UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LUIZA GIMENES RODRIGUES ALBUQUERQUE

**Estudo de métodos para determinação total,
fracionamento e análise de especiação elementar
em fertilizantes base orgânica**

Versão Corrigida

São Paulo

Data do Depósito na SPG

16/10/2017

LUIZA GIMENES RODRIGUES ALBUQUERQUE

**Estudo de métodos para determinação total,
fracionamento e análise de especiação elementar
em fertilizantes base orgânica**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Química)*

Orientador: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

A345e Albuquerque, Luiza Gimenes Rodrigues
 Estudo de métodos para determinação
total, fracionamento e análise de especiação
elementar em fertilizantes base orgânica / Luiza
Gimenes Rodrigues Albuquerque. - São Paulo, 2017.
 164 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
 Orientador: Oliveira, Pedro Vitoriano de

1. fertilizante orgânico. 2. digestão assistida
por micro-ondas. 3. ICP OES. 4. ICP-MS. 5.
especiação elementar. I. T. II. Oliveira, Pedro
Vitoriano de, orientador.

*Aos meus pais, Sandra e Marcos, e
à minha irmã, Rachel, pelo grande
apoio e incentivo incondicional*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira pela orientação, incentivo e aprendizado. Seu apoio e sua confiança foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus pais Sandra e Marcos pelo amor, carinho e apoio. Obrigada por desde cedo plantarem a semente da curiosidade e da dedicação, gerando como frutos todas as oportunidades que já tive e que virei a ter nesta vida.

À minha irmã Rachel pelo amor, amizade, boas conversas e bons conselhos. Agradeço o incentivo e a admiração que demonstra ter por mim, sendo mútuos estes sentimentos.

Ao meu amado noivo Vilmar pelo amor e compreensão. Seu carinho, apoio e companheirismo foram de grande importância em diversos momentos de minha vida.

Sou muito grata por ter você ao meu lado por tantos anos.

A toda a minha amada família, em especial à minha avó Iracema, minha tia e madrinha Simone, minha tia Cristina e minha prima Clara. Vocês foram fundamentais para a construção deste caminho.

A todos os queridos colegas e companheiros que estão ou já passaram pelo Grupo de Análises e Pesquisas em Espectrometria (GAPE), desde o meu período de iniciação científica: Alexandre Souza, André, Bruno, Danielle, Denise, Diego, Fábio, Flávio, Gabriel, Giselaíne, Guilherme, Isabella, Ivo, Leandro, Lelaine, Lucas, Maria, Mariana, Marcos, Rodrigo, Paulo, Sandra, Valeska, Vinícius, Vivian. Agradeço também às queridas técnicas Luciana (Lu) e Aline pelo apoio e pelas boas conversas.

Aos amigos que dividiram esta caminhada: Alexandre (Alê), Alexandrina (Alê), Aline, Daniel e Gislayne. Agradeço todos os momentos que compartilhamos: discussões de resultados, disciplinas e estudos em conjunto, ida ao LNLS, açaís e lanches. As conversas, as risadas e o apoio que dividimos em momentos que nunca imaginamos passar juntos nos tornaram muito próximos, e agradeço por tê-los em minha vida.

A todos os meus queridos amigos de graduação Alannah, César, Dani (dupla), Karen, Karina (metadinha), Glalci, Tayla e Vinícius pelos momentos bons e inacreditáveis, pelas horas na biblioteca e pelo apoio em diversas situações e disciplinas. Gostaria de agradecer em especial à Karina por ter me apresentado ao

Prof. Pedro e pelos ótimos momentos juntas durante o período de Iniciação Científica, e à Gláucia por sua cumplicidade, companhia e incentivo na pós-graduação. A todos os meus amigos do ETESP (Cambada), principalmente à Aline, Bruna e Evelyn.

Aos queridos professores Dra. Cassiana Seimi Nomura, Dra. Juliana Naozuka e Dr. Angerson Nogueira pelos bons conselhos, ensinamentos e oportunidades.

Ao Dr. Maciel dos Santos Luz pela ajuda e contribuição para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos professores Dr. Claudimir Lúcio do Lago, Dr. Renato Sanches Freire e Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha pelas valiosas contribuições em meu exame de Qualificação.

À Sra. Suzana Gazire e à Associação Brasileira de Insumos para Agricultura Sustentável (INPAS) pelo fornecimento das amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira pelo fornecimento de amostras, materiais de referência e pelos convites para participação de importantes discussões sobre fertilizantes com colegas da EMBRAPA e do LANAGRO.

Ao Prof. Dr. Thiago R. L. C. da Paixão por sua contribuição e solicitude nos trabalhos realizados.

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug e a Dra. Lidiane Cristina Nunes por disponibilizarem o seu laboratório para a realização da etapa final deste trabalho.

Ao Instituto de Química da USP, todos os seus professores e funcionários, pela infraestrutura e oportunidade de poder realizar minha graduação e pós-graduação nesta instituição.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela infraestrutura para a realização de parte deste trabalho.

A todos os meus colegas do IPT.

Às empresas parceiras Nova Analítica, Thermo Fischer Scientific e Agilent Technologies.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

ALBUQUERQUE, L. G. R. **Estudo de métodos para determinação total, fracionamento e análise de especiação elementar em fertilizantes base orgânica**. 2017. 164p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A aplicação de fertilizantes aos solos é frequente devido à atual demanda mundial pela produção de alimentos e às projeções feitas para o futuro. Fertilizantes orgânicos têm sido uma opção amplamente explorada devido ao seu preço, possibilidade de reuso de resíduos agrícolas e urbanos, além do caráter sustentável. Podem ser provenientes de diversas origens como lodo de esgoto, esterco e restos de animais e vegetais submetidos a processos de compostagem. Neste trabalho, foi desenvolvido método para determinação elementar total em fertilizantes orgânicos, substratos e condicionadores de solo, e realizados estudos de fracionamento e análise de especiação em fertilizante orgânico. Assim, foi realizada a caracterização geral das amostras com fracionamento por tamanho de partícula, análises dos teores de C e N, difração de Raios-X e determinação elementar total. Para este último, foi desenvolvido método de digestão assistida por radiação micro-ondas, com análise por ICP OES. O procedimento foi otimizado para diferentes misturas ácidas, as quais foram avaliadas quanto aos erros relativos para diversos elementos em CRM de lodo de esgoto, utilizando PCA como ferramenta estatística. A mistura escolhida, constituída por 3 mL HNO_3 + 1 mL HBF_4 + 2 mL H_2O , foi utilizada para digestão das amostras. Apenas a concentração total não traz informações a respeito da mobilidade e disponibilidade dos elementos, então estudos de fracionamento elementar também foram realizados. Na primeira abordagem foi executado fracionamento por tamanho de partícula, no qual foi observado que quanto menor o tamanho de partícula menor o teor de C e maior o teor de N, e maior a concentração de micronutrientes e contaminantes (Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn), indicando que estes elementos podem estar mais associados a frações com mais características inorgânicas e maior teor de humificação (dado pela razão C/N). A segunda abordagem refere-se à associação dos elementos com diferentes componentes da matriz seguindo o procedimento de extração sequencial do BCR e extrações em etapa única para avaliar a mobilidade, sendo os extratos analisados por ICP-MS. O elemento Cr mostrou baixa mobilidade e bioacessibilidade. Cu está associado, principalmente, à fração orgânica da matriz, porém também pouco móvel. Fe e Pb também apresentaram baixa mobilidade e associados, principalmente, a óxidos da amostra. Mn e Zn mostraram alta mobilidade, sendo também associados a matéria orgânica e aos óxidos. A análise de especiação dos extratos obtidos foi realizada por SEC-ICP-MS, de modo a investigar a associação dos elementos extraídos com ácidos húmicos e fúlvicos. Nenhum sinal de Cr estava relacionado com a matéria orgânica, enquanto que os elementos Cu, Fe e Pb mostraram associação com ácidos húmicos. Mn apresentou espécies associadas a ácidos fúlvicos, enquanto que o Zn, não está associado a espécies orgânicas.

Palavras-chave: fertilizante orgânico, digestão assistida por micro-ondas, ICP OES, ICP-MS, fracionamento, análise de especiação elementar

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, L. G. R. **Methods development for total elements determination, fractionating and speciation analysis on organic fertilizers.** 2017. 164p. Ph.D. Thesis – Graduate Program in Science (Chemistry). Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

Fertilizers are frequently applied to soils due to actual global food demand and its future projections. Organic fertilizers have been extensively employed due to its price, as a reuse possibility to agricultural and urban wastes, and its sustainable character. They can be prepared from various sources, such as sewage sludge, manure and plants and animal scraps, submitted to composting process. In this work, it was developed a total elements determination method, as well as fractionating studies and speciation analysis of organic fertilizer. Thus, organic fertilizer samples were generally characterized using particle size fractionating, C and N content analysis, X-Ray diffraction and total elements determination. To the last, it was developed a sample preparation method by microwave-assisted digestion and ICP OES analysis. Digestion procedure was optimized using various acid mixtures, which were evaluated due to its relative errors related to sewage sludge CRM values, using PCA as a statistical tool. The chosen acid mixture constituted of 3 mL HNO₃ + 1 mL HBF₄ + 2 mL H₂O was applied to samples digestion and their total elements determination. As total concentration is not enough to predict elements mobility and bioavailability, fractionation studies were conducted. The first approach was the particle size fractionation, where it was observed that the smaller the particle size the higher the micronutrients and contaminants concentration (Cr, Cu, Fe, Mn and Zn), along with lower C contents and higher N contents, indicating that these elements are associated with inorganic fractions, or with highly humified compounds (due to the lower C/N ratio). A second approach refers to elements association with various matrix components, using BCR and single-step extraction procedures to investigate elements mobility and bioavailability, with ICP-MS analysis of extracts. Cr was poorly mobile and bioavailable. Cu was bound to organic fraction, but also poorly mobile and bioavailable. Fe and Pb were also weakly mobile, and were mostly associated with oxides on matrix. Mn and Zn were greatly mobile and bioavailable, and were also mainly associated with oxides on matrix. Speciation analysis of extract was performed by SEC-ICP-MS, investigating elements association with humic and fulvic acids on previous extracts. Cr could not be associated with any humic substance, as expected with previous extractions results. Cu, Fe and Pb had identifiable species associated with humic acids, while Mn was associated with fulvic acids. Zn, even though high mobile, was not associated with any organic species.

