro sistemas de manejo, no Laboratório de Preparação de Amostras da Embrapa Instrumentação Agropecuária - São Carlos, SP, e no Laboratório de Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais (FASCA) do Departamento de Física da Universidade Estadual de Ponta Grossa, utilizando uma adaptação do método sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e por Swift (1996).

Neste procedimento são obtidas as frações de acordo com a solubilidade: ácidos húmicos, fúlvicos e huminas, sendo que somente os AH foram utilizados neste trabalho.

Foram utilizados 100 g de solo macerado, seco e peneirado (2 mm). O solo foi posto em 1 L de solução de HCl , 0,1 M, com pH entre 1 e 2. As amostras foram agitadas mecânicamente durante 1 hora, com bastão de vidro e aguardou-se durante 3 horas para a decantação. O sobrenadante consiste em AF (extrato 1), que é solúvel em qualquer pH, e foi retirado por sifonação. O resíduo sólido foi neutralizado com 1 L de $NaOH$, 0,1 M, com pH entre 12 e 13. A solução sofreu agitação mecânica durante 4 horas, com bastão de vidro, e decantou por 20 h para que o AH e AF (extrato 2) se dissolvesse e fosse removido. O precipitado consiste de humina.

O sobrenadante foi levado à centrifuga 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 M, na proporção 1/1 (água/ácido), em constante agitação para obter pH entre 1 e 1,5. A solução assentou-se por 12 – 16 horas.

O sobrenadante é AF (extrato 3) e foi sifonado e levou-se o restante à centrífuga para ser totalmente retirado. O AH foi então redissolvido através da adição do menor volume possível de KOH 0,1 M. A mistura foi agitada em mesa agitadora por 2 horas.

O processo de purificação iniciou-se com a adição de HCl sólido em quantidade sufici-

ente (de acordo com o volume de KOH adicionado) para alcançar a concentração de 0,3 M de $[K^+]$. A solução foi centrifugada para remover os sólidos suspensos. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado HCl , 6 M, pH 1, para precipitar o AH. A mistura permaneceu em repouso por 12 – 16 horas.

A solução foi novamente levada à centrífuga e o sobrenadante acidificado. O precipitado de AH foi ressuspenso, em recipientes plásticos, em 100 mL de HCl , 0,1 M e HF , 0,3 M. A solução foi agitada por 12 – 16 horas e repetiu-se o procedimento.

Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o AH foi transferido para tubos de diálise. A solução permaneceu em diálise por 7 dias com água miliQ². Após isso, as amostras foram liofilizadas.

As amostras foram purificadas duas vezes para realização da análise de infravermelho.

4.3.1 Análise de teor de cinzas das amostras de AH

Para a verificação da pureza dos AH, o teor de cinzas amostras de AH foi obtido por calcinação em cadinho de porcelana. Aproximadamente 30 mg de AH permaneceram a 700°C, em mufla, durante 2 horas. Os cadinhos já haviam sido calcinados nas mesmas condições para evitar impurezas.

Foram medidas as massas inicial de AH e a restante após calcinação. A altas temperaturas, a matéria orgânica é eliminada e o material restante é material inorgânico, que resistiu ao processo de purificação de AH durante o fracionamento físico, chamado de cinzas.

A análise foi feita em duplicada e a porcentagem de cinzas utilizada foi a média entre os dois valores obtidos.

4.4 Análise elementar: razão C/N

A metodologia de quantificação de carbono orgânico total é uma análise rápida, altamente reprodutível e facilmente automatizada (SEGNINI, 2007).

Para verificar o teor de C e N das amostras de solo inteiro e fracionado fisicamente, foram utilizados 150 mg de solo seco, moído e peneirado em malha de 150 mesh.

²Água ultra-pura que passou pelo processo de destilação, deionização e purificação em um sistema Milli-Q fornecido pela *Millipore Corporation* e por filtração em uma membrana. Possui resistividade maior que 18,2 M Ω cm e é utilizada em estudos de sistemas biológicos altamente sensíveis.

Os valores foram determinados com o Determinador Elementar de C e N, TRUS PEC CN LECO, do Laboratório de Matéria Orgânica do Departamento de Ciências do Solo e Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O aparelho faz a combustão das amostras em um forno a 950 °C e o gás proveniente dessa combustão é purificado e três porções deste gás são analisadas por um detector de infravermelho que mede o teor de *C* e o teor de *N* através de uma célula de condutividade térmica, comparando com uma amostra cujos teores de *C* e *N* são conhecidos. São feitas três repetições para cada amostra (MARTINS, 2009).

A partir destes valores pode-se obter a razão *C/N* para estudo auxiliar da humificação do solo.

4.5 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL)

As medidas de FIL foram realizadas no espectrômetro do Laboratório de Espectroscopia da Embrapa Instrumentação Agropecuária - São Carlos, SP, para o solo inteiro (com as amostras peneiradas em malha de 1 mm e secas em estufa até 60°C) e fracionado fisicamente.

Os parâmetros utilizados para a realização das medidas foram: Lock-in 100 mV, fotomultiplicadora 850 V, o laser de argônio da marca Coherent, modelo Innova 90-6, com comprimento de onda de 458 nm e potência do laser 300 mW. A varredura foi feita entre 470 e 650 nm (MILORI et al. 2006).

O espectro da fluorescência é de emissão, formado pelas diferentes intensidades emitidas pela relaxação dos componentes da amostra.

A Figura 26(a) mostra a janela de quartzo em que as amostras, em pó, foram colocadas para realização das medidas e a 26(b) traz a mesa óptica montada no Laboratório de Espectroscopia da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP para medidas de FIL.

Foram feitas três repetições da medida de FIL por amostra e foram obtidos valores médios de intensidade a partir destes.

Os dados de *C* utilizados para normalizar a área da fluorescência, de acordo com a equação (3.3), são os mesmos obtidos pelo procedimento descrito na seção anterior.



Figura 26: (a) Janela de quartzo. (b) Mesa óptica para FIL.

4.6 Espectroscopia de fluorescência de AH

As análises de fluorescência foram feitas no laboratório de Caracterização Físico-Química, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, utilizando as amostras de AH para cada sistema de plantio obtidas no fracionamento químico.

Na presença de um solvente, as linhas são alargadas e fundidas junto, alargando o espectro (EWING, 1972), por isso, cada amostra de AH foi dissolvida em solução de $NaHCO_3$ (bicarbonato de sódio), 0,05 mol/L. O solvente escolhido é básico devido as propriedades de solubilidade do AH^3 .

Milori et al. (2002b) determinaram a concentração de AH de 20 mg/L e o pH em torno de 8, como sendo ideais para as análises.

O equipamento utilizado foi o *Varian Cary Equipel - Fluorescence spectrophotometer* e os espectros obtidos foram de emissão, onde mantém-se fixo o comprimento de onda de excitação e verifica-se a intensidade da fluorescência emitida para uma determinada faixa de comprimentos de onda. O recipiente utilizado foi uma célula de quartzo da *HELLMA*.

Para o *Método de Zsolnay et al.*, (1999) o comprimento de onda para excitação utilizado foi 240 nm e a varredura ocorreu entre 350 e 650 nm. O espectro de emissão foi dividido em quatro regiões e o grau de humificação foi calculado por meio da razão A_4/A_1 , onde A_4 é a área da região entre 570 e 641 nm e A_1 entre 356 e 432 nm.

Para o *Método de Milori et al.*, (2002b) a excitação foi em 465 nm e a varredura entre 475 e 650 nm, como indicado na literatura e a humificação é dada pela área total

³O bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) pode dissolver o AH por ser um sal básico. Sais básicos tem a propriedade de liberar OH e tornar o meio básico, ou seja, propício para a dissolução dos AH, o que só ocorre em meios básicos.

da fluorescência, aqui denominada A_{465} (MILORI et al., 2002b).

Foram feitas três repetições da medida de FIL por amostra e foram obtidos valores médios de intensidade a partir destes. Para ambos os métodos foi realizada a medida do branco, onde foi obtido o espectro somente do recipiente.

4.7 Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível (razão E_4/E_6)

As amostras de AH dos quatro sistemas de manejo foram analisadas por Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível no laboratório de Química/Pesquisa: Química Analítica e Química Inorgânica, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As análises foram feitas com 3 mg de AH dissolvidos em solução de $NaHCO_3$, 0,05 mol/L, da mesma forma que para a realização das medidas de fluorescência de AH.

Os espectros foram obtidos pelo Espectrofotômetro Multispec-1501 da Shimadzu, na região de 200 a 800 nm, com lâmpadas de deutério e tungstênio. O branco foi obtido pelo espectro da solução de água e bicarbonato de sódio, a mesma utilizada para a dissolução dos AH (CHEN; SENESI; SCHNITZER, 1977).

A razão E_4/E_6 foi obtida através da divisão das absorbâncias em 465 e 665 nm (SENESE et al., 2003). Foram feitas três repetições da medida de absorção de luz UV-Visível por amostra e foram obtidos valores médios de intensidade a partir destes.

4.8 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV)

A análise de IV foi feita para pastilhas preparadas com 1 mg de AH, que passou pelo processo de purificação uma e duas vezes, e 100 mg de KBr seco. A mistura de amostra e KBr foi homogeneizada em almofariz e pistilo.

Os espectros foram obtidos a partir de 40 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} utilizando o espectrômetro da marca NICOLET 4700 do Laboratório de Espectroscopia no Laboratório de Análise Térmica e Espectroscópica pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

5 Resultados e discussão

Este capítulo traz os resultados e a discussão dos dados obtidos no fracionamento físico, fracionamento químico, IV, e análise elementar (razão C/N) do solo inteiro e das frações físicas. A espectroscopias de FIL (solo inteiro e frações físicas) foi a principal técnica utilizada neste trabalho. Para verificação da validade dos resultados obtidos por FIL, foram utilizadas análises de espectroscopia de fluorescência de AH e absorção de UV-Visível (razão E_4/E_6).

5.1 Fracionamento físico

A Tabela 4 expõe os valores da quantificação das frações do solo. A média dos desvios entre as duplicatas foi de 0,75.

Tabela 4: Percentagem da fração granulométrica em relação à massa total de solo, por sistema de plantio.