Keywords: organic fertilizer, microwave-assisted digestion, ICP OES, ICP-MS, fractionating, elemental speciation analysis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCR: *European Community Bureau of Reference*

BEC: *Background Equivalent Concentration*, Concentração equivalente ao fundo

CEC: *Cation Exchange Capacity*, Capacidade de troca catiônica

CID: *Charge Injection Device*, Dispositivo de injeção de carga

CRM: *Certified Reference Material*, Material de referência certificado

DRX: Difração de Raios-X

EC: *Electric Conductivity*, Condutividade elétrica

EDTA: *Ethylene diamine tetraacetic acid*, Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPA: *Environmental Protection Agency*, Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América

EXAFS: *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*, Estrutura fina estendida de absorção de Raios-X

FA: *Fulvic Acid*, Ácido fúlvico

FAAS: *Flame Atomic Absorption Spectrometry*, Espectrometria de absorção atômica por chama

FFF: *Field Flow Fractionating*

GFAAS: *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite

HA: *Humic Acid*, Ácido húmico

HPLC: *High-performance Liquid Chromatography*, Cromatografia a líquido de alta eficiência

HS: *Humic Substances*, Substâncias húmicas

ICP-MS: *Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

ICP OES: *Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

IHSS: *International Humic Substances Society*, Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas

INAA: *Instrumental Neutron Activation Analysis*, Análise por ativação neutrônica instrumental

IR: *Infrared*, Infravermelho

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*, União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD: Limite de detecção

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncroton

LQ: Limite de quantificação

ORS⁴: *Octapole Reaction System*, Sistema de reação com octapolo

PCA: *Principal Components Analysis*, Análise de componentes principais

PI: Padrão interno

PTFE: Politetrafluoretileno

SEC: *Size Exclusion Chromatography*, Cromatografia de exclusão de tamanho

SBR: *Signal to Background Ratio*, Razão sinal/sinal de fundo

SOM: *Soil Organic Matter*, matéria orgânica do solo

SRC: *Single Reaction Chamber*, Câmara de reação única

TOC: *Total Organic Carbon*, Carbono orgânico total

TXRF: *Total Reflection X-Ray Fluorescence*, Fluorescência por reflexão total de Raios-X

UF: Ultrafiltração

US EPA: *United States Environmental Protection Agency*, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

UV-Vis: Ultravioleta e visível

XANES: *X-Ray Near-Edge Absorption Structure*, Espectrometria de absorção de Raios-X próximos à borda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produtividade estimada a partir do ano base 2004-2006 e terras agriculturáveis	16
Figura 2: Fluxograma da formação de ácidos húmicos e fúlvicos	26
Figura 3: Procedimentos e técnicas analíticas utilizados para a determinação elementar em fertilizantes orgânicos	35
Figura 4: Foto com as amostras de fertilizante, condicionadores e substrato in natura	68
Figura 5: Representação gráfica do sistema de peneiramento automático.....	69
Figura 6: Desenho esquemático dos frascos de digestão dentro do sistema do UltraWAVE	72
Figura 7: Fluxograma das etapas de extração sequencial usando o procedimento do BCR.....	82
Figura 8: Desenho esquemático do funcionamento da célula de colisão	86
Figura 9: Desenho esquemático do acoplamento HPLC-ICP-MS	94
Figura 10: Extração dos ácidos húmicos e fúlvicos das amostras de fertilizante orgânico e frações, seguindo o procedimento da IHSS	97
Figura 11: Distribuição de massa de material por fração de tamanho de partícula para as amostras.....	100
Figura 12: Frações das amostras com tamanho de partícula > 500 µm	101
Figura 13: Espuma formada com a adição de H ₂ O ₂ à amostra de fertilizante orgânico, antes de iniciar o processo de aquecimento.....	105
Figura 14: Gráfico de scores das duas primeiras componentes principais	108
Figura 15: Porcentagens de carbono e nitrogênio para cada fração de tamanho de partícula	115
Figura 16: Gráfico mostrando as relações entre concentração de Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn com a variação da razão C/N.....	118
Figura 17: Difractogramas de Raios-X da amostra de fertilizante orgânico	119
Figura 18: Resultados da extração sequencial BCR para o fertilizante orgânico	122
Figura 19: Porcentagens de extração dos elementos em cada meio extrator para o procedimento de etapa única	126

Figura 20: Espectros de absorção molecular para extratos de fertilizante orgânico em diferentes meios e soluções de ácido	129
Figura 21: Espectros de XANES das amostras de fertilizante não fracionado e fração menor que 300 µm para Cr	133
Figura 22: Espectros de XANES das amostras de fertilizante não fracionado e fração menor que 300 µm para Fe	133
Figura 23: Curva de calibração para SEC	135
Figura 24: Cromatogramas obtidos para os ácidos húmicos, fúlvicos e padrão de lignina	136
Figura 25: Cromatogramas obtidos para os diferentes extratos, nas diferentes frações de tamanho de partícula	139
Figura 26: Cromatogramas de SEC-ICP-MS para o Cu, extraído da fração de fertilizante orgânico maiores que 300 µm, em meio de HNO ₃ , H ₂ O e NH ₄ OH	147
Figura 27: Cromatogramas de SEC-ICP-MS para o Cu, extraído da fração de fertilizante orgânico menores que 300 µm, em meio de HNO ₃ , H ₂ O e NH ₄ OH	148
Figura 28: Cromatogramas SEC-ICP-MS para o Fe em extração em meio de NH ₄ OH, nas frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 µm	143
Figura 29: Cromatogramas SEC-ICP-MS para o Pb em extração em meio de NH ₄ OH, nas frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 µm	144
Figura 30: Cromatogramas SEC-ICP-MS para o Mn em extração em meio de HNO ₃ , nas frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 µm	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações definidas pela instrução normativa SDA N°27/2006 para elementos tóxicos em fertilizantes orgânicos	19
Tabela 2: Misturas ácidas utilizadas na otimização do procedimento de digestão das amostras de fertilizante orgânico, substrato e condicionadores de solo	73
Tabela 3: Programa de aquecimento executado para digestão das amostras no forno de micro-ondas.....	74
Tabela 4: Parâmetros instrumentais utilizados nas medidas por ICP OES	76
Tabela 5: Programa de aquecimento para o forno de grafite utilizado nas determinações de As, Cd e Se	80
Tabela 6: Isótopos selecionados, suas abundâncias e principais interferentes poliatômicos	85
Tabela 7: Condições instrumentais para análise por ICP-MS	88
Tabela 8: Parâmetros utilizados nas medidas por XANES	91
Tabela 9: Parâmetros instrumentais para a cromatografia de exclusão por tamanho e para a análise de especiação.....	95
Tabela 10: Teor de carbono e nitrogênio e razão C/N nas diferentes amostras	101
Tabela 11: Erro relativo determinado a partir das concentrações recomendadas e encontradas para o material de referência de lodo de esgoto (CRM 029)	107
Tabela 12: Características analíticas do método proposto visando determinações multielementares por ICP OES em fertilizante base orgânica.....	110
Tabela 13: Concentrações dos elementos para cada amostra analisada	111
Tabela 14: Resultados de recuperação para cada uma das amostras analisadas, digeridas com 3 mL HNO ₃ + 2 mL H ₂ O + 1 mL HBF ₄	112
Tabela 15: Concentrações determinadas por GFAAS para cada amostra analisada e limites de detecção para cada elemento	113
Tabela 16: Concentrações de macro, micronutrientes e elementos potencialmente tóxicos em frações com diferentes tamanhos de partículas	117
Tabela 17: Características analíticas do método para ICP-MS para as diferentes calibrações adotadas visando determinações dos elementos nos extratos dos procedimentos do BCR e de extração em etapa única	128

Tabela 18: Razões E_4/E_6 para extratos de fertilizante orgânico em diferentes meios e também para soluções de ácido húmico em diferentes concentrações	131
Tabela 19: Características analíticas do método para a análise de especiação por HPLC-ICP-MS	146

SUMÁRIO

Introdução	16
1. Revisão Bibliográfica	22
1.1. Fertilizante orgânico – aspectos gerais e interação com o solo.....	22
1.2. Métodos de preparo de amostra e determinação elementar	34
1.3. Fracionamento e especiação elementar	40
1.3.1. Fracionamento por tamanho de partículas	42
1.3.2. Fracionamento elementar por extrações – avaliação de mobilidade e disponibilidade.....	46
1.3.3. Análise de especiação.....	53
2. Objetivos.....	60
3. Experimental	62
3.1. Instrumentação	62
3.2. Reagentes e amostras.....	65
3.3. Procedimento.....	67
3.3.1. Pré-tratamento e caracterização das amostras.....	67
3.3.1.1. Liofilização.....	67
3.3.1.2. Moagem	68
3.3.1.3. Peneiramento para fracionamento por tamanho de partículas.....	69
3.3.2. Determinação elementar total	70
3.3.2.1. Otimização do método de preparo de amostra com forno de micro-ondas..	70
3.3.2.2. Determinações elementares por ICP OES	75
3.3.2.3. Análise de Componentes Principais (PCA) para escolha do procedimento de digestão.....	78
3.3.2.4. Determinações elementares por GF AAS	79
3.3.3. Extrações sequenciais e de etapa única para fertilizante orgânico	81
3.3.3.1. Procedimento de extração do BCR e em etapa única.....	81
3.3.3.2. Determinações elementares por ICP-MS	84
3.3.4. Análise de Especiação	89
3.3.4.1. Análise de especiação de Cr e Fe por XANES	89
3.3.4.2. Análise de especiação por SEC-ICP-MS	91
3.3.4.3. Extrações de ácidos húmicos e fúlvicos	96

4.	Resultados e discussões	100
4.1.	Pré-tratamento e caracterização das amostras	100
4.1.1.	Determinação elementar total	103
4.1.1.1.	Avaliação das misturas ácidas propostas.....	103
4.1.1.2.	Determinações dos elementos nas amostras por ICP OES	110
4.1.1.3.	Determinações dos elementos nas amostras por GF AAS	113
4.2.	Determinações elementares nas frações com diferentes tamanhos de partículas.....	114
4.3.	Extrações sequenciais e de etapa única no fertilizante orgânico.....	120
4.3.1.	Extração sequencial usando o método BCR	121
4.3.2.	Extrações em etapa única	125
4.4.	Análise de especiação	132
4.4.1.	Análise de Especiação de Cr e Fe por XANES	132
4.4.2.	Análise de Especiação por SEC-ICP-MS	134
4.4.2.1.	Calibração da coluna de exclusão por tamanho e caracterização dos ácidos húmicos e fúlvicos	134
4.4.2.2.	Determinação elementar por SEC-ICP-MS	140
5.	Conclusões	147
6.	Referências.....	149

Introdução

A população mundial está em franco crescimento, de acordo com dados do banco mundial, com projeção de aumento de 7,4 bilhões de habitantes em 2016 para 9,7 bilhões em 2050. A maior preocupação dos governantes e organizações mundiais está relacionada ao provimento de alimentos para toda essa população.

A porcentagem de terras agriculturáveis não acompanha esta tendência de crescimento populacional, o que pode levar a futuros problemas de abastecimento. Assim, se faz necessário o uso de novas tecnologias agrícolas, como melhorias do plantio, manejo e o uso de biotecnologia para produção de sementes geneticamente modificadas. Todos esses investimentos para o aumento da produtividade não se comparam com aquele relacionado a produção e desenvolvimento de fertilizantes. Com a soma desses esforços tem se observado, no Brasil, um aumento da produção agrícola sem necessariamente haver aumento da área plantada (Figura 1) (WORLDBANK, 2017).