	% de massa de solo			
	Mata	PC	PD 6 anos	PD 9 anos
argila ($< 2 \mu m$)	35,2	35,0	42,5	49,6
silte ($2 - 20 \mu m$)	36,4	32,3	24,0	18,7
areia fina ($20 - 53 \mu m$)	21,5	22,1	22,1	18,6
areia grossa ($> 53 \mu m$)	6,8	10,5	11,4	13,1

É possível perceber que o solo nativo apresentou porcentagens muito próximas de frações argila e silte, com um maior teor desta última fração. No sistema plantio convencional aumenta o teor de argila e diminui o de silte, tendência que se acentua nas amostras sob plantio direto, aumentando ainda mais com o tempo de uso deste manejo, sendo que, o sistema plantio direto de 9 anos apresenta a maior diferença argila/silte. Pode-se verificar também que o teor de areia fina é muito parecido para todas as amostras estudadas e a porcentagem de areia grossa é a menor para todos os solos.

Uma comparação da porcentagem das frações física para cada sistema de manejo é apresentada na Figura 27. O solo sobre plantio direto de 9 anos possui os maiores teores

de argila, sendo que as porcentagens aumentam com o tempo de utilização desse sistema de manejo, enquanto que mata e plantio convencional apresentam porcentagens muito próximas para esta fração. A mata é a fração que possui maior teor de silte e o sistema plantio convencional apresenta porcentagem um pouco menor. Os valores diminuem ainda mais nas amostras sob plantio direto, tendo menor valor para o de 9 anos.

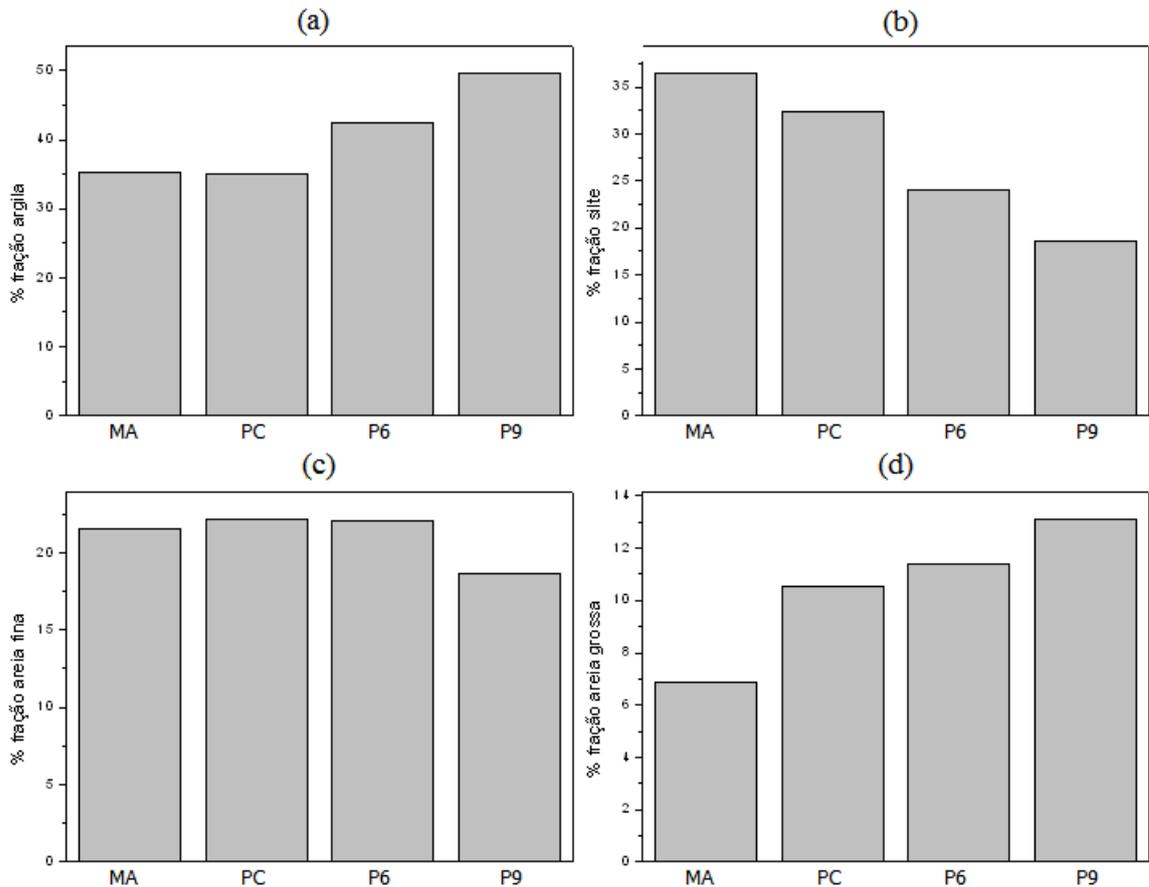


Figura 27: Comparação entre as porcentagens de fração para cada sistema de manejo. (a) fração argila, (b) fração silte, (c) fração areia fina e (d) fração areia grossa. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

Aumentos no teor de argila são compensados com diminuição nas porcentagens de silte. Os teores de areia fina não sofreram grande variação, com exceção do plantio direto 9 anos, que apresentou menor teor desta fração. A fração areia grossa apresenta a mesma tendência encontrada nas porcentagens de argila.

Autores como Martins (2009) e Beutler et al. (2001), estudando latossolos, encontraram menores teores da fração argila em amostras com maiores taxas de matéria orgânica, ou seja, com maiores valores de C , que implicariam em maior dificuldade de desagregação do solo. O mesmo não ocorreu com este solo, como pode-se verificar comparando os dados do fracionamento com os valores de C , para o solo inteiro, dados pela Tabela 6: o menor

valor de C ocorre para a mata que é justamente o sistema que apresentou maior teor de argila e o plantio direto de 9 anos, que apresentou maior valor de C tem o menor teor de argila, ou seja, a relação entre o teor de C e desagregação comporta-se ao contrário do esperado em comparação com o estudo de latossolos.

No estudo de um Cambissolo Húmico sob plantio direto, preparo reduzido e plantio convencional, Bayer et al. (2003) verificaram que a porcentagem da fração argila foi a maior para todos os sistemas de manejo, diminuindo para a fração silte, areia fina, e areia grossa, nessa ordem, sendo que o aumento do teor de fração argila esteve inversamente relacionado ao aumento da porcentagem de C , assim como os resultados obtidos por Martins (2009) e Beutler et al. (2001).

5.2 Fracionamento químico

As quatro amostras de solo foram fracionadas quimicamente para obter os AH. Dos 100 g submetidos ao procedimento, foram obtidos entre 204 e 430 mg de AH após um e dois processos de purificação, dos quais foi feita análise de pureza para verificação do teor de cinza. A porcentagem de material que restou após calcinação está mostrada na Tabela 5.

Tabela 5: Teores de cinza dos AH.

Amostra de AH	% cinzas (1 purificação)	% cinzas (2 purificações)
Mata	2,2	3,9
Plantio convencional	1,5	3,5
Plantio direto - 6 anos	7,1	0,9
Plantio direto - 9 anos	17,5	3,1

Os teores de cinzas determinados para o AH, após uma purificação, situaram-se entre 1,5 e 17,5% e após duas purificações entre 0,9 e 3,9%. Teores de cinzas abaixo de 5% indicam que a amostra está praticamente livre das frações minerais, eliminados no fracionamento químico (SEGNINI, 2007). Dessa forma, as amostras após duas purificações estão aptas para as análises espectroscópicas.

A seção 5.3 que analisa os espectros de IV das amostras de AH evidencia a presença de impurezas nas amostras que passaram por apenas um processo de purificação.

5.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV)

A espectroscopia de IV pode ser utilizada para a identificação de grupos funcionais, mas não providencia informações detalhadas sobre mudanças químicas ou estruturais nos AH para os diferentes sistemas de manejo (GONZÁLES-PÉREZ et al., 2004).

A Figura 28 compara os espectros de IV obtidos para os ácidos húmicos que passaram por um e por dois processos de purificação. Nestes espectros destas Figuras, é possível perceber que somente um processo de purificação não foi suficiente para eliminar a fração mineral das amostras, o que pode ser visto na diferença entre espectros da mesma amostra, em especial na região entre 3650 e 3380 cm^{-1} .

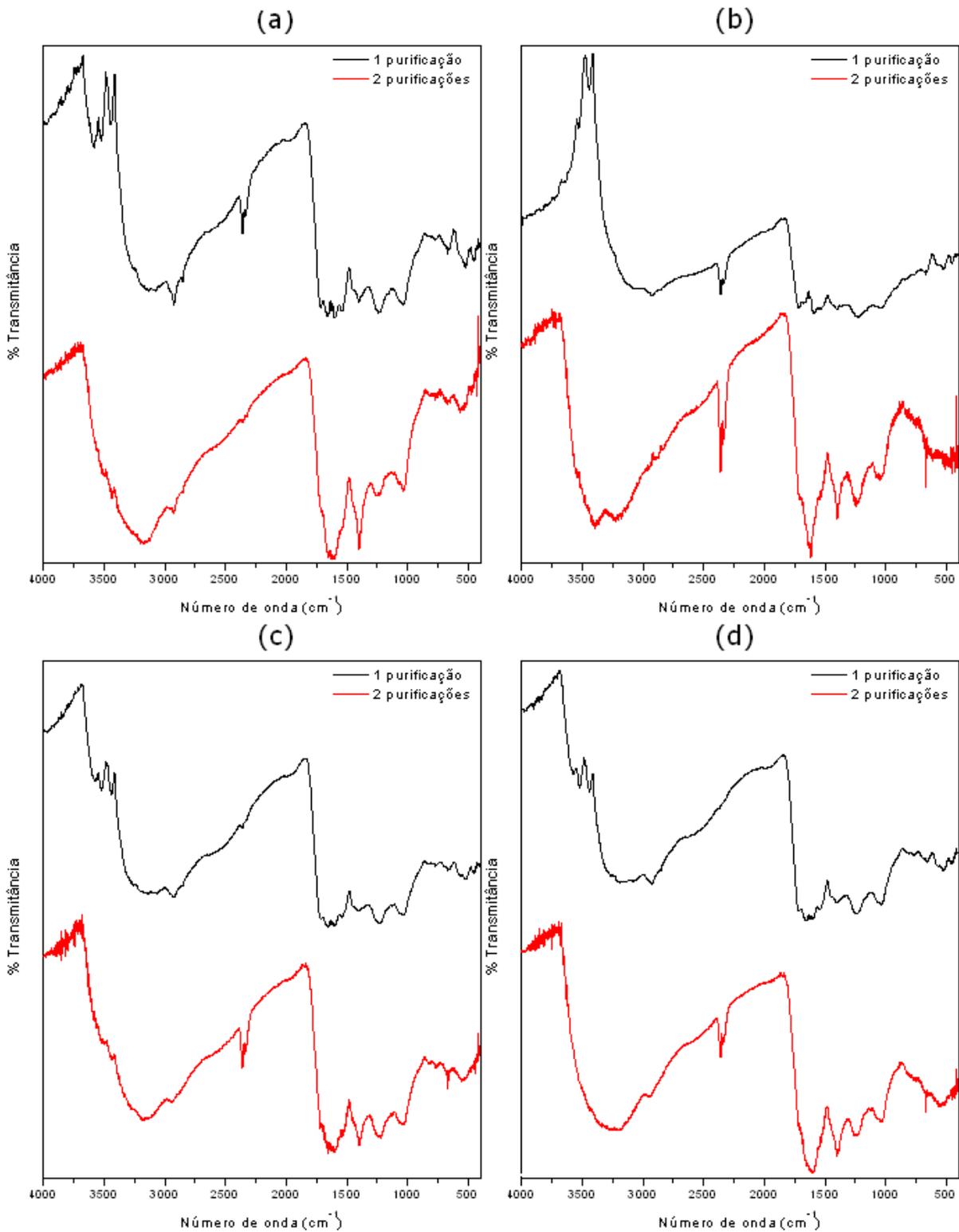


Figura 28: Espectros de IV para os ácidos húmicos das amostras: (a) MA (mata); (b) PC (plântio convencional); (c) P6 (plântio direto de seis anos) e (d) P9 (plântio direto de nove anos).

Nesta região, ocorre a absorção no IV de grande parte das impurezas minerais como pode ser observado na Tabela 2 da seção 3.2.3, e são apontadas na Figura 29. Os picos mostrados na Figura 29 em 3568, 3522 e 3441 cm⁻¹ são referentes ao estiramento *OH* em

gibbsita.

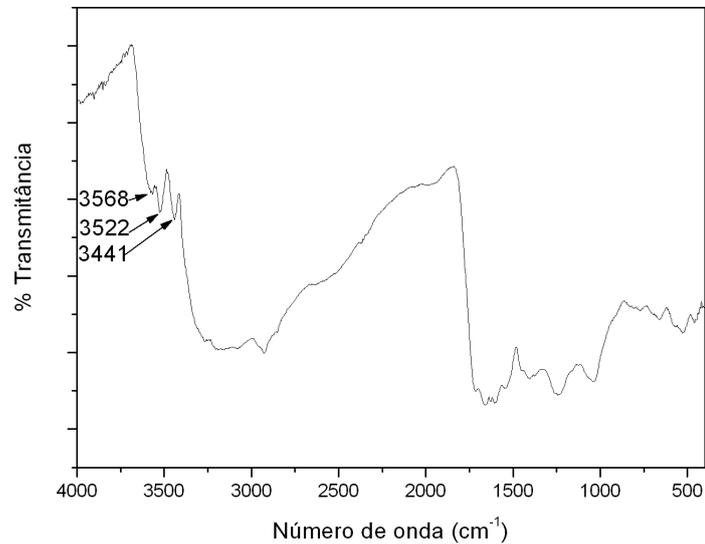


Figura 29: Espectro de IV para os ácidos húmicos da amostra plantio direto de seis anos, com única purificação. Em destaque estão os picos referentes às impurezas minerais.

A Figura 30 mostra um dos espectros de absorção de IV dos AH duplamente purificados, explicitando suas bandas de absorção referentes às moléculas orgânicas.

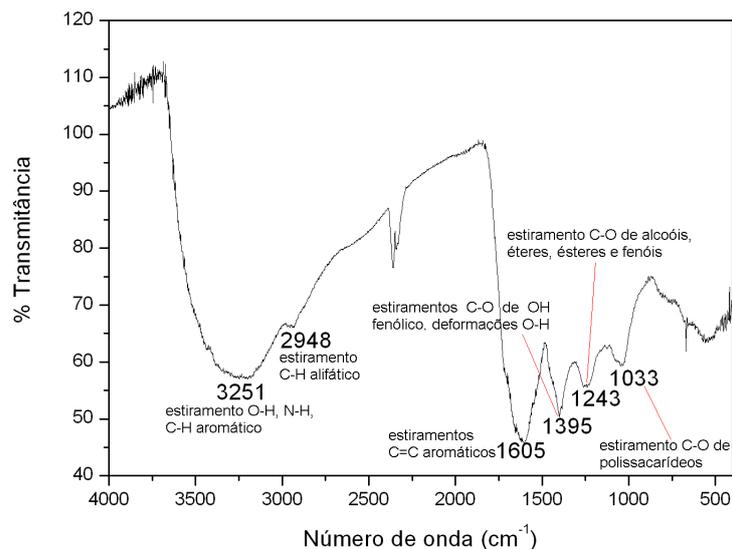


Figura 30: Espectro de IV para os ácidos húmicos da amostra plantio direto de nove anos, com dupla purificação. Em destaque estão os picos referentes às moléculas orgânicas.

Foram observados nesses espectros de IV algumas bandas características, de acordo

com a Tabela 1 da seção 3.2.3. A banda larga centrada em 3251 cm^{-1} corresponde a uma sobreposição das bandas referentes ao estiramento $O - H$, estiramento $N - H$ e estiramento OH ligado e ao estiramento $C - H$ aromático. O pico em 2948 cm^{-1} é devido ao estiramento $C - H$ alifático. Estiramentos $C = C$ dos anéis aromáticos e estiramentos assimétrico $C - O$ dos íons carboxilato COO^- resultam no pico encontrado em 1605 cm^{-1} . O pico em 1395 cm^{-1} é formado por estiramentos $C - O$ de OH fenólico, deformações $O - H$ e estiramentos simétricos dos íons COO^- . Em 1243 cm^{-1} , observou-se o pico referente ao estiramento simétrico $C - O$, deformação OH dos $COOH$, estiramento $C - O$ de álcoois, éteres, esterres e fenóis. O pico encontrado em 1033 cm^{-1} é relativo ao estiramento $C - O$ de polissacarídeos, mas pode também estar associado a impurezas $Si - O - Si$ de silicatos, indicando a presença de material inorgânico, não completamente removido durante o processo de purificação.

O pico em 2364 cm^{-1} , em diferentes intensidades mas em todas as amostras, é referente ao CO_2 do ambiente, e está em evidência na Figura 31, e não é proveniente da amostra.

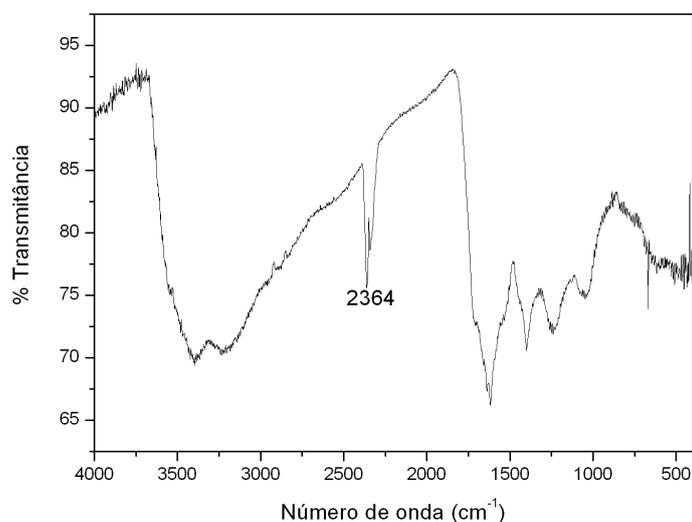


Figura 31: Espectro de IV para os ácidos húmicos da amostra pantio convencional, com dupla purificação. Em destaque está o pico referentes ao CO_2 .

Resultados semelhantes aos da análise dos espectros de IV aqui apresentados foram encontrados na análise de AH por IV por Fialho (2007), González-Pérez et al. (2004) e Senesi (2003).

5.4 Análise elementar: razão C/N

5.4.1 Solo inteiro

A Tabela 6 mostra os valores obtidos por análise elementar para o teor de C , N e a razão C/N para as amostras de solo inteiro.

Tabela 6: Teor de C , N e razão C/N para as amostras de solo inteiro e fracionado.

Amostra	Teor de C (g/kg)	Teor de N (g/kg)	Razão C/N
mata - solo inteiro	13,4	4,6	2,9
plântio convencional - solo inteiro	14,0	4,5	3,1
plântio direto 6 anos - solo inteiro	13,8	4,4	3,1
plântio direto 9 anos - solo inteiro	16,8	4,2	4,0

Bayer et al. (2003) e Martins (2009), encontraram os maiores teores de C para o solo inteiro em plântio direto. Os resultados aqui apresentados também mostram maior teor de C para plântio direto com nove anos de duração (a amostra mais argilosa), o que pode ser melhor visualizado na Figura 32. A explicação para isto é que no plântio direto se mantém os restos de vegetação no solo durante seu uso, especialmente no horizonte superficial que é objeto deste estudo.

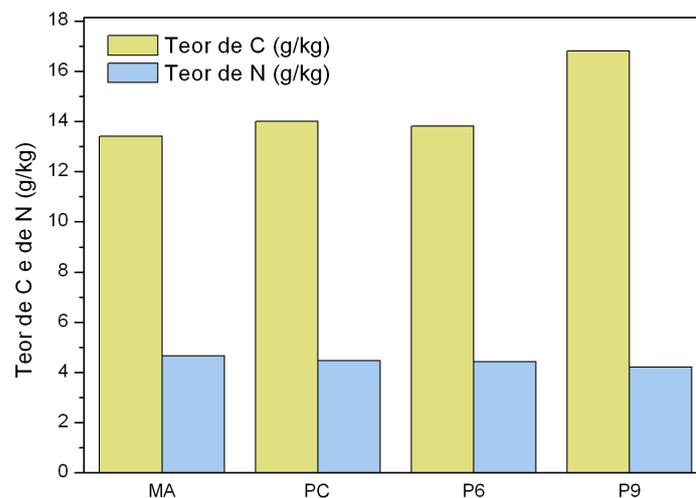


Figura 32: Teor de C e de N comparativo entre os sistemas de manejo para o solo inteiro. MA = mata, PC = plântio convencional, P6 = plântio direto de seis anos e P9 = plântio direto de nove anos.