Figura 1: Produtividade estimada a partir do ano base 2004-2006 e terras agriculturáveis no Brasil (—) e no Mundo (- -).

Os fertilizantes são definidos pela legislação brasileira como “substância mineral ou orgânica, natural ou sintética, fornecedora de um ou mais nutrientes de plantas”, e podem ser classificados como minerais ou orgânicos (MAPA, 2004). Os nutrientes utilizados pelas plantas em grande quantidade (N, P, K, S, Mg e Ca) são conhecidos como macronutrientes e aqueles utilizados em menor quantidade (Fe, Mn, Zn, Co, Mo, Cu, Ni, Se) são os micronutrientes. Ainda segundo o decreto N° 4954 de 2004, os fertilizantes podem ser considerados minerais quando são “produtos de natureza fundamentalmente mineral, natural ou sintético, obtidos por processo físico, químico ou físico-químico, fornecedores de um ou mais nutrientes de plantas” ou orgânicos, quando são “produtos de natureza fundamentalmente orgânica, obtidos por processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matérias-primas de origem industrial, urbana ou rural, vegetal ou animal, enriquecidos ou não de nutrientes minerais” (MAPA, 2004, alterado pelo decreto 8059 de 26 de julho de 2013).

Os fertilizantes orgânicos podem ser de origem vegetal (restos de plantas, vinhaça, turfa, entre outros), animal (sangue dessecado, farinha de carne, cascos e chifres, restos de peixes) ou mista (esterços, lodo de esgoto, lixo), e podem ser enriquecidos com outros minerais de acordo com as necessidades nutricionais de cada cultura ou solo (LAPIDO-LOUREIRO et al., 2008).

Para que as matérias primas citadas possam ser utilizadas como fertilizantes, passam por um processo de compostagem, no qual há transformação de material orgânico original em material húmico, bem como há a produção de material mineralizado como CO₂, H₂O, íons minerais e cinzas (ZUCCONI e DE BERTOLDI, 1986; BERNAL et al., 2009). Além disso, espera-se que este processo

leve a um produto com reduzida fitotoxicidade e patogenicidade (INGHAM, 1999; YAZDANPANA et al., 2016).

A fertilização orgânica apresenta diversas vantagens, como a manutenção dos níveis de carbono orgânico no solo, uso efetivo de restos de plantas e animais, bem como de dejetos orgânicos de modo geral, além da diminuição de efeitos de erosão, eutrofização de águas superficiais e diminuição da energia necessária para a síntese de compostos nitrogenados necessários para o crescimento das plantas (SAGER, 2007; NEMAT et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2014).

Em artigo publicado pela FAO em 16 de fevereiro de 2015, há a previsão que o uso mundial de fertilizantes seja maior que 200,5 milhões de toneladas em 2018, ou seja, 25% maior que a quantidade utilizada em 2008. A previsão é baseada no uso intensivo do solo, que acaba por esgotar as reservas naturais principalmente de N, P e K. Há um alerta para a poluição causada pelo uso contínuo de fertilizantes, bem como a falta de fertilização pode levar à rápida degradação de um solo agricultável (FAO, 2015).

O uso sucessivo de fertilizantes orgânicos de diversas origens pode causar acumulação de elementos potencialmente tóxicos no solo, os quais podem ser transferidos para as plantas. A presença destes elementos em fertilizantes orgânicos tem sua principal origem na adição de minerais para aumentar a quantidade de micronutrientes ou mesmo na própria origem do fertilizante, como no caso de efluentes industriais e urbanos. A legislação brasileira define, pela instrução normativa SDA N° 27/2006, alterada pela instrução normativa SDA N°7/2016, os limites máximos para elementos potencialmente tóxicos em fertilizantes, como representado na Tabela 1 para fertilizantes orgânicos (MAPA, 2006). Apesar de

definir os valores, não há métodos de preparo de amostras para análises recomendados na legislação.

A ação dos micro-organismos durante o processo de compostagem pode alterar a forma química que alguns destes elementos se encontram na matéria-prima, tanto pela complexação mais ou menos reversível com ácidos húmicos, quanto pela transformação em diferentes espécies, afetando sua mobilidade, bioacessibilidade e fitotoxicidade (NAGAJYOTI et al., 2010; LOUBNA et al., 2015).

Tabela 1: Concentrações definidas pela instrução normativa SDA N° 27/2006, alterada pela instrução normativa SDA N° 7/2016 para elementos tóxicos em fertilizantes orgânicos.

Contaminante	Valor máximo admitido (mg kg⁻¹)
Arsênio	20,00
Cádmio	3,00
Chumbo	150,00
Cromo hexavalente	2,00
Mercúrio	1,00
Níquel	70,00
Selênio	80,00

Assim, a determinação elementar total em fertilizantes é necessária, porém um estudo mais aprofundado de disponibilidade e toxicidade se faz necessário, de modo a compreender a ação das espécies de cada elemento em fertilizantes e solos. A importância da determinação de espécies químicas pode ser observada na própria instrução normativa SDA N° 27/2006, que foi alterada pela instrução normativa SDA N° 7/2016 para incluir a determinação de Cr (VI) em fertilizantes, e não mais o teor total desse elemento.

Sendo assim, nesta pesquisa foram desenvolvidos métodos para determinação elementar total em fertilizantes orgânicos, condicionadores de solo e substratos, fracionamento para investigação de mobilidade e bioacessibilidade e análise de especiação de Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn em fertilizantes orgânicos.

Estes elementos foram escolhidos por serem micronutrientes e contaminantes de grande importância, e por estarem presentes em concentrações significativas na amostra. Cobre, ferro, manganês e zinco participam da estrutura de proteínas e enzimas, de reações redox e podem interferir na estrutura de ácidos nucleicos e resistência a ataques fúngicos, como no caso do Mn (BRADL, 2005; NAGAJYOTI et al., 2010). Por serem micronutrientes, quando em excesso podem trazer efeitos negativos, como o Cr, que pode induzir estresse oxidativo às plantas (STADTMAN e OLIVER, 1991), ou quando associado ao Cd afeta negativamente a germinação de sementes e crescimento de ramos (NEELIMA e REDDY, 2002), e, ainda pode levar à necrose das folhas e à deficiência de Fe. Pode também ser tóxico principalmente em áreas de cultivo alagado, com a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} . Esta espécie bivalente induz a formação de radicais livres que afetam a estrutura celular, DNA e proteínas (NAGAJYOTI et al., 2010).

Já os contaminantes, como o Cr e Pb, podem afetar a germinação de plantas e inibir o alongamento de raízes e galhos e também da expansão de folhas (NAGAJYOTI et al., 2010). O Pb apresenta alta adsorção em óxidos de Mn, ou pode estar presente quimicamente associado a este elemento como o mineral coronadita, além de ser facilmente imobilizado pela matéria orgânica do solo, sendo usualmente pouco disponível para plantas (BRADL, 2005). O Cr é normalmente encontrado nos estados de oxidação +3 e +6, sendo a espécie mais oxidada nociva, produzindo

efeitos de estresse oxidativo tanto em plantas quanto em animais (CUELLO et al., 2016).

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Fertilizante orgânico – aspectos gerais e interação com o solo

Fertilizantes orgânicos podem ser preparados a partir de matérias primas de diversas origens, como restos de plantas, de animais, esterco e lodo de esgoto. Para que estes materiais possam ser utilizados no solo, são submetidos ao processo de compostagem (CAMPITELLI e CEPPI, 2008). A compostagem pode ser definida como uma bio-oxidação aeróbia exotérmica de um substrato orgânico heterogêneo, no estado sólido, caracterizado pela produção de CO₂, água, liberação de substâncias minerais e formação de matéria orgânica estável (BERNAL et al., 2009).

O uso de fertilizantes orgânicos preparados por compostagem, além de suprir nutrientes ao solo, tem também um papel diferenciado para o agricultor, uma vez que sua produção e uso fazem parte do ciclo de agricultura sustentável e sua complexidade atribui diferentes características ao solo do que o fertilizante mineral (GREENWAY e SONG, 2002; HARGREAVES et al., 2008). Além disso, o composto também apresenta uma biota contendo agentes que competem com patógenos, inibidores enzimáticos e outros micro-organismos necessários para uma boa manutenção do solo (INGHAM, 1999; YAZDANPANA et al., 2016).

O uso de material orgânico fresco (ou um composto pouco maduro) pode levar à sua decomposição no solo, aumentando a concentração local de CO₂ e, conseqüentemente, uma redução no O₂ disponível para a rizosfera. Neste cenário, nitrogênio inorgânico é absorvido pelos micro-organismos, diminuindo competitivamente sua absorção pelas plantas e ainda gerando produtos de degradação fitotóxicos, como fenóis e álcoois (PROVENZANO et al., 2001).

A compostagem normalmente é realizada em pilhas de dimensões de até 2 m de altura e 50 m de extensão, reviradas em frequência decrescente para manutenção dos níveis de O₂ e umidade, porém podem produzir chorume com substâncias potencialmente tóxicas. Há também os sistemas de compostagem com ventilação forçada, com maior controle da atividade bacteriana e, assim, também maior controle dos produtos e velocidade de degradação (FARRELL e JONES, 2009). O processo de compostagem ocorre com o aumento da atividade microbiana, acompanhado por aumento de temperatura na parte interna da pilha do material, enquanto submetido à compostagem. Quando esta temperatura atinge valores maiores que 40 °C, muitas vezes chegando a mais que 60 °C, o composto está na fase termófila, quando há maior atividade bacteriana. Com o passar do tempo de compostagem, ocorre diminuição da atividade bacteriana, acompanhada pela estabilização do material, conforme aumenta o teor de humificação até que o composto esteja completamente estável. O processo de compostagem como um todo pode durar de 20 a 120 dias, dependendo das matérias primas utilizadas.

Durante o processo de compostagem, ocorrem alterações de diversas características físico-químicas dos substratos, que podem ser usadas como parâmetros para avaliação da maturidade dos compostos. Algumas destas características também permitem a avaliação do teor de humificação, que está relacionado à razão de matéria orgânica que foi efetivamente transformada em ácidos húmicos e fúlvicos. Dentre estes parâmetros, destacam-se:

- Temperatura: durante a fase termófila (de maior atividade bacteriana) há o aumento da temperatura da pilha de compostagem, após um tempo a temperatura se mantém constante. Porém, a temperatura sozinha não pode

ser considerada um fator importante para avaliação da estabilidade do composto, uma vez que também depende das matérias primas utilizadas, além de existir a possibilidade de ocorrer queda na temperatura caso a pilha de compostagem esteja excessivamente seca ou úmida (GREENWAY e SONG, 2002; KO et al., 2008; FIALHO et al., 2010; INGELMO et al., 2012; LU et al., 2014).

- pH: com a formação de ácidos orgânicos e transformação de amônia a nitrato, o pH durante a compostagem tende a ter uma queda inicial e depois ligeiro aumento. Novamente, o pH inicial depende das matérias-primas utilizadas, porém o pH final tende a pouco abaixo de 7, pela formação de ácidos fracos que apresentam efeito tamponante (GREENWAY e SONG, 2002; SATISHA e DEVARAJAN, 2007; KO et al., 2008; DIAS et al., 2009; LU et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014).
- Capacidade de troca catiônica (CEC) e condutividade elétrica (EC): a condutividade elétrica é uma medida relacionada à quantidade de sais dissolvidos nos compostos, e a CEC está relacionada à capacidade de troca de cátions por sítios ativos presentes no composto. Durante o processo de compostagem, é esperado que haja queda inicial na EC com simultâneo aumento da CEC, como resultado da formação de novos grupos carboxila e fenol que complexam os íons livres (BARTL et al., 2002; KO et al., 2008; FIALHO et al., 2010; INGELMO et al., 2012; KUPPER et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014).
- Atividade microbiológica: normalmente avaliada como evolução de CO₂, produto da respiração microbiana durante o processo de compostagem. Na fase termófila, a evolução de CO₂ atinge o seu máximo,

correlacionada com a maior maturidade do composto (GREENWAY e SONG, 2002; SMITH, 2009; YAZDANPANA et al., 2016).

- %C, %N e razão C/N: durante o processo de compostagem, parte do C presente na matéria orgânica é transformado em compostos aromáticos pelo processo de humificação e parte é perdido na forma de CO₂, levando a queda nos teores de C quanto mais maduro é o composto, chegando a um patamar no final do processo. Já o teor de N é mantido praticamente constante durante todo o tempo, uma vez que há a transformação da forma de amônia (encontrada comumente em subprodutos de excreção animal) em nitrato. Assim, há a redução da razão C/N durante o processo de compostagem, sendo atualmente o parâmetro mais utilizado para avaliação do teor de humificação e maturidade de compostos (GREENWAY e SONG, 2002; KO et al., 2008; FIALHO et al., 2010; GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2011; INGELMO et al., 2012; NICOLÁS et al., 2012; LU et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014; SCIUBBA et al., 2015).

A transformação do C presente nos materiais é um processo muito importante, pois é durante a compostagem que substâncias como ligninas, carboidratos, ácidos orgânicos e proteínas sofrem reações de de-metilação e oxidação por ação microbiológica, levando à formação de quinonas, e, na presença de compostos de amina, formação de amino quinonas, sendo polimerizadas e posteriormente formando as substâncias húmicas (Figura 2) (STEVENSON, 1982; URQUIAGA e LEIGHTON, 2000; SPARKS, 2003; PINHEIRO et al., 2013; PEMBA et al., 2014).

Figura 2: Fluxograma da formação de ácidos húmicos e fúlvicos a partir de lignina e de substratos não-lignínicos.

Os ácidos húmicos e fúlvicos fazem parte da matéria orgânica do solo (SOM), juntamente com outros compostos orgânicos derivados da decomposição de restos de plantas e animais (SPARKS, 2003). A SOM pode ser dividida em duas grandes frações: (i) a ativa (restos de plantas em decomposição e seus compostos relacionados, biomassa e substâncias não-húmicas não associadas à fração mineral); e (ii) a estável (húmus), como um estoque de nutrientes e que garante estabilidade em longo prazo para o solo (STEVENSON, 1994).

O húmus inclui as substâncias húmicas (*humic substances*, HS) e produtos de ressíntese por micro-organismos presentes no solo. Seu teor pode variar entre 0,5 e 5% em solos minerais até 100% em solos orgânicos, e mesmo nos solos em que o teor é baixo sua presença é importante pela reatividade destes materiais

(SPARKS, 2003). Sua área superficial é alta ($800\text{-}900\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$), e também apresenta alta capacidade de troca catiônica (CEC), de $150\text{ a }300\text{ cmol kg}^{-1}$ (SOUZA JUNIOR et al., 2007); por estas propriedades a SOM é um importante adsorvente de macro e micronutrientes, cátions de metais e mesmo de pesticidas (SPARKS, 2003).

As substâncias húmicas são definidas como uma categoria geral de compostos biogênicos, heterogêneos de coloração amarela à preta, de alto peso molecular e refratárias (AIKEN et al., 1985). Podem ser subdivididas em ácidos húmicos (HA), fúlvicos (FA) e humina. São substâncias hidrofílicas e consistem em partículas globulares, que em solução aquosa contém água de hidratação. Os grupos funcionais mais frequentemente presentes nas HS são carboxílico e fenólico, além de aminoácidos dentro da estrutura, ácidos nucleicos, clorofila e derivados de sua degradação, fosfolipídeos, aminas e vitaminas (PICCOLO, 2002; SPARKS, 2003).

As substâncias húmicas diferem entre si pelo peso molecular, sendo os ácidos fúlvicos menos polimerizados, variando de $500\text{ a }2000\text{ Da}$ e os ácidos húmicos mais polimerizados, com pesos moleculares entre $1000\text{ a }100000\text{ Da}$, variáveis de acordo com as substâncias que deram origem às HS. Outra característica que difere as substâncias húmicas é a sua solubilidade, sendo os ácidos húmicos solúveis em meio básico, pela quebra de ligações entre as substâncias orgânicas e componentes inorgânicos e formação dos sais solúveis de cátions monovalentes, e insolúveis em meio ácido pela maior tendência de formação de agregados (STEVENSON, 1994; PICCOLO, 2002). Já os ácidos fúlvicos são solúveis tanto em meio ácido quanto básico, sendo sua hidrofiliidade atribuída ao seu tamanho menor, concentrando maior polaridade (PICCOLO, 2002). A humina

representa a fração de substâncias húmicas que são insolúveis tanto em meio ácido quanto em meio básico (SPARKS, 2003).

A extração de ácidos húmicos e fúlvicos em diferentes amostras (fertilizantes, solos, turfa) é normalmente realizada por procedimento recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS – International Humic Substances Society), que se baseia na diferença de solubilidade. Neste procedimento, as amostras são submetidas à extração com soluções de 0,1 a 0,5 M de NaOH ou Na₂CO₃ durante algumas horas, que acabam por solubilizar tanto os HAs quanto os FAs. Após a extração, sobrenadante e precipitado são separados por centrifugação, e o sobrenadante contendo ambas as substâncias é acidificado, de modo a precipitar os HAs. A suspensão resultante fica em repouso por algumas horas, e depois é novamente centrifugada, sendo que o sobrenadante resultante contém FAs, e o precipitado contém os HAs. O sobrenadante é separado, e o precipitado é ressuspenso em meio básico, de modo a obter tanto os HAs quanto FAs em solução aquosa. Após a extração, as soluções podem ser congeladas e liofilizadas (STEVENSON, 1994; TORRECILLAS et al., 2013).

Apesar de ser um método já bem estabelecido, algumas ressalvas devem ser feitas quanto ao uso de bases concentradas como extratores, visto que podem promover algumas fontes de erros, como: (i) dissolução de sílica presente na amostra, contaminando a fração orgânica; (ii) dissolução de material biológico de tecidos orgânicos não decompostos; e (iii) oxidação de alguns constituintes orgânicos e condensação de aminoácidos e quinonas com carbonila, além de favorecer a ligação entre ácidos húmicos e fúlvicos por esterificação. Ainda, quanto maior o tempo de extração e mais alcalino o meio, maior é o consumo de O₂ durante o processo, indicando a ocorrência de reações químicas (SHIRSHOVA et al., 2006).

Extratores como sais e tampão pirofosfato ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) também podem ser utilizados, atuando de maneira mais seletiva, porém com menor rendimento; metais podem ser previamente removidos para evitar a coagulação da matéria orgânica utilizando oxalato ou o $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, sendo o EDTA pouco usado por impossibilitar a medida de C e N, essenciais para estimar a quantidade de matéria orgânica extraída (STEVENSON, 1994).

Recentemente, outro método de extração foi proposto por Raposo et al. (2016) utilizando ultrassom focalizado, testado em sedimentos estuarinos. A extração foi realizada de acordo com o procedimento da IHSS modificado, utilizando solução de NaOH 1 M, desoxigenado sob atmosfera de N_2 e ultrassom focalizado por 30 minutos, reduzindo drasticamente o tempo necessário para a extração. Os autores descrevem o método como eficiente, com 97% de recuperação para os HAs e 89% para os FAs se comparados com o procedimento da IHSS. Porém, o uso de radiação US pode promover a clivagem dos HAs e também afetar a complexação e especiação de metais, não sendo recomendado para preparo de amostra prévio a estudos de fracionamento e análise de especiação (RAPOSO et al., 2016).

A extração de substâncias húmicas, além de trazer informações sobre sua presença em diversas matrizes, também pode ser utilizada para o estudo de sua interação com diversos elementos. No trabalho publicado por Kulikowska et al. (2015) as HS obtidas a partir de lodo de esgoto compostado foram avaliadas como agentes de extração para Cu e Cd em solos contaminados. A variação de pH foi estudada para as interações, e foi observado que em meio ácido houve a adsorção das HS nos solos (comprovada pelos autores como medida do teor de C nos sobrenadantes), o que levou a uma menor eficiência de extração. No pH ótimo, as eficiências de extração chegaram até a aproximadamente 80% Cu e 69% de Cd

para o primeiro solo (com baixo teor de matéria orgânica) e 53% e 36% para Cu e Cd no segundo tipo de solo (com maior teor de matéria orgânica). Quando acompanhada de outros agentes utilizados tradicionalmente para remediação (como saponina, ácido tânico e biosurfactantes), a remoção chega a 100% para o primeiro tipo de solo e a 89% para o segundo tipo de solo (KULIKOWSKA et al., 2015).

Apesar de os ácidos húmicos e fúlvicos não apresentarem um peso molecular definido, e sim, um intervalo de pesos moleculares, diversas técnicas analíticas podem ser utilizadas para separar as substâncias húmicas, como ultrafiltração (UF), *Field-Flow Fractionating* (FFF) e cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) (STEVENSON, 1994; SPARKS, 2003; BOLEA et al., 2006; LABORDA et al., 2011; JOKUBAUSKAITE et al., 2015).

As técnicas espectroscópicas mais comuns que podem ser utilizadas para a identificação de ácidos húmicos e fúlvicos são a espectrometria de absorção molecular no ultravioleta e visível (UV-Vis) e também a espectrometria de absorção da região de infravermelho (IR). O espectro de absorção UV-Vis de ácidos húmicos e fúlvicos varia com a origem da substância, e serve como um indicativo de diferentes graus de humificação. A absorvidade molar de ácidos húmicos tende a aumentar com o tamanho da molécula, porcentagem de C, grau de condensação e razão de carbonos em estruturas aromáticas por estruturas alifáticas (BLOOM e LEENHEER, 1989). A razão entre as absorbâncias obtidas a 465 nm e 665 nm (razão E_4/E_6) também é utilizada como indicativo do grau de humificação, pois apresenta tendência de redução com o aumento do peso molecular e do grau de condensação (STEVENSON, 1994). Valores abaixo de 5 são típicos para ácidos húmicos e entre 6 e 8,5 para ácidos fúlvicos, porém podem variar de acordo com as diferentes matérias primas utilizadas para a compostagem (FIALHO et al., 2010).