Segnini (2007) não obteve diferenças no teor de C para amostras em plântio convencional e plântio direto, sem adição de calcário, de um Latossolo Vermelho Eutroférico muito

argiloso. Porém, passados 6 anos da primeira amostragem, a porcentagem de carbono diminuiu para o plantio convencional, e aumento com o uso do plantio direto.

Não houve diferença do teor de C para as amostras plantio direto de 6 anos e plantio convencional, o que pode ser justificado pelo revolvimento a cada três anos das amostras sob plantio direto, como descrito na seção 4.1. Segnini (2007) obteve maiores valores de C para áreas de mata nativa, o que não ocorreu neste experimento.

Os teores de N não se alteraram para estas amostras, ao contrário de Martins (2009) que obteve valores maiores de teor de N para o plantio direto.

Uma comparação entre os valores da razão C/N para o solo inteiro está na Figura 33 na qual é possível perceber que a razão C/N segue a mesma ordem do teor de C , sendo que a mata apresenta o menor valor, o que está relacionado a um maior grau de humificação, e o plantio direto a maior razão, relacionada a menor humificação, e as amostras plantio convencional e plantio direto de 6 anos apresentam valores muito semelhantes.

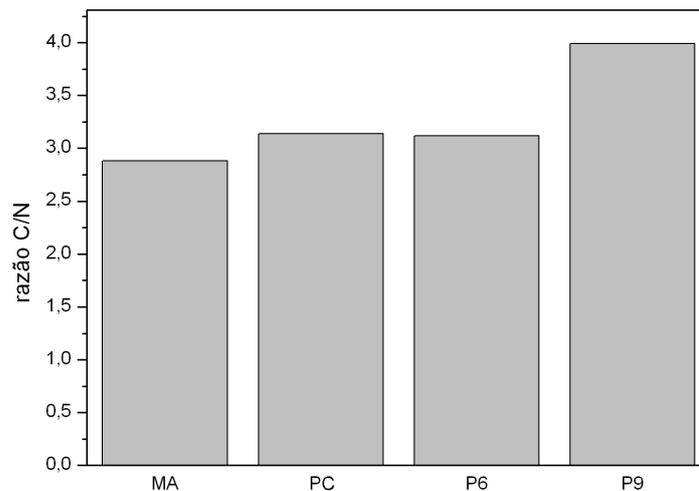


Figura 33: Comparativo da razão C/N entre os sistemas de manejo para o solo inteiro. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

Fialho (2007) verificou limitações neste método ao analisar a correlação entre a razão C/N e os índices espectroscópicos, estudando o processo de compostagem. A razão C/N estabilizou-se a partir de 60 dias de processo, enquanto que os índices espectroscópicos continuaram variando.

5.4.2 Frações físicas do solo

A Tabela 7 mostra os valores obtidos por análise elementar para o teor de C , N e a razão C/N para as amostras do solo fracionado.

Tabela 7: Teor de C , N e razão C/N para as amostras do solo.

Amostra	Teor de C (g/kg)	Teor de N (g/kg)	Razão C/N
mata - argila	30,3	2,9	10,3
mata - silte	6,1	0,8	7,6
mata - areia fina	3,4	0,8	4,0
mata - areia grossa	10,2	0,7	14,8
plantio convencional - argila	25,0	2,5	10,1
plantio convencional - silte	8,0	0,6	13,8
plantio convencional - areia fina	6,9	0,3	21,5
plantio convencional - areia grossa	9,3	0,6	16,3
plantio direto 6 anos - argila	23,4	2,6	8,9
plantio direto 6 anos - silte	9,0	1,0	9,3
plantio direto 6 anos - areia fina	4,1	0,7	6,0
plantio direto 6 anos - areia grossa	2,7	0,7	4,5
plantio direto 9 anos - argila	18,6	1,8	10,3
plantio direto 9 anos - silte	10,5	0,9	11,8
plantio direto 9 anos - areia fina	5,5	0,5	10,6
plantio direto 9 anos - areia grossa	3,0	0,5	6,3

É possível verificar utilizando a Figura 34, que compara os teores de C e N entre as frações físicas e os sistemas de manejo, que a fração argila foi a que apresentou maiores porcentagens de C e de N , e que há menos carbono e nitrogênio disponível na argila do plantio direto que nos demais sistemas de manejo, sendo que a argila da mata foi a com maior teor de C e de N .

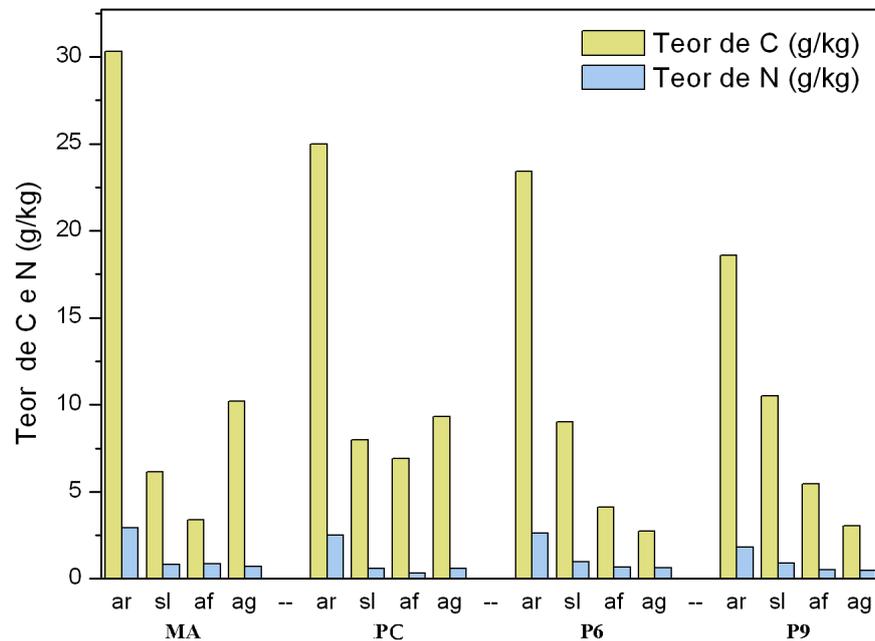


Figura 34: Teor de *C* e de *N* comparativo entre os sistemas de manejo e frações físicas. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos, P9 = plantio direto de nove anos, ar = argila, sl = silte, af = areia fina e ag = areia grossa.

O maior teor de *C* na fração argila pode ser explicado pelo fato de esta fração ser mais reativa (maior superfície específica) que as demais, promovendo mais ligações com o carbono, e também pela proteção física gerada na MOS pelas partículas de argila.

Para as amostras sob plantio direto, as porcentagens diminuem com o aumento do tamanho da fração, e que não ocorre para os demais sistemas. Neles, os teores diminuem no silte e mais ainda na areia fina, mas tornam a aumentar na fração areia grossa. Assim, no plantio direto a fração silte possui maior teor de *C*, e as frações areia fina e areia grossa um teor menor que a mata e o plantio convencional.

Comparativamente às mesmas frações dos demais sistemas de plantio, a razão *C/N*, Figura 35, foi maior para o sistema plantio convencional, que em geral apresenta os menores teores de nitrogênio. A fração areia fina da mata apresentou o menor valor, pois apresentou o menor dos teores de *C*. Como a razão *C/N* traz informações sobre o grau de humificação e que quanto menor o valor dessa razão mais humificado é o solo (ZECH, 1997), podemos dizer, por esta análise, que a areia fina da mata apresentou maior grau de humificação. O menor grau de humificação foi obtido para a areia fina do sistema plantio convencional.

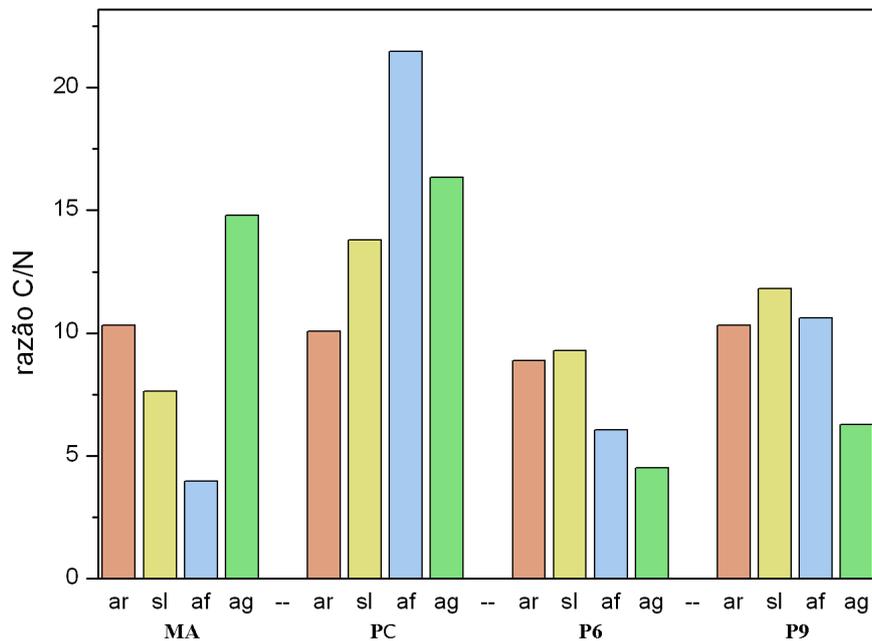


Figura 35: Comparativo da razão C/N entre os sistemas de manejo e frações físicas. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos, P9 = plantio direto de nove anos, ar = argila, sl = silte, af = areia fina e ag = areia grossa.

Nas amostras sob plantio direto, a fração areia grossa apresentou menor razão C/N e a fração silte maior valor para esta razão. Este resultado está de acordo com Martins (2009) que, ao estudar um latossolo, obteve menor razão para a fração areia grossa e maior valor para o silte para todos os sistemas de manejo estudados, plantio direto, preparo mínimo e plantio convencional.

5.5 Espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL)

5.5.1 Solo inteiro

Na Figura 36 estão apresentados os espectros de emissão da fluorescência das amostras de solo inteiro. A emissão se deu no mesmo comprimento de onda, com picos entre 521-523 nm, o que caracteriza os mesmos fluoróforos.

A Figura mostra que a maior intensidade de fluorescência ocorreu para o plantio direto de 9 anos, o que se deve a grande disponibilidade de matéria orgânica proveniente dos

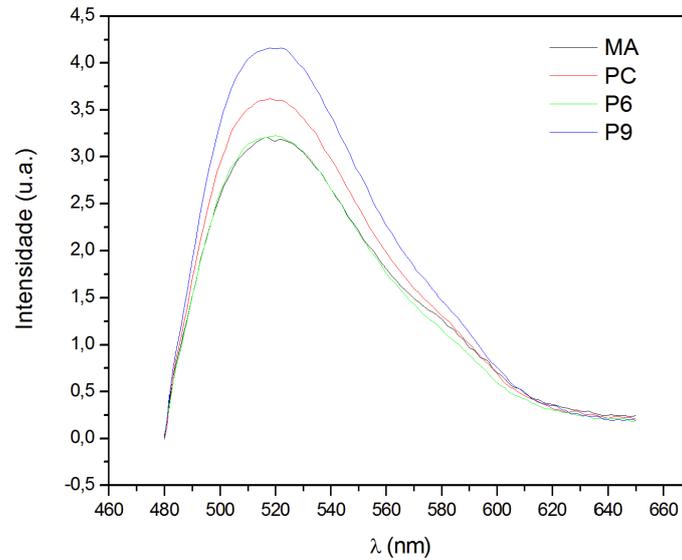


Figura 36: Espectros de emissão de fluorescência obtidos por FIL para as amostras de solo inteiro. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

restos de vegetação deixadas no solo e está de acordo com o maior teor de C verificado na Tabela 6. A menor intensidade se deu para a mata e para o plantio direto de 6 anos. A Tabela 8 mostra a humificação para cada amostra, que é dada pela área da fluorescência normalizada pelo teor de carbono (Equação 3.3), disponibilizado na Tabela 6.

Tabela 8: Índice de humificação obtidos por FIL (H_{FIL}) das amostras de solo inteiro.

Amostra	H_{FIL} (u.a.)
mata - solo inteiro	19,6
plantio convencional - solo inteiro	20,6
plantio direto 6 anos - solo inteiro	18,6
plantio direto 9 anos - solo inteiro	19,5

A Figura 37 compara os índices de humificação mostrados na Tabela 8, para o solo inteiro de todos os sistemas de plantio. Na Figura, que inclui o desvio padrão das três medidas, é possível verificar que não há discrepância entre os sistemas de plantio.

Favoretto (2008) e Martins (2009), estudando o grau de humificação de latossolos em diferentes sistemas de manejo por FIL, e Bayer et al. (2003), estudando a humificação de um Cambissolo Húmico utilizando RPE, obtiveram os menores índices de humificação para amostras submetidas ao plantio direto e maiores para o plantio convencional. Este também era o resultado esperado para este Cambissolo Háplico, pois no plantio direto estão presentes materiais orgânicos mais lábeis devido à incorporação de maior quantidade

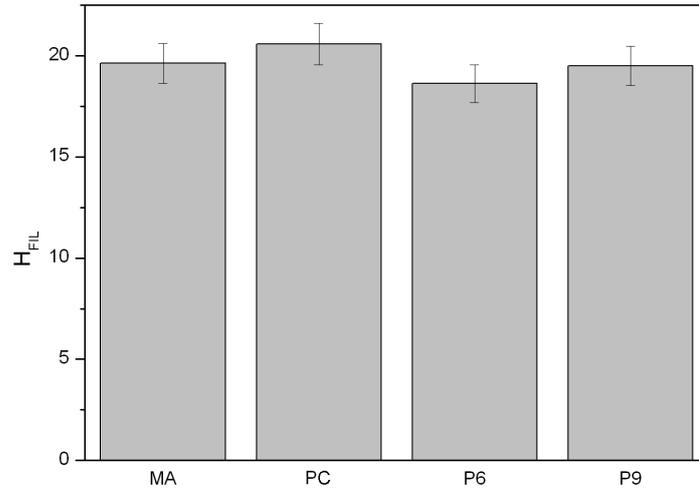


Figura 37: Índice de humificação obtidos por FIL (H_{FIL}) comparativo para o solo inteiro entre os sistemas de manejo: MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

de MO recente, propiciando um aumento das estruturas alifáticas (SEGNINI, 2007), enquanto que o plantio convencional propicia um aumento das estruturas aromáticas, mais humificadas.

Os resultados encontrados neste trabalho podem ser explicados pelo histórico do solo. Como visto na seção 4.1, os agricultores da região revolvem o solo no plantio direto. Além disso, a profundidade no horizonte A (aproximadamente 20 cm) do solo estudado pode ser grande para verificar o efeito do plantio na humificação da MOS. Os resultados obtidos por Milori et al. (2006) mostraram que a partir de 15 cm de profundidade o solo submetido ao PD possui igual ou maior humificação já em profundidade menores de 10 cm a MOS sob PD possui menor humificação em comparação ao PC. Estes fatos provavelmente fazem com que a quantidade de MOS humificada não atinja o grau esperado para um plantio convencional, e não ocorram diferenças, em termos qualitativos ou de estabilidade, entre os manejos.

Segnini (2007) não obteve diferenças no grau de humificação da MOS obtido por FIL de um Latossolo Vermelho Eutroférico muito argiloso, submetido ao plantio convencional e ao plantio direto, sem adição de calcário. Passados 6 anos da primeira amostragem, a humificação do plantio direto diminuiu. O mesmo autor, ao analisar a humificação de amostras de solo submetidos ao cultivo mínimo e plantio direto de 6, 14 e 22 anos observou que os índices de humificação não sofrem variação.

5.5.2 Frações físicas do solo

A Figura 38 mostra os espectros de emissão de fluorescência para o solo fracionado. A emissão se deu no mesmo comprimento de onda o que caracteriza os mesmos fluoróforos.

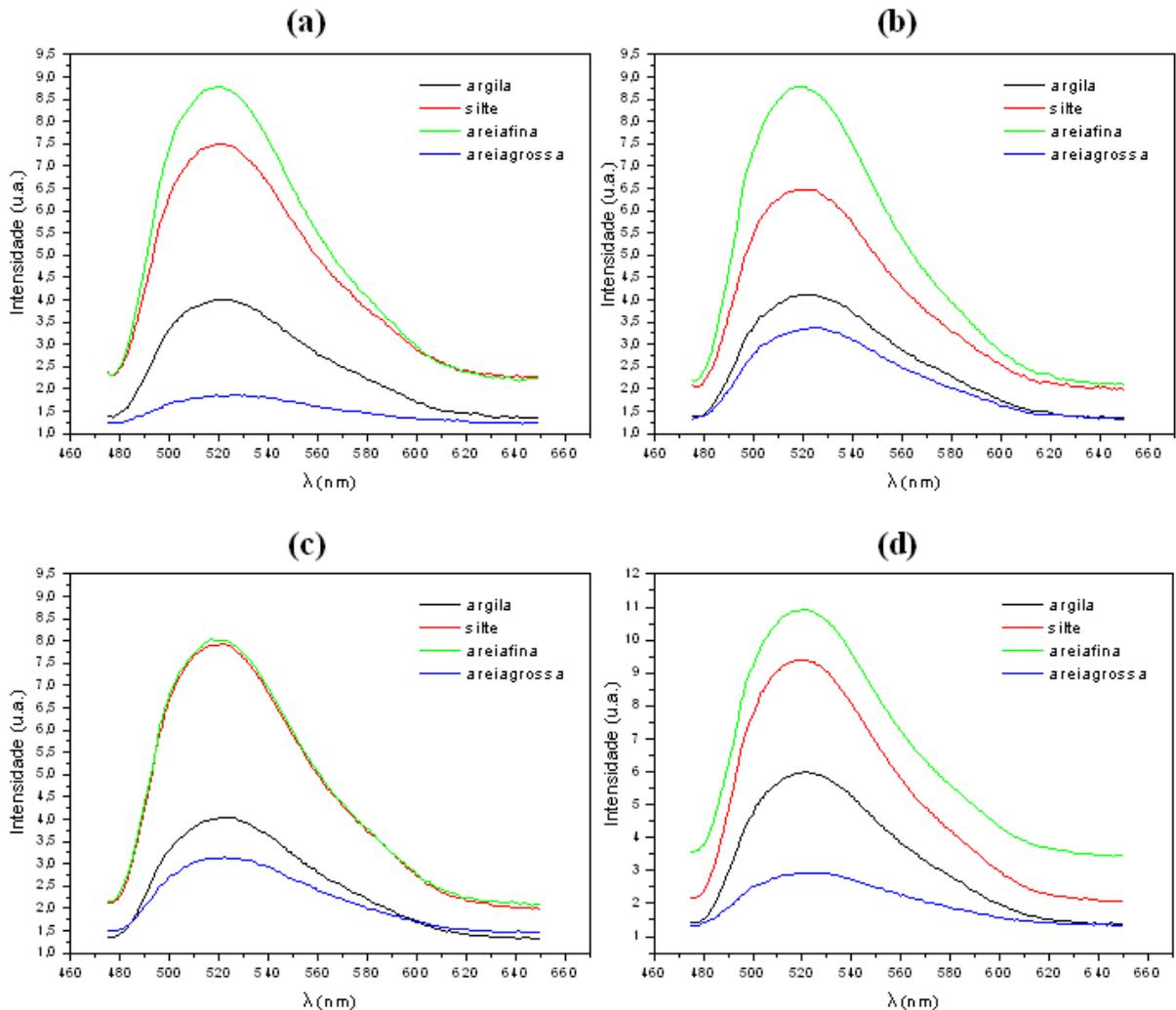


Figura 38: Espectros de emissão de fluorescência obtidos por FIL. a) Frações físicas da Mata. b) Frações físicas do Plantio convencional. c) Frações físicas do Plantio direto de 6 anos. d) Frações físicas do Plantio direto de 9 anos.