A espectroscopia de infravermelho também é utilizada para caracterização de substâncias húmicas, visto que estes compostos apresentam diversos grupos funcionais e estruturas com componentes alifáticos e aromáticos. É de grande importância para obter informações como natureza, reatividade e estrutura dos grupos contendo oxigênio e identificação de constituintes de proteínas e carboidratos. Porém, podem haver interferências pela absorção de umidade ($3300\text{--}300\text{ cm}^{-1}$ e $1720\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$), principalmente ao preparar pastilhas de haletos alcalinos. A amostra pode ser seca antes da formação da pastilha, ou ainda utilizar outro material não higroscópico, como o brometo de tálio. Ácidos húmicos e fúlvicos apresentam espectros semelhantes, sendo difícil distinguir estas substâncias apenas por esta técnica (STEVENSON, 1994). Assim, esta técnica é normalmente utilizada para complementar comparações entre compostagens de diferentes origens ou em diferentes estágios de amadurecimento, e normalmente mostram aumento da intensidade de bandas relacionadas a estruturas carboxílicas em comparação à redução de bandas relacionadas a estruturas alifáticas (SHIRSHOVA et al., 2006; DIAS et al., 2009; FIALHO et al., 2010).

As HS interagem com íons metálicos de acordo com suas propriedades de maleabilidade. Metais “maleáveis” ou moles (alta polarizabilidade e baixa carga) têm tendência de formar ligações covalentes, enquanto que elementos considerados duros (principalmente metais alcalinos e alcalino-terrosos, com alta carga e menor raio atômico) têm a tendência de formar ligações com maior caráter iônico. Dentro das possibilidades de ligações dentro de um ácido húmico, há a presença tanto de sítios duros (carboxílicos e fenólicos) e moles (S e N). Com a complexação dos metais nas HS, pode haver maior facilidade de transporte, pois a solubilidade é

aumentada e a disponibilidade pode ser diminuída, se houver a formação de um complexo estável (SPARKS, 2003).

O pH é o parâmetro de maior influência para os processos de adsorção de íons em solos. Em baixos pHs, os sítios negativos presentes na matriz estão protonados, impedindo que haja ligação com os íons metálicos, enquanto que com o aumento do pH há a desprotonação e formação de carboxilatos, estimulando a adsorção de metais no solo. Porém, em pHs muito elevados pode haver a precipitação de hidróxidos metálicos, reduzindo a capacidade de complexação dos íons (BRADL, 2004). Quanto menor o pH, maior é a probabilidade de os íons estarem na forma livre e, conseqüentemente, mais disponíveis para serem absorvidos por plantas (ZENG et al., 2011). Na presença de ácidos húmicos e fúlvicos há um efeito de tamponamento do solo, induzido pelos grupos carboxílicos e fenólicos, aumentando a sua capacidade de troca catiônica (CEC) (JANOŠ et al., 2008).

O uso da fertilização orgânica e mineral combinadas na produção de tomates foi avaliada por Hernandez et al. (2014). Os maiores rendimentos na produção (calculados em termos da quantidade de frutos maduros por planta) foram observados para os solos tratados com fertilização mista, e o pior rendimento para a fertilização apenas orgânica. Os piores resultados para a fertilização estritamente orgânica são explicados pelos autores pela provável menor entrada de nitrogênio no solo, já que este se apresenta em compostos de alto peso molecular, sendo de liberação muito mais lenta. Porém, deve ser ressaltado que este resultado depende também do tipo de solo em que foi feito o plantio, que no caso foi franco-arenoso (com porcentagens entre 45 - 85% de areia, 10 - 20% de argila e 0 - 50% de silte) (LE MOS e SANTOS, 1996). Independentemente do tipo de fertilização, não houve

alteração dos parâmetros de qualidade dos frutos e dos teores de elementos tóxicos, macro e micronutrientes, indicando qualidade semelhante. Assim, os autores concluíram que os produtos de compostagem influenciaram o transporte e disponibilidade dos nutrientes fornecidos pelo fertilizante mineral para a produção do tomate (HERNÁNDEZ et al., 2014).

Assim, o uso de compostagem, além de suprir nutrientes ao solo, tem também um papel diferenciado para o agricultor, uma vez que sua produção e uso fazem parte do ciclo de agricultura sustentável e sua complexidade atribui diferentes características ao solo se comparado ao fertilizante mineral. Propriedades como aumento da atividade microbiana, regulação da porosidade e manutenção de níveis de água no solo são críticos para o cultivo, e reguláveis com o uso de fertilizantes orgânicos. Em solos arenosos, a matéria orgânica adicionada age como uma esponja, auxiliando na retenção de água e evitando a morte por seca das plantas. Em solos argilosos, a matéria orgânica aumenta sua porosidade, auxiliando na drenagem do excesso de água e evitando o “afogamento” das plantas (WHITE e GREENWOOD, 2013; HERNÁNDEZ et al., 2014; YAZDANPANA et al., 2016).

1.2. Métodos de preparo de amostra e determinação elementar

O controle de qualidade de contaminantes em fertilizantes teve início no final da década de 90, com a criação de uma legislação no estado de Washington – EUA. Produtores locais haviam declarado que recentes problemas agrônômicos e ambientais estavam sendo relacionados à aplicação de fertilizantes preparados a partir de resíduos industriais (RODELLA, 2005). Assim, juntamente com a US EPA (*United States Environmental Protection Agency*, Agência de Proteção Ambiental

dos Estados Unidos da América), foi aprovada a legislação para fertilizantes e baseado na já existente legislação canadense. A lei do estado de Washington foi criada para ser regulada a dose de aplicação dos fertilizantes aos solos, e não apenas o teor total de contaminantes (As, Cd, Co, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Zn) nos mesmos (RODELLA, 2005). A legislação brasileira segue um padrão semelhante, de modo que os valores permitidos de contaminantes para fertilizantes minerais estão relacionados aos teores de N, P, K e macronutrientes secundários e micronutrientes, e para fertilizantes orgânicos definidos valores fixos, como mostrado na Tabela 1 (*Introdução*).

Para a determinação elementar em fertilizantes orgânicos, são recorrentes na literatura as técnicas de preparo de amostra e análise química descritos na Figura 3.

Figura 3: Procedimentos de preparo de amostras e técnicas analíticas utilizados para a determinação elementar em fertilizantes orgânicos

Muitos dos instrumentos para análise química requerem introdução da amostra em estado líquido, como as técnicas de espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES), absorção atômica com atomização por chama (FAAS) e por forno de grafite (GF AAS) ou ainda espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Técnicas de preparo muitas vezes devem ser empregadas para que a amostra seja transformada em uma

solução homogênea, e em muitas delas o uso de ácidos minerais sob aquecimento é a opção mais frequentemente aplicada.

A decomposição por via úmida em sistemas abertos é amplamente utilizada no preparo de amostras de fertilizantes orgânicos, porém há maior susceptibilidade a contaminações da amostra e a perdas de analito por volatilização (BARIN et al., 2016). Além disso, o aquecimento condutivo é mais lento, geralmente com temperaturas pouco reprodutíveis e faz com que o aumento de temperatura seja localizado nas superfícies que estão em contato com a fonte de calor (RICHTER et al., 2001).

Não há consenso sobre os métodos de digestão de amostras de fertilizantes orgânicos ou matrizes similares, como lodos e produtos de compostagem, principalmente para a determinação simultânea de muitos elementos.

Ácido nítrico é frequentemente encontrado nos métodos propostos na literatura para digestão assistida por micro-ondas, por ser um agente oxidante poderoso e por resultar em íons nitrato em solução, predominantemente solúveis. Agentes complexantes são muitas vezes utilizados associados ao HNO_3 , como no caso do HCl , usado como fonte de íons cloreto, agente complexante forte para muitos íons metálicos ou ainda para a formação do cloreto de nitrosila (NOCl), agente intensamente oxidante (KRUG et al., 2016). O HF também é bastante utilizado principalmente para a complexação de elementos que formam óxidos refratários, como Si , Zr , Ti e Sn , porém quando associado a Al , Fe , alguns elementos alcalinos-terrosos e terras raras, pode gerar como produto fluoretos insolúveis, que podem ser solubilizados com a adição de H_3BO_3 . (MARGUI et al., 2005; KRUG et al., 2016).

Para evitar os efeitos indesejados que surgem pelo excesso de fluoretos, o ácido bórico é utilizado para favorecer sua dissolução, ou, alternativamente, o ácido tetrafluorobórico (HBF_4) também pode ser utilizado. Este ácido pode ser hidrolisado em oxofluoroborato e ácido fluorídrico, e os hidroxifluoroboratos resultantes apresentam menos efeitos danosos que um excesso de HF ou de ácido bórico produziriam (SUCHAROVA e SUCHARA, 2006).

Um dos problemas associados ao uso de HF é justamente a sua reatividade frente ao óxido de silício, impossibilitando o uso deste ácido em vidraria de laboratório ou em tochas e sistemas de introdução de amostra de vidro e quartzo, comuns principalmente nas técnicas de ICP OES e ICP-MS. Assim, devem ser usados materiais resistentes, como o PTFE, em todo o preparo de amostra e análise. Outra alternativa é a reação de HF com H_3BO_3 , porém há também a reação com componentes de quartzo, que ficam fragilizados e contaminados com B, impossibilitando a determinação deste elemento com o sistema contaminado.

Nemati et al. (2010) comparam a eficiência de digestão em sistema aberto com digestão por aquecimento assistido por micro-ondas de amostra lodo da produção de camarões compostado com resíduos de plantas e esterco. Foram testadas 4 misturas ácidas em diferentes proporções de $\text{HNO}_3/\text{HCl}/\text{HF}$ para digestão de um material certificado de lodo de esgoto, sendo determinados Zn, Cu, Cr, Ni, Pb e Cd por FAAS. Na digestão assistida por micro-ondas, foi utilizado programa de aquecimento com cerca de 25 minutos de duração, enquanto que na digestão em sistema aberto o aquecimento foi realizado por 16 horas em banho de areia. O procedimento que consistia de 6 mL HNO_3 + 2 mL HCl + 2 mL HF demonstrou as melhores recuperações tanto para a digestão assistida por micro-ondas quanto para sistema aberto, porém os valores encontrados foram melhores para o primeiro

sistema, e com a vantagem de ser muito mais rápido. Todas as misturas foram aplicadas à amostra, tanto em sistema aberto quanto fechado, sendo encontradas concentrações de Cd, Pb e Zn acima do permitido pela Comunidade Europeia (NEMATÍ et al., 2010).

Abbruzzini et al. (2014) compararam a eficiência de 5 métodos de preparo de amostra para a determinação de Fe, Zn, Ni, Cr, Cd e Pb em turfa, compostos comerciais, esterco e lodos de diversas origens por FAAS. Os métodos avaliados foram misturas de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ e água-régia em bloco digestor, combustão em forno tipo mufla com dissolução dos resíduos em HNO_3 e os procedimentos da EPA 3050 e 3051. O procedimento 3050 da EPA é recomendado para a digestão de lodos, sedimentos e solos, utilizando sequencialmente HNO_3 diluído a 50% (v v^{-1}), H_2O_2 30% e HCl concentrado em bloco digestor, com um tempo total de digestão de pouco mais de 4 horas (USEPA, 1996a). Já o procedimento 3051 é recomendado para a digestão de sedimentos, lodos, solos e óleos, e utiliza HNO_3 concentrado em digestão com aquecimento assistido por micro-ondas (USEPA, 2007). Este último, juntamente com o procedimento EPA 3052 (digestão assistida por micro-ondas utilizando HNO_3 e HF), são bastante utilizados na digestão de fertilizantes orgânicos e inorgânicos, sendo o primeiro utilizado como avaliação da lixiviação de elementos (ou cálculo de concentrações *pseudo-totais*) e o segundo para a digestão total (USEPA, 1996b; KELMER, 2016). Cada um destes procedimentos apresenta suas vantagens e desvantagens, como o maior tempo necessário para os métodos em que foram utilizados os ácidos nítrico e perclórico e a água-régia, pois os reagentes foram deixados em contato com as amostras durante a noite, para evitar reação violenta quando fosse realizado o aquecimento. Já na combustão em forno tipo mufla, por ser um sistema aberto e que atinge altas temperaturas houve perda de

analitos como Pb e Cd. O uso de ácido perclórico também deve ser considerado com cautela, visto que este reagente é um agente oxidante muito poderoso e que, quando concentrado e aquecido, apresenta o risco de explosão (KRUG et al., 2016). Os autores concluíram que cada um dos métodos apresentou melhores erros relativos para diferentes analitos, sendo que se fosse necessária a determinação simultânea de vários elementos um procedimento ótimo para a maioria deveria ser desenvolvido (ABBRUZZINI et al., 2014).

Para escolha de procedimentos de digestão que abranjam um maior número de elementos para sua determinação simultânea, o uso de ferramentas estatísticas tem se tornado um forte aliado. A otimização de procedimentos de digestão assistida por micro-ondas é um tema já conhecido na literatura, porém pouco abordado para fertilizantes orgânicos, compostos e substâncias similares, uma vez que a proporção de material orgânico e inorgânico presentes pode variar drasticamente.

Okorie et al. (2010) propuseram a otimização de um procedimento de digestão assistido por micro-ondas utilizando água-régia e *Central Composite Design* para determinação elementar em solos contaminados. Neste tipo de design experimental, além de estabelecer condições ótimas são observadas as relações entre as variáveis, que no caso deste trabalho foram: volume da água régia, tempo de digestão, potência aplicada durante a digestão e temperatura. Foram obtidos 28 experimentos teóricos, e escolhidos as condições mínimas e máximas foram realizados 5 experimentos. Foram determinados Pb e Zn por FAAS e As, Cd, Cr, Cu, Mo e Ni por ICP-MS. Os resultados para cada elemento foram observados em relação à cada uma das variáveis, e indicaram que temperatura de digestão, volume de água-régia e tempo foram os parâmetros mais importantes para melhor eficiência de digestão, avaliada pelos erros relativos obtidos na digestão de materiais de

referência certificados de solos. Utilizando estas três variáveis em gráficos de superfície de resposta, foi possível otimizar o procedimento com base no que foi necessário para a digestão dos elementos. As condições experimentais escolhidas foram 160 °C de temperatura, 750 W de potência, 25 minutos de tempo de extração utilizando 13 mL de água-régia, aplicadas à digestão de dois materiais de referência de solos, com excelentes recuperações (OKORIE et al., 2010).

A extração assistida por ultrassom tem sido utilizada como uma alternativa às digestões ácidas pelo uso de menores volumes de ácidos, pela massa de amostra não ser limitada pelas pressões geradas (principalmente para amostras com altos teores de matéria orgânica) e pelo baixo risco de contaminação (DE LA CALLE et al., 2013). A energia ultrassônica facilita a dissolução da amostra mesmo em meio de ácidos diluídos e sob condições brandas, como temperatura e pressão ambientes (TEIXEIRA et al., 2014).

Extração ultrassônica por *cup-horn sonoreactor* e detecção por FAAS sequencial rápido foram utilizados para a determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em fertilizantes orgânicos. Foi utilizado design fatorial para escolher a mistura ácida utilizada para a extração ultrassônica, e comparados os resultados com os obtidos por digestão assistida por micro-ondas, para a qual foi utilizada mistura de HNO₃/HCl/H₂O₂. As misturas ácidas avaliadas continham diferentes proporções de HNO₃, HCl e HF. Com a ajuda de gráficos de Pareto, foi demonstrada a importância da presença do HF e também do HCl para a extração dos elementos propostos. O procedimento escolhido para a extração foi utilizando 120 mg de amostra e 500 µL de mistura ácida contendo HNO₃/HCl/HF na proporção 5:3:3 (TEIXEIRA et al., 2014).

Além das técnicas analíticas mais tradicionais de absorção e emissão atômica utilizadas na determinação elementar em fertilizantes orgânicos, são encontrados trabalhos na literatura explorando outras possibilidades, como a amostragem de suspensões e determinação elementar por TXRF (RESENDE e NASCENTES, 2016), análise por LIBS (SENESE et al., 2014), LA-ICP-MS (JIMÉNEZ et al., 2007), porém são pouco frequentes devido à complexidade e variedade da matriz de fertilizante orgânico, que depende não só das matérias primas utilizadas mas também do tempo e das condições de compostagem, além das dificuldades relacionadas à calibração, inerentes às técnicas de análise direta de sólidos.

1.3. Fracionamento e especiação elementar

A ação dos micro-organismos durante o processo de compostagem pode alterar a forma química que alguns destes elementos que se encontram na matéria-prima, tanto pela complexação mais ou menos reversível com ácidos húmicos, quanto pela transformação em diferentes espécies, afetando sua mobilidade, bioacessibilidade e fitotoxicidade (NAGAJYOTI et al., 2010; LOUBNA et al., 2015).

A determinação elementar é um passo importante para obtenção de informações nutricionais e geoquímicas para os fertilizantes orgânicos. Porém, durante o processo de compostagem alguns elementos podem passar de tóxicos a essenciais de acordo com a sua quantidade no ambiente, ou mesmo com a forma com que se apresenta. As diferentes formas com que um elemento se apresenta são chamadas de espécies, e cada espécie pode determinar um comportamento diferente para um dado elemento (TEMPLETON et al., 2000). Um exemplo é o cromo, no qual há grande diferença de toxicidade entre as espécies Cr(III) e Cr(VI),

sendo a segunda muito mais tóxica que a primeira (KATZ e SALEM, 1995). No enfoque bioquímico, a análise de especiação traz informações que auxiliam o entendimento de transformações elementares em determinado sistema biológico (SZPUNAR, 2000).

No ano de 2000, a IUPAC reuniu uma comissão para a definição dos termos relacionados à especiação, visto que muitas vezes este termo estava sendo utilizado no contexto de transformação de espécies, distribuição de espécies em diferentes meios ou mesmo indicando a própria atividade analítica de se determinar a concentração das espécies (TEMPLETON et al., 2000). Algumas destas definições foram:

- Espécies: forma química específica que um elemento se encontra, definida por sua composição isotópica, estado de oxidação e/ou estrutura de complexação/molecular
- Especiação: distribuição das espécies de um elemento em uma determinada amostra ou matriz
- Análise de especiação: identificar e quantificar as espécies
- Fracionamento: classificação de um analito ou grupo de analitos de uma certa amostra de acordo com propriedades físicas (solubilidade, por exemplo) ou químicas (reatividade, ligação)

Muitas vezes, as espécies em si não são estáveis o suficiente para ser determinadas na matriz, podendo se interconverter em outras por simples mudanças de pH ou mesmo por efeitos intrínsecos à forma de medida. Assim, é interessante segregar os compostos em classes com propriedades físico-químicas semelhantes,

ou seja, realizar uma etapa de fracionamento. O fracionamento pode ser realizado levando em consideração características como tamanho, solubilidade, afinidade, carga, etc. Dentro do conceito de especiação, podem ser definidos grupos de espécies como “orgânicos e inorgânicos” ou até “disponíveis e não-disponíveis” (TEMPLETON et al., 2000).

1.3.1. Fracionamento por tamanho de partículas

Em solos, os metais constituem os maiores contaminantes, principalmente devido aos processos de adsorção promovidos por material inorgânico, como argilas, óxidos e hidróxidos metálicos, carbonatos e fosfatos, ou por material orgânico, como ácidos húmicos e fúlvicos (BRADL, 2004).

O tamanho e composição das partículas estão relacionados à mobilidade e à interação biológica de metais em solos (ZHANG et al., 2003). Normalmente, as partículas de menor tamanho apresentam maior habilidade em conter metais pesados, devido à maior área superficial, presença de argila, matéria orgânica e óxidos de Fe/Al/Mn (SEMLALI et al., 2001; CAI et al., 2002; SUTHERLAND, 2003; LJUNG et al., 2006; WANG et al., 2006). Além disso, partículas mais finas são mais bem transportadas para camadas mais profundas do solo, além de apresentar melhor interação com água e ar, sendo potencialmente mais perigosas ao meio ambiente (FARENHORST e BRYAN, 1995; UUSITALO et al., 2001).

As mesmas considerações podem ser aplicadas a fertilizante orgânicos, que por possuírem tanto material orgânico humificado quanto mineral, podem apresentar os nutrientes e contaminantes associados a estas diferentes frações de tamanhos de partícula.