A intensidade das curvas de fluorescência está intimamente relacionada à concentração de C orgânico presente em estruturas rígidas, assim, na Figura 38, pode-se notar que possuem maior concentração de C , em ordem decrescente, as frações areia fina, silte, argila e areia grossa, com exceção do plantio direto de 6 anos, que possui semelhantes as curvas das frações silte e areia fina.

O mesmo padrão não ocorre quando normalizamos a área da fluorescência com o teor de carbono, mostrado na Tabela 7, de acordo com a Equação (3.3), para obter o grau de humificação das amostras de solo (H_{FIL}), mostrados na Tabela 9. Nela verifica-se que,

após a normalização, a fração argila é sempre a menos humificada, mesmo não sendo a fração que apresenta menor área de fluorescência. Isto ocorre porque o carbono presente nessa fração não sofre estabilização química, mas física, devida ao encapsulamento promovido pelos minerais altamente reativos dessa fração. A fração areia fina que apresenta a maior área de FIL é também a mais humificada.

Tabela 9: Índice de humificação obtidos por FIL (H_{FIL}) das frações físicas.

Amostra	H_{FIL} (u.a.)
mata - argila	14,2
mata - silte	126,0
mata - areia fina	253,3
mata - areia grossa	25,8
plântio convencional - argila	17,6
plântio convencional - silte	84,1
plântio convencional - areia fina	121,8
plântio convencional - areia grossa	41,2
plântio direto 6 anos - argila	23,1
plântio direto 6 anos - silte	74,0
plântio direto 6 anos - areia fina	144,4
plântio direto 6 anos - areia grossa	125,0
plântio direto 9 anos - argila	24,5
plântio direto 9 anos - silte	98,9
plântio direto 9 anos - areia fina	282,2
plântio direto 9 anos - areia grossa	129,5

Estas análises podem ser melhor visualizadas na Figura 39, que esquematiza comparativamente os índices de humificação mostrados na Tabela 9, para as frações físicas do solo.

Nos sistemas mata e plântio convencional, a fração silte é mais humificada que a fração areia grossa enquanto que para o plântio direto a situação se inverte.

A fração areia fina é a mais humificada pois ela, em geral, apresenta o sinal mais intenso de fluorescência (Figura 38) para o menor teor de C orgânico (Tabela 7). Isto ocorre porque nesta fração não há proteção física da matéria orgânica, como ocorreu na fração argila. Assim na MOS da fração areia fina o carbono encontrado é da matéria orgânica humificada e não da fração lábil (SAAB; MARTIN-NETO, 2003).

Favoretto (2008) e Martins (2009), utilizando FIL, também obtiveram índices de humificação mais elevados nas amostras de areia e inferiores na fração argila, no estudo de latossolos. Já Bayer et al. (2003), obteve por RPE, maior grau de humificação para a fração silte de um Cambissolo Húmico. Saab e Martin-Neto (2003) estudando por EPR

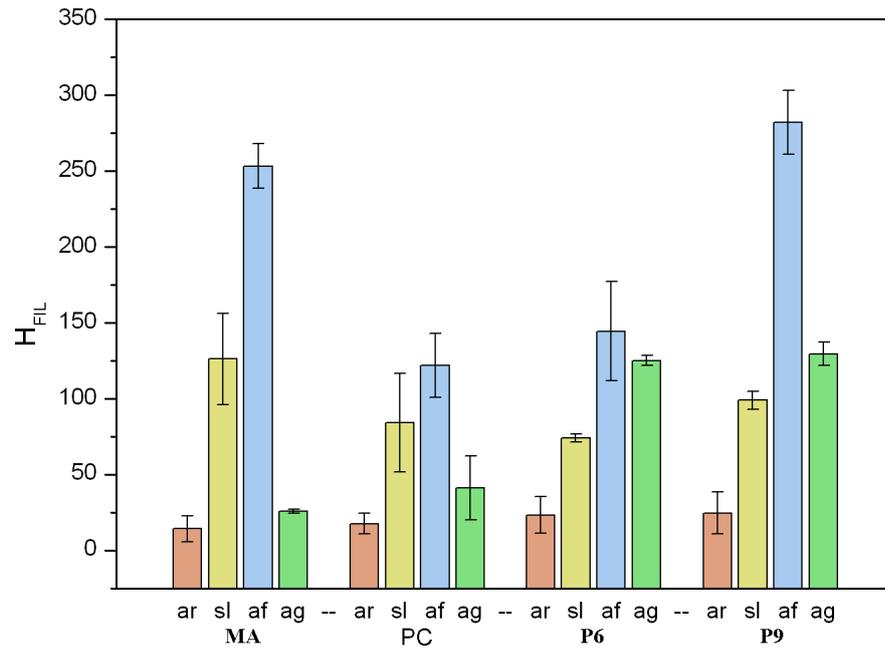


Figura 39: Índice de humificação (H_{FIL}) comparativo entre os sistemas de manejo e frações físicas. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos, P9 = plantio direto de nove anos, ar = argila, sl = silte, af = areia fina e ag = areia grossa.

a humificação da MOS das frações físicas de um Gleissolo mostraram que a fração silte e areia fina foram as mais estáveis, mesmo com calcinação das amostras a temperaturas maiores que 400 °C.

5.6 Espectroscopia de fluorescência de AH

Como descrito na seção 3.2.1.2, os espectros de fluorescência de AH obtidos pelos métodos sugeridos por Zsolnay et al. (1999) (excitação em 240 nm, varredura entre 350 e 650 nm e grau de humificação calculado por meio da razão A_4/A_1 , onde A_4 é a área da região entre 570 e 641 nm e A_1 entre 356 e 432 nm) e por Milori et al. (2002b) (excitação em 465 nm, varredura entre 475 e 650 nm e humificação dada pela área total da fluorescência - A_{465}) são mostrados na Figura 40.

Enquanto o método de Zsolnay excita vários fluoróforos, devido ao uso de radiação ultravioleta, o método de Milori atua em um grupo específico de fluoróforos, o que resulta em espectros com formatos distintos, como os mostrados aqui (SEGNINI, 2008).

O pico existente em 484 nm na Figura 40 (a) não é característico das amostras, mas do equipamento de medidas. Para verificar isto, foi realizada a análise do espectro de fluorescência nas mesmas condições do método de Zsolnay et al. (1999) na célula de

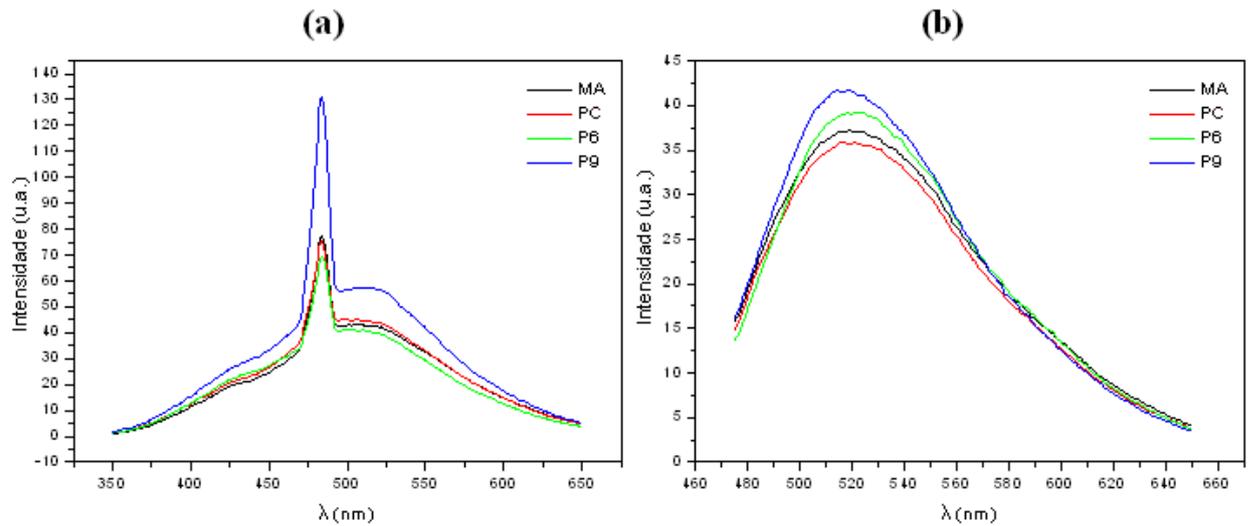


Figura 40: Espectros de fluorescência dos AH dos quatro sistemas de plantio, obtidos pelo método de (a) Zsolnay et al. (1999), excitação em 240 nm e (b) Milori et al. (2002b), excitação em 465 nm. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

quartzo, o recipiente que recebe a amostra, que pode ser observado na Figura 41, com pico no mesmo comprimento de onda.

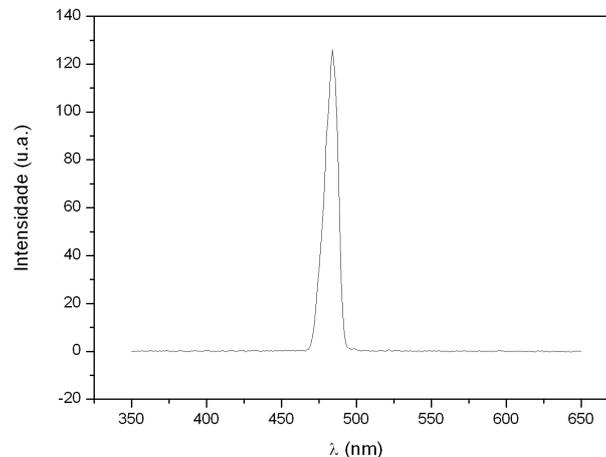


Figura 41: Espectro de fluorescência da célula de quartzo.

O pico extra não influenciou nas análises realizadas pois não está entre os quartos A_1 e A_4 considerados, já mostrados na Figura 13.

Os valores de humificação obtidos pelos dois métodos, dados pela razão A_4/A_1 e pela área A_{465} , são mostrados pela Tabela 10.

A Figura 42 traz um diagrama comparativo dos valores de humificação para cada um dos dois métodos. A Figura inclui o desvio padrão das três medidas e mostra que, para o método de Zsolnay et al. (1999), Figura 42 (a), há uma variação da razão A_4/A_1 . Um

Tabela 10: Humificação dos AH para os quatro sistemas de plantio, obtidos por fluorescência, pelo método de (a) Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1) e (b) Milori et al. (2002b) (A_{465}).