O fracionamento por tamanho de partículas e a distribuição de metais em esterco suíno foi estudado por Marcato et al. (2008). Neste trabalho, foi avaliado o efeito da decomposição anaeróbia no fracionamento e distribuição de contaminantes e nutrientes, sendo analisadas a amostra bruta, digerida, fração líquida e fração sólida. Os tamanhos de partículas foram de 250, 43, 25, 3 e 0,45 μm , separados por técnicas de peneiramento e filtração. O teor de nitrogênio total foi praticamente constante antes e depois da digestão anaeróbia, como já esperado para processos de compostagem. Houve também aumento das concentrações de metais após a digestão anaeróbia, devido a perda de matéria orgânica na forma de CO_2 . A distribuição por tamanho de partícula mostrou que tanto o excremento digerido quanto o bruto apresentam 92% do material maior que 3 μm . Houveram dois picos de distribuição de tamanhos: a 28 e 53 μm para o digerido e a 950 e 700 μm para o bruto, sendo que o primeiro pico corresponde aos supracolóides (1-100 μm , contendo “flocos” bacterianos, células e resíduos orgânicos) e segundo a materiais sedimentáveis (>100 μm , resíduos orgânicos) (ANDARA e ESTEBAN, 2002; SHON et al., 2006). Segundo a distribuição obtida, as partículas menores (como carboidratos, proteínas, ácidos graxos) foram digeridas, levando a um aumento na proporção de partículas maiores. Quanto aos elementos, Ca e P foram encontrados majoritariamente nas frações maiores que 200 μm , em menor quantidade nas frações intermediárias e depois com um pequeno aumento nas menores frações. Já o enxofre apresentou as suas maiores concentrações fração abaixo de 3 μm . K apresentou concentrações crescentes de 250 a 25 μm e decrescentes nas frações menores, e segundo os autores, a solubilidade dos compostos de potássio está associada a esta distribuição. Para os outros metais, as concentrações foram

maiores quanto menor o tamanho de partícula, havendo correlação com a adsorvidade em meios com maior área superficial (MARCATO et al., 2008).

Doublet et al. (2010) caracterizaram a distribuição de C e N em diversos tamanhos de partícula em composto de lodo de esgoto, avaliando também a influência das frações para a mineralização de C e N na amostra, analisando a matéria orgânica por pirólise e GC-MS. As amostras secas foram fracionadas utilizando peneiras com aberturas de 200 μ m, 5 mm e 20 mm, com distribuição por massa de 26%, 64% e 10% nas respectivas frações de tamanho de partícula. O teor de carbono foi maior com o aumento do tamanho de partícula, enquanto que o contrário foi observado para o N. Na análise por GC-MS os compostos identificados foram separados em 5 grupos: compostos nitrogenados, derivados de polissacarídeos, derivados de lignina, derivados de lipídeos e compostos não-especificados. Comparando os pirolisados obtidos para o lodo antes e depois do processo de compostagem, foi observada pequena redução de compostos contendo N (33 para 22%), grande aumento de derivados de polissacarídeos (de 6% para 27%) e de derivados de lignina (1,2 para 26%), grande queda para compostos derivados de lipídeos (44 para 1%) e pequeno aumento para compostos sem origem específica (16 para 24%). Estes dados ilustram a transformação da matéria orgânica durante o processo de compostagem, em que há a degradação de compostos orgânicos de estruturas mais simples e posterior polimerização para estruturas mais complexas (DOUBLET et al., 2010).

Gomez-Muñoz et al. (2011) avaliaram a distribuição de C, N e nutrientes em compostagem de resíduos da produção de azeite, utilizando várias proporções de material. As partículas foram segregadas em < 0,212, 0,212 – 1,0 e 1,0 – 6,0 mm, sendo avaliados os teores de N, P e K. Foram também determinados os polifenóis,

fibras e lignina, e celulose, além do índice de germinação. Entre as 7 amostras estudadas, a razão C/N variou de 27,2 a 35,8, e os teores de lignina variaram de 7,6 a 35,5% de acordo com o *bulking agent* utilizado, sendo os maiores valores encontrados para os compostos que utilizaram palha. Os teores de polifenóis foram baixos e semelhantes para todos os compostos, variando de 9,4 a 21,1 mg g⁻¹. Em todos os compostos, houve maior massa na fração 1 – 6 mm (51,6 a 63,6%), enquanto que a contribuição da fração < 0,212 mm foi menor que 15%. O teor de C aumentou com o aumento do tamanho de partícula, bem como o teor de lignina, indicando que o C está associado a compostos mais estáveis nos maiores tamanhos de partícula. O teor de N aumentou com a diminuição do tamanho de partícula, logo a razão C/N reduziu com o aumento do tamanho de partícula. N, P e K estavam mais presentes na fração 1 – 6 mm, com poucas variações entre as amostras (GÓMEZ-MUÑOZ et al., 2011).

Gong et al. (2014) avaliaram a toxicidade de Cr, Pb, As e Cd em solos, investigando a distribuição de tamanhos de partícula e lixiviabilidade e dos elementos nas diferentes frações. Amostras de solo de 3 pontos da província de Hainan foram secas e peneiradas a 4000, 2000, 1000, 250 e 53 µm, e a lixiviabilidade dos elementos no solo foi avaliada por extração em água. Os solos apresentaram a seguinte distribuição de tamanhos: 53 – 250 µm (32,4 – 35,4%), 250 – 1000 µm (31,4 – 38%), < 53 µm (5,1 a 9,6 %) e > 4000 µm (< 5%). A concentração elementar aumentou com a redução do tamanho de partícula e todos os elementos foram pouco lixiviáveis em todos os tamanhos de partícula, com extrações menores do que 1,5% (GONG et al., 2014).

Sharifi et al. (2015) avaliaram a salinidade e a concentração de elementos potencialmente tóxicos em lodo de esgoto doméstico, com a proposta de realizar

segregações prévias à aplicação do produto de compostagem como fertilizante, reduzindo a toxicidade. As peneiras utilizadas foram de > 2, 1,2, 0,8, 0,4, 0,2 e 0,1 mm. As frações de maior tamanho de partícula eram mais representativas em massa, com 47% para > 2 mm e 8,5% para < 0,1mm. Não houveram grandes variações para os teores de carbono, N e P com o tamanho de partícula, porém K, Ca e Mg tiveram as concentrações aumentadas com o tamanho de partícula. Fe apresentou concentrações praticamente constantes (cerca de 2,2%) em todas as frações, exceto na > 2mm (1,4%), porém todos os outros metais avaliados (Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr e Mn) tiveram suas concentrações aumentadas com a redução do tamanho de partícula. A condutividade elétrica também apresentou a mesma tendência. Os autores dizem que o enriquecimento elementar nas frações de menor diâmetro pode ser devido à solubilização dos metais presentes nas frações maiores durante a decomposição microbiana com posterior adsorção às frações com menor diâmetro, devido à maior área superficial e capacidade de troca catiônica (SHARIFI e RENELLA, 2015).

1.3.2. Fracionamento elementar por extrações – avaliação de mobilidade e disponibilidade

A disponibilidade de elementos em solos e sedimentos pode ser avaliada por extrações únicas (*single extractions*) ou sequenciais. O procedimento de extrações sequenciais do BCR (acrônimo francês para *Community Bureau of Reference*) da Comissão Europeia de Padrões, Medidas e Testes é o mais utilizado para avaliação de bioacessibilidade de contaminantes e nutrientes em solos e sedimentos (RAURET et al., 1999). Cada uma das etapas do procedimento é utilizada para

representar um efeito ambiental importante, sendo elas (BACON e DAVIDSON, 2008):

- 1) Ácido acético 0,11 M, fração trocável em meio ácido, simulando o que ocorreria em meio levemente ácido. Os elementos lixiviados nesta etapa são definidos como mais bioacessíveis, pois estão fracamente associados à matriz
- 2) Cloridrato de hidroxilamina 0,5 M, fração redutível, representando a redução que ocorre após assentamento de uma coluna de sedimento sobre a matriz. Os elementos associados nesta fração muitas vezes são generalizados como associados a óxidos de Fe e de Mn.
- 3) Peróxido de hidrogênio 30% e acetato de amônio 1 M, sendo uma etapa de oxidação necessária para lixiviar elementos associados a compostos orgânicos.

É necessário frisar que a extração sequencial é mais bem aplicada se em conjunto com outras técnicas analíticas, como DRX, XANES e EXAFS nos resíduos de cada etapa, de modo a identificar mais precisamente os componentes da matriz aos quais os elementos podem estar associados e evitar interpretações equivocadas (BACON e DAVIDSON, 2008).

Estudos de translocação de elementos em plantas mostram que a fração disponível do procedimento do BCR tem mostrado boa correlação com a absorção de metais do meio para o ente biológico, porém para as frações redutível e oxidável há resultados diversos (BACON e DAVIDSON, 2008). Assim, a falta de

especificidade é uma desvantagem do uso de extrações sequenciais para avaliação de bioacessibilidade.

De acordo com diversos estudos realizados com extrações sequenciais e de etapa única, os elementos potencialmente tóxicos são considerados menos disponíveis à medida que o composto amadurece, principalmente pela formação de complexos estáveis metais-ácidos húmicos durante os processos de compostagem. Além do procedimento do BCR, há uma grande variedade de procedimentos de avaliação de bioacessibilidade na literatura, possibilitando várias estratégias de preparo e diversas interpretações.

Em trabalho realizado por Greenway et al. (2002), foram determinados os teores de elementos potencialmente tóxicos em amostras durante a compostagem convencional, realizando o fracionamento com o procedimento do BCR e correlacionando seus resultados com outros parâmetros medidos. Cada uma das amostras tinha uma diferente mistura de matérias primas, o que é esperado que influencie nos resultados observados. Com o processo de compostagem, houve ligeiro aumento do pH, redução da razão C/N e aumento da concentração total dos elementos propostos. As extrações sequenciais foram aplicadas para os diferentes compostos em diversos tempos de amostragem. Para o Cr, foi observada maior concentração deste elemento em frações menos disponíveis, explicado pelos autores como a redução do Cr(VI) a Cr(III) por micro-organismos e sua combinação com material orgânico decomposto. Para o As, houveram diferenças nas distribuições entre todas as amostras, sendo que em todas havia também este elemento em frações mais móveis, e conseqüentemente, mais disponíveis. O Cd manteve-se majoritariamente em frações mais móveis, com pequena redução

somente em uma das amostras, e o Pb mostrou-se presente principalmente nas frações orgânicas para todos os compostos (GREENWAY e SONG, 2002).

Ingelmo et al. (2012) realizaram estudo para correlacionar a acessibilidade de metais com a fração húmica em diferentes estágios do processo de compostagem, utilizando lodo de esgoto digerido de forma anaeróbia co-compostado com lascas de madeira. Foi realizado um procedimento de extrações em etapa única utilizando H_2O , KNO_3 , $NaOH$ e EDTA (AMIR et al., 2005) para avaliar a fração acessível dos metais.. Os metais pouco acessíveis foram extraídos com HNO_3 4,0 M, e os ácidos húmicos e fúlvicos foram extraídos e isolados conforme procedimento da IHSS. Para todos os elementos, exceto o Pb, houve maior extração na fração móvel do que na de baixa acessibilidade. Para o Zn, houve crescimento de sua concentração na fração acessível até cerca de metade do tempo de compostagem com posterior decréscimo, enquanto houve a tendência contrária para a fração pouco acessível. Para Cu, Ni e Cd houve aumento da acessibilidade com o tempo de compostagem. Para o Pb, a fração acessível é constante durante todo o processo enquanto que houve crescimento da fração pouco acessível, indicando que esse aumento pode vir de chumbo presente na fração residual, transformado durante a compostagem. Cálculos estatísticos foram realizados para associar os resultados da acessibilidade dos metais com a composição da matéria orgânica: o Zn está positivamente relacionado com os ácidos fúlvicos, ou seja, no final da compostagem está menos acessível por haver maior teor de compostos mais estáveis. Cu, Cd e Ni estariam associados aos ácidos húmicos, tendo suas concentrações reduzidas na fração residual. Para o Pb, ocorreu a transformação de sua quantidade residual na fração pouco acessível (INGELMO et al., 2012).