Amostra de AH	A_4/A_1	A_{465} (u.a.)
Mata	1,29	3839,2
Plantio convencional	1,16	3672,4
Plantio direto - 6 anos	0,96	3886,2
Plantio direto - 9 anos	1,11	4019,5

maior valor desta razão indica um maior grau de humificação, o que significa que a mata é a amostra mais humificada, seguida do sistema plantio convencional que não difere muito do valor obtido para o plantio direto de 9 anos. O plantio direto de 6 anos apresentou o menor valor.

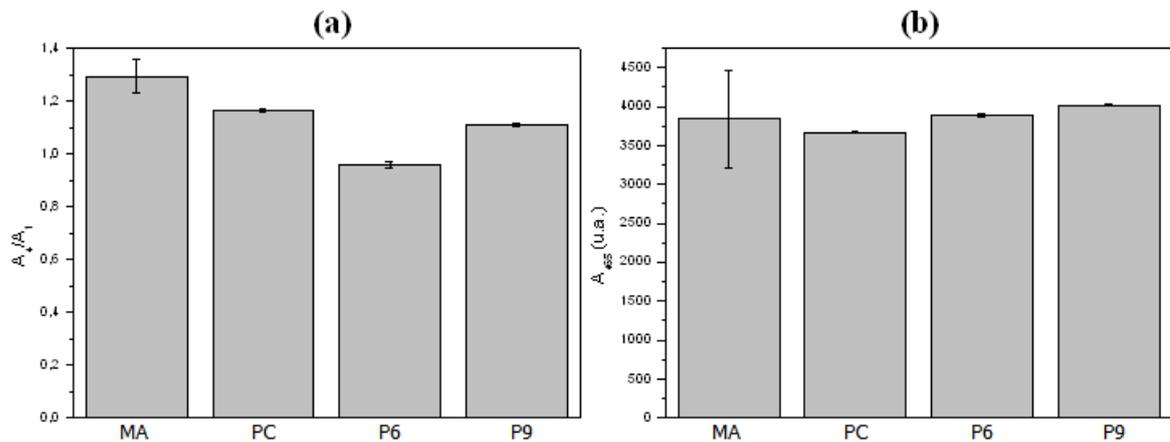


Figura 42: Diagrama representativo dos índices de humificação dos AH para os quatro sistemas de plantio, obtidos pelo método de (a) Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1) e (b) Milori et al. (2002b) (A_{465}). MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

Este resultado está de acordo com Favoretto (2007) e Martins (2009) que encontraram menores valores de humificação, utilizando FIL para o plantio direto, mas difere dos resultados de FIL para este solo, discutidos na seção 5.5.

Os valores obtidos pelo método de Milori et al. (2002b), comparados na Figura 42 (b) são muito semelhantes aos obtidos por FIL, não indicando diferenças entre os manejos. Esta semelhança com os dados obtidos por FIL é esperada pois a excitação ocorre no mesmo comprimento de onda, 465 nm, e portanto, sensibiliza os mesmos fluoróforos. A diferença é que a espectroscopia de FIL, por ser feita utilizando o solo inteiro e não somente a fração mais humificada (caso da fluorescência de AH), avalia MOS total e não somente a porção mais estável. A análise de FIL poderia ter gerado um efeito de diluição devido à presença de material não humificado e porque muito do C presente não contribui para o sinal da fluorescência, mas contribui para o teor de C , o que poderia resultar em uma

diminuição do índice de humificação obtido. Esta semelhança mostra a eficácia da técnica FIL, que apresentou os mesmos resultados sendo de aplicação mais simples.

González-Pérez et al. (2004) utilizou, entre outros, o método de Milori et al. (2002b) para avaliar a humificação de um latossolo brasileiro submetido a diferentes sistemas de manejo. Seus resultados apontam para uma diferença muito pequena entre o sistema plantio direto e o plantio convencional, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

5.7 Espectroscopia de absorção de luz UV-Visível (razão E_4/E_6)

O decréscimo da razão E_4/E_6 está diretamente relacionado ao aumento do peso molecular e a condensação dos carbonos aromáticos, e a aromaticidade é inversamente relacionada à quantidade de grupos alifático (SAAB e MARTIN-NETO, 2007). Os espectros de absorção de luz UV-Visível das amostras de AH estão na Figura 43.

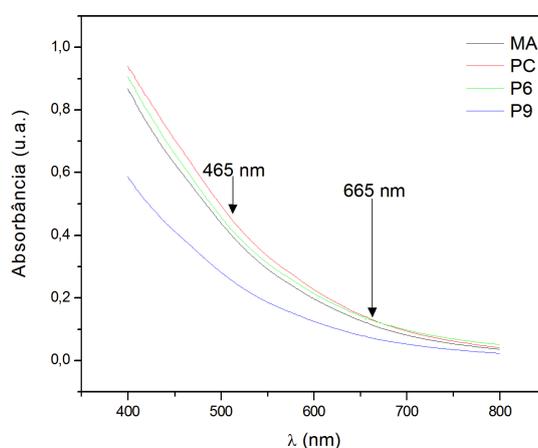


Figura 43: Espectros de absorção de luz UV-Visível das amostras de AH. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

A razão E_4/E_6 de ácidos húmicos é um valor em torno de 5 e é considerado como sendo inversamente relacionado ao grau de condensação das macromoléculas de AH e a seu grau de humificação (SENESI et al., 2003). A Tabela 11 mostra os índices de humificação E_4/E_6 obtidos por essa técnica.

A Figura 44 mostra uma comparação entre os índices de humificação obtidos por essa técnica e por ela podemos verificar que a variação no valor da razão E_4/E_6 é muito pequena e insignificante quando a barra de erro (referente ao desvio padrão das três medidas) é

Tabela 11: Humificação dos AH para os quatro sistemas de plantio, obtidos pela razão E_4/E_6 da espectroscopia de absorvância de UV-Visível.

Amostra de AH	E_4/E_6
Mata	5,3
Plantio convencional	5,2
Plantio direto - 6 anos	4,8
Plantio direto - 9 anos	5,4

considerada, o que está de acordo como os resultados de humificação obtidos por FIL, para o solo inteiro, e por fluorescência de AH no método de Milori et al. (2002b).

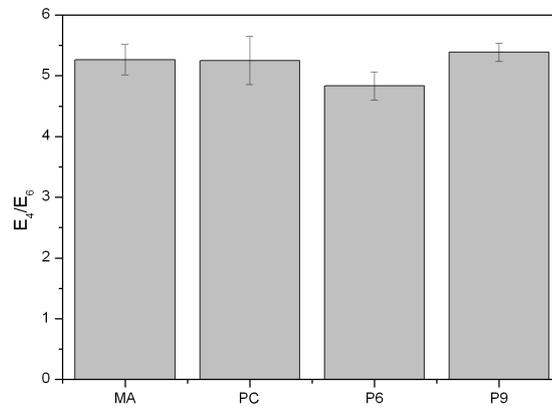


Figura 44: Comparativo entre os índices de humificação obtidos pela razão E_4/E_6 da espectroscopia de absorvância de UV-Visível das amostras de AH. MA = mata, PC = plantio convencional, P6 = plantio direto de seis anos e P9 = plantio direto de nove anos.

6 Conclusão

As análises de IV permitiram identificar os grupos funcionais presentes nos AH, e estiveram em acordo com o referencial teórico. Mostraram ainda a diferença entre AH purificados uma e duas vezes.

A hipótese de que as amostras de solo submetidas ao plantio direto apresentam menor grau de humificação que amostras submetidas ao plantio convencional não foi corroborada nesse trabalho pois os dados obtidos por FIL para o solo inteiro mostram que, não há diferenças, quando considerado o desvio padrão, no grau de humificação obtido para os sistemas de plantio.

As análises de fluorescência de AH pelo método de Milori et al. (2002b) e por meio da razão E_4/E_6 da absorção de luz UV-Visível forneceram o mesmo resultado que o FIL do solo inteiro: não há diferenças no grau de humificação entre os sistemas de plantio. Este resultado pode ser explicado ao analisarmos o histórico do solo, pois nas amostras sob plantio direto o solo foi revolvido, igualando a humificação em todos os sistemas, além da profundidade no horizonte A (aproximadamente 20 cm) do solo estudado pode ser grande para verificar o efeito do plantio na humificação da MOS.

A fração argila mostrou baixo grau de humificação para todos os manejos, obtido pela razão C/N e por FIL. Os resultados obtidos por FIL mostram maior grau de humificação para a fração areia fina, para todos os sistemas de manejo.

Como sugestão para trabalhos futuros pode ser feita a caracterização por RMN dos AHs, o fracionamento por solubilidade (químico) das frações físicas, a determinação da humificação dos AHs obtidos comparando com os resultados de FIL das frações físicas e a análise por difração de raios X as amostras de ácidos húmicos purificadas uma única vez.

Referências

- ATKINS, P. W. *Physical chemistry*. 6ed. Oxford, Oxford University Press, 1998.
- BAYER, C. *Dinâmica da matéria orgânica em sistemas de manejo de solos*. 1996, 240 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, RS, 1996.
- BAYER, C. MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C. A. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a Sandy Clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. *Soil & Tillage Research*, v. 53, p. 95-104, 2000.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; SAAB, S. C.; MILORI, D. M. B. P.; BAGNATO, V. S. Tillage and cropping system effects on soil acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. *Geoderma*, v. 105, p. 81-92, 2002a.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P.R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. *Plant Soil*, 238:133-140, 2002b.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S. C. Diminuição da humificação da matéria orgânica de um cambissolo húmico em plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, p. 537-544, 2003.
- BENASSI, D. A.; *Percepção e uso dos solos: o caso dos agricultores familiares da região centro-sul do Paraná*. 2008, 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2008.
- BEUTLER, A. N. et al. Agregação de Latossolo Vermelho distrófico típico relacionada com o manejo na região dos cerrados no Estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 25, n. 1, p. 129-136, 2001.
- CANELLAS, L.P.; GURIDI, F.; VELLOSO, A.C.X.; SANTOS, G.A. Isolamento, purificação e métodos químicos de análise de substâncias húmicas. In: CANELLA, L. P.; SANTOS, G. A. Humosfera: tratado preliminar sobre a química da substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes: L. P. CANELLAS, G. A. SANTOS. cap. 1. p. 13-33, 2005.
- CANELLAS, L.P.; BALDOTTO, M.A.; BUSATO, J.G.; MARCIANO, C.R.; MENEZES, S.C.; SILVA, N.M.; RUMJANEK, V.M.; VELLOSO, A.C.X.; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L. Estoque e qualidade da material orgânica de um solo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 31, n. 2, p. 331-340, 2007.
- CLASEN, H. A. C. et al. Ácidos húmicos e fúlvicos do carvão da jazida de cadiota. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 4, n. 1, p. 35-40, 1998.

- CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of American Journal*, v. 41, n. 2, p. 352-358, 1977.
- CHRISTENSEN, B. T. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Advances in Soil Science*, v. 20, p. 1-19, 1992.
- CONCEIÇÃO, P. C. et al. Fracionamento densimétrico com politungstato de sódio no estudo da proteção física da matéria orgânica em solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 541-549, 2008.
- CORNEJO, J.; HERMOSÍN, M.C. Interaction of humic substances in soil clays. In: PICCOLO, A. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Amsterdam: Elsevier. p. 595-624, 1996.
- COSTA, F. S. et al. Propriedades físicas de um Latossolo Bruno afetadas pelos sistemas de plantio direto e preparo convencional. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, p. 527-535, 2003.
- CUNHA, T. J. F. et al. Fracionamento da matéria orgânica humificada em solos brasileiros. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes: L. P. CANELLAS, G. A. SANTOS, 2005. cap. 3. p. 54-80.
- CURI, N. (Coord.) *Vocabulário de ciência do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1993.
- DIECKOW, J. et al. Sistemas de preparo do solo e características espectrocópicas da matéria orgânica em ambientes tropicais e subtropicais brasileiros. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2005.
- EMBRAPA. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999, 412 p.
- EWING, G. W. *Métodos Instrumentais de Análises Químicas*. São Paulo, Edgard Blücher, p. 1-40, 1972.
- FAVORETTO, C. M. *Caracterização da matéria orgânica humificada de um Latossolo Vermelho distrófico através da espectroscopia de fluorescência induzida por laser*. 2007, 96 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2007.
- FAVORETTO, C. M.; GONCALVES, D.; Milori, D. M. B. P.; ROSA, J. A.; LEITE, W. C.; BRINATTI, A. M.; SAAB, S. C. Determinação da humificação matéria orgânica de um latossolo e suas frações organo-minerais. *Química Nova*. v. 31, p. 1994-1996, 2008.
- FELLER, C. BEARE, M. H. Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. *Geoderma*, v. 79, p. 69-116, 1997.
- FERREIRA, J. A. et al. Caracterização espectroscópica da matéria orgânica do solo. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2004, 3 f. (Circular Técnica, 24).
- FIALHO, L. L. *Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos*. 2007, 170 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos (SP), 2007.

- GASSEN, D.; GASSEN, F. *Plantio direto: o caminho do futuro*. 2. ed. Passo Fundo: Aldeia Sul Editora, 1996. 207 p.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S.C.; NOVOTNY, E.H.; MILORI, D.M.B.P.; BAGNATO, V. S.; COLNAGO, L.A.; MELO, W.J.; KNICKER, H. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and Fluorescence spectroscopy. *Geoderma*, [S.l.], v.118, p.181-190, 2004.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M. et al. A laser-induced fluorescence spectroscopic study of organic matter in a Brazilian Oxisol under different tillage systems. *Geoderma*, v. 138, p. 20-24, 2007.
- INTERNATIONAL Humic Substance Society - IHSS. Disponível em: <<http://ihss.gatech.edu/ihss2/index.html>>. Acesso em: 20 mar. 2010.
- KALBITZ, K.; GEYER W.; GEYER S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances - A reflection of land use history in a fen área. *Biogeochemistry*, v. 47: 219-379, 1999.
- MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A. E.; TRAGHETA D. G. Effects of cultivation on ESR spectrun of organic matter from soil size fractions of a mollisol. *Soil Science*, v.157, p. 365-372, 1994.
- MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A.; TRAGHETTA, D. G. *Fracionamento físico da matéria orgânica do solo e caracterização por espectroscopia de EPR*. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, dez. 1996, 7 f.
- MARTIN-NETO, L. et al. Ressonância magnética nuclear e eletrônica aplicadas a estudos da matéria orgânica em amostras de solos intactas e fracionadas fisicamente. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1998.
- MARTIN-NETO, L.; ROSEL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a grassland climosequence. *Geoderma*, v.81, p. 305-311, 1999.
- MARTINS, T. *Caracterização mineralógica e da matéria orgânica do solo por técnicas espectroscópicas e DRX*. 2009, 177 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 2009.
- MEURER, E. J. Introdução à ciência do solo. Fundamentos da química do solo. 1ed. Porto Alegre: Gênese, p. 11-21, 2000.
- MIELNICZUK J.; BAYER, C.; VEZANNI, F. M., LOVATO, T.; FERNANDES F. F.; DEBARBA, L. Manejo do solo e sua relação com os estoques de carbono e nitrogênio do solo. In: *Tópicos em ciência do solo*, v.1. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, p.209-248, 2003.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C. Fluorescência induzida por laser para análise da matéria orgânica de solos intactos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2002a.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO L.; BAYER C.; MIELNICZUK J.; BAGNATO V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy.

Soil Science, v. 167, n. 11, p. 739-749, nov. 2002b.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L.; GALETI, H. V. A.; PÉREZ, M. G.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; SALTON, J. Índice de humificação obtido através da fluorescência induzida por laser. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2004.

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

NARIMOTO, K. M. *Técnicas espectroscópicas aplicadas à análise da matéria orgânica do solo em pomares de citros sob adição de lodo de esgoto*. 2006, 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Aplicada) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos (SP), 2006.

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

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

ORLOV, D. S. *Humus acids of soils*. Moscow: Moscow University Publisher, 1974. 378 p.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to spectroscopy*. 2ed. New York: Sunders, 1996.

PICCOLO A.; CONTE P.; Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. *Advances in Environmental Research*, v. 166, p. 508-521, 2001.

PINHEIRO, E. F. M. et al. Fracionamento densimétrico da matéria orgânica do solo sob diferentes sistemas de manejo e cobertura vegetal em Paty do Alferes (RJ). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 28, p. 731-737, 2004.

REICHARDT, K.; TIMM L. C. *Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações*. Barueri - SP, Manole, 2004.

SÁ, M.A.C. de et al. Índice de desagregação do solo baseado em energia ultrassônica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.23, n.3, p.525-531, 1999.

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

SAAB, S. C.; MARTIN-NETO, L. Use of the EPR technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 497-498, 2003.

SAAB, S. C.; MARTIN-NETO, L. Anéis aromáticos condensados e relação E4/E6: estudo de ácidos húmicos de Gleissolos por RMN de ^{13}C no estado sólido utilizando a técnica

- CP/MAS desacoplamento defasado. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 260- 263, 2007.
- SAAB, S. C.; MARTIN-NETO, L. 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.
- SALTON, J. C. et al. Agregação e estabilidade de agregados do solo em sistemas agropecuários em Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 11-21, 2008.
- SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, v. 82, p. 29-30, 1993.
- SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Science*, v. 162, n. 2, p. 115-130, fev. 1997.
- SEGNINI, A. *Estrutura e estabilidade da matéria orgânica em áreas com potencial de seqüestro de carbono no solo*. 2007, 130 f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências - Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.
- SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acids and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part TT. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*. v. 232, p. 77-106, 1990.
- SENESI, N.; MIANO, T. N.; PROVENZANO, M. R.; BRUNETTI, G. Characterization differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*. V. 152, p. 111-120, 1991.
- SENESI, N.; ORAZIO V. D.; RICCA G. Humic acids in the first generation of EURO-SOILS. *Geoderma*. V. 116, p. 325-344, 2003.
- SHARMA, A.; SCHULMAN, S. G. *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. Canada: John Wiley & Sons, Inc., 1999, 173 p.
- SILVA, L. S.; CAMARGO, F. A. O.; CERETTA, C. A. Composição da fase sólida orgânica do solo. In: MEURER, E. J. *Fundamentos de Química do Solo*. 1. ed. Porto Alegre: Gênese, 2000. cap. 03. p. 45-62.
- SILVA NETO, L. F.; INDA JUNIOR, A. V.; BAYER, Cimélio; DICK, D. P.; TONIN, A. T. Óxidos de ferro em Latossolos tropicais e subtropicais brasileiros em plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 1873-1881, 2008.
- SILVERSTEIN, R. N.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. *Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos*. 5. ed. São Paulo: Guanabara, 1994. 387 p.
- SIMPSON, A. J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 40, S72-S80, 2002.
- SIX, J.; ELLIOTT, E. T; PAUSTIAN, K. Aggregate and soil organic matter dynamics under convencional and no-tillage systems. *Soil Science Society of American Journal*, v. 63, p. 1350-1358, 1999.
- SOLLINS, P.; HOMANN, P.; CALDWELL, B. A. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, v. 74, p. 75-105, 1996.

- STEVENSON, F. J. *Húmus Chemistry: Genesis, composition, reactions*. 2. ed. New York: Wiley, 1994, 496 p.
- STUART, B. *Modern infrared spectroscopy: analytical chemistry by open learning*. New York: John Wiley, 1996. 179 p.
- SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: D.L Sparks. eds. *Methods of soil analysis. Part3. Chemical Methods*. Soil Sci.Soc.Am. Book Series: 5. Soil Sci. Soc. Am Madison, WI. 1996. Cap.35, p.1018-1020.
- TANNER, C. B.; JACKSON, M. L. Nomographs of sedimentation times for soil particles under gravity or centrifugal acceleration. *Soil Science Society proceeding*, p.60-65, 1947.
- TESTA, V. M. *Características químicas de um solo Podzólico Vermelho-Escuro, nutrição e rendimento de milho afetados por Sistemas de culturas*. 1989, 146 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1989.
- TIPLER P. A.; LLEWELLYN R. A.; *Física Moderna*. 3ed. Rio de Janeiro, LTC, 2001.
- ZECH W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER G.; KAISER K.; LEHMANN J.; MIANO T. M. MILTNER A.; SCHROTH G. Factors controlling Humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, v. 79, p.117-161, 1997.
- ZSOLNAY, A. et al. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*, v. 38, n. 1, p. 45-50, 1999.