Lu et al. (2014) avaliaram o efeito da adição de rochas fosfáticas durante a compostagem de esterco de porco avaliando a correlação entre a mobilidade e bioacessibilidade de Cu e Zn pelo procedimento do BCR. O uso da rocha fosfática durante a compostagem não alterou o perfil de temperatura observado entre as pilhas e o controle. Os autores observaram aumento de pH durante o início da compostagem, causado pela degradação de ácidos orgânicos e pela liberação de compostos de amônia. No final do período de compostagem houve queda do pH, explicada pela ressíntese de ácidos orgânicos, como ácidos húmicos e fúlvicos, ou ainda compostos fenólicos (SATISHA e DEVARAJAN, 2007). Em todas as pilhas houve aumento da razão C/N nos primeiros 7 dias e depois queda, sendo os valores finais entre 13 e 17. Os teores totais de Cu e Zn aumentaram com o tempo de compostagem devido à perda de massa do esterco por mineralização da matéria orgânica, chegando a 87% para o Cu e 101% para o Zn. A mobilidade do Cu reduziu com o tempo de compostagem, com a redução da concentração deste elemento nas frações trocável e redutível, enquanto que houve aumento da concentração nas frações oxidável e residual. Na pilha de compostagem em que foi adicionado a maior quantidade de rocha fosfática houve também a maior transformação do Cu em fração oxidável, enquanto que nas outras pilhas ele estava mais presente na redutível. Segundo os autores, a presença de compostos básicos provenientes da rocha fosfática ajudou a solubilizar a matéria orgânica, reduzindo a concentração elementar associada à fração oxidável. O Zn estava, inicialmente, mais presente na fração trocável em todas as pilhas, sendo um provável contaminante de solo. Durante a compostagem, em todos os tratamentos, houve aumento da concentração do Zn na fração redutível e diminuição na fração trocável (LU et al., 2014).

Rutkowska et al. (2014) estudaram os efeitos da fertilização orgânica e mineral em longo prazo em relação aos micronutrientes do solo. As maiores concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn acessíveis (extraídos com HCl 1 M) foram encontradas nos solos com menores pHs, aos quais foi adicionado com fertilizante mineral. A aplicação de cal reduziu a disponibilidade dos micronutrientes, enquanto que a aplicação de fertilizante orgânico promoveu redução da disponibilidade para o Cu e o Mn e aumento para o Fe e o Zn (RUTKOWSKA et al., 2014).

Xu et al. (2014) estudaram os efeitos de tamanho de partícula, associação com matéria orgânica e influência do pH na lixiviação de mercúrio em solos. Cerca de 80% das partículas da amostra de solo estavam acima de 1 mm; 14% estavam entre 1 e 0,22 mm e 6% abaixo de 0,22 mm. A concentração de Hg total aumentou com a redução dos tamanhos de partícula, enquanto que a solubilidade deste elemento variou de 0,03 a 0,2%, sem correlação com o tamanho de partícula, indicando que este elemento estava fortemente associado à matriz. Não houveram variações nas concentrações extraídas em diferentes meios, exceto para a realizada em NaOH, indicando que o Hg pode estar associado com a matéria orgânica (XU et al., 2014).

Chotpantarat et al. (2015) avaliaram o efeito da matéria orgânica na forma de ácidos húmicos na mobilidade de diversos elementos em resíduos de mineração. Para isso, foi utilizado ácido húmico comercial misturado em diferentes proporções às amostras e vários tempos de contato, e posteriormente aplicado o procedimento de extração sequencial do BCR. Co e Cr apresentaram redução da concentração na fração trocável com o aumento da quantidade de HA adicionado, no caso do Cr também houve aumento da concentração encontrada na fração oxidável. Ainda, a concentração residual do Cr mudou pouco com a adição de HA, mantendo-se por

volta de 80%, indicando que este elemento está fortemente ligado a compostos recalcitrantes que não foram afetados pela presença de HA. A concentração de Cu variou com a adição de HA, sendo reduzidas as concentrações presentes nas frações trocável, redutível e grande aumento na fração oxidável. Ainda, este elemento estava majoritariamente associado à fração residual, porém sua concentração nesta fração foi reduzida com o aumento do tempo de contato, sendo um resultado da forte afinidade do Cu por substâncias húmicas. Manganês apresentou concentrações crescentes nas frações trocável e oxidável com aumento da concentração de HA adicionado. Com o tempo, houve também redução de Mn na fração residual. Pb estava muito associado à fração residual, e a adição de HA reduziu ainda mais o pouco deste elemento que estava nas frações trocável e redutível, passando para a fração oxidável, indicando que, assim como o Cu, este elemento fica menos disponível com a adição de HA. Zn estava presente majoritariamente na fração residual também, e com a adição de HA houve aumento das frações oxidável e redutível, com redução das frações trocável e residual (CHOTPANTARAT et al., 2015).

Qin e colaboradores (2016) avaliaram a bioacessibilidade de elementos via digestão gastrointestinal in vitro em partículas de solo com tamanho $< 250 \mu\text{m}$, que origina o material particulado ingerido diretamente por seres humanos. O solo foi ainda peneirado em outras frações: 0,25 – 2,00 mm, 0,125 – 0,250 mm, 0,063 – 0,125 mm, e $< 0,063$ mm. Quanto menor o tamanho de partícula, maior a concentração elementar, bem como maior a extractabilidade com fluido gástrico, sendo que Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn apresentaram maior bioacessibilidade do que As, Al e Cr (QIN et al., 2016).

1.3.3. Análise de especiação

Como definido pela IUPAC, espécie é uma forma química em que um elemento se encontra, e a análise de especiação é a atividade analítica para identificação e/ou quantificação de uma ou mais espécies químicas em uma amostra. Por diferentes espécies, entendem-se os diferentes isótopos, estados de oxidação, complexos, compostos organometálicos e macromoleculares dos elementos químicos (TEMPLETON et al., 2000).

A formação de complexos, sejam orgânicos ou inorgânicos, pode afetar propriedades dos elementos como carga, solubilidade e coeficiente de difusão. Um exemplo é o do Ni, em que sais como cloreto e sulfato são solúveis em meio aquoso e apresentam baixa toxicidade, enquanto que os óxidos e sulfitos são pouco solúveis em água, porém sua bioacessibilidade é afetada na presença de ligantes presentes no meio biológico. Assim, em uma análise de um filtro de ar contendo níquel, os dados de concentração total não forneceria informações a respeito de toxicidade, enquanto que um fracionamento (espécies solúveis e insolúveis em água) já proporciona mais informações que apenas a determinação total. Uma análise de especiação, por sua vez, disponibilizaria a informação completa a respeito da presença de todas as espécies de Ni na matriz (TEMPLETON et al., 2000). As próprias reações de formação de complexos podem ser utilizadas para futuros fracionamentos, desde que haja especificidade de reação com os ligantes para diferentes espécies do elemento em questão.

Compostos organometálicos também estão entre as espécies mais determinadas, como no caso das espécies Hg(II) (tóxico para os rins e também corrosivo para mucosas) e CH_3Hg^+ (teratogênico e afeta o sistema nervoso central)

(STEWART e SULLIVAN JR, 1992). A formação de ligações covalentes metal-carbono pode ser tanto de origem antropogênica (principalmente pelo uso de fungicidas à base de Sn e herbicidas à base de As) como ambiental. É importante frisar a diferença entre metilações e alquilações com cadeias maiores, quando o enfoque é ambiental. Geralmente, os metais (em especial Hg, Ge e Sn) sofrem metilações por efeito de micro-organismos presentes em sedimentos e solos (THAYER, 1993), enquanto que em não metais como As e Se é mais comum a alquilação com cadeias maiores, incluindo a formação de arsenoaçúcares e selenoaminoácidos, que normalmente reduzem a toxicidade destes elementos no organismo (HINDMARSH et al., 1986; SIGEL e SIGEL, 1997).

O maior nível estrutural com que a análise de especiação lida são as macromoléculas, definindo as espécies distribuídas principalmente em proteínas e ácidos húmicos e fúlvicos. Por tratar de moléculas com um grande número de sítios de complexação, é bastante difícil determinar o estado de protonação de cada aminoácido em uma proteína, ou de cada um dos diversos ácidos húmicos presentes em uma amostra de solo, então normalmente é definido o fracionamento de espécies, por exemplo, como complexos metal-proteína ou metal-ácido húmico (TEMPLETON et al., 2000).

Estas diferentes espécies químicas normalmente são separadas por alguma técnica de separação, como cromatografia líquida ou gasosa e eletroforese capilar, acopladas a uma técnica de detecção elementar específica, como espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado ou absorção atômica (SZPUNAR, 2000). A própria separação cromatográfica ou eletroforética antes da análise elementar pode ser considerada um fracionamento, e deve ser garantido que não houve dissociação do

metal com o ligante, envolvendo a parte mais crítica da análise de especiação, que é o preparo da amostra. Assim, para que a especiação seja garantida, evidências adicionais das interações propostas podem ser conseguidas com o auxílio de sucessivas separações, uso de padrões e análises por espectrometria de massas (TEMPLETON et al., 2000).

Como já mencionado, dentre os maiores desafios da análise de especiação está a manutenção da integridade das espécies, para que haja real correspondência com o que há na amostra e também conseguir um balanço de massa adequado, pois podem haver perdas intrínsecas aos processos de separação e extração, de modo que, quantitativamente, a soma das espécies determinadas seja igual à concentração elementar total, ou seja, as maiores dificuldades estão relacionadas ao preparo da amostra (SZPUNAR, 2000).

Para que uma técnica hifenada possa ser aplicada à análise de especiação, durante a separação cromatográfica não deve haver alteração das espécies que foram introduzidas. Isso implica que a espécie deve ter certa estabilidade termodinâmica, além da ligação metal-ligante ser forte o suficiente para que não haja destruição do complexo (SZPUNAR, 2000).

O uso de técnicas de absorção de Raios-X também é explorado para a obter informações do estado de oxidação de elementos, havendo pouca interferência da matriz e sem necessidade do uso de extrações como preparo de amostra (BLUEMLEIN et al., 2008; UNCETA et al., 2010).

A análise de especiação de diversos elementos, focando os ácidos húmicos e fúlvicos como parte da matéria orgânica dissolvida, foi abordada por Laborda et al. (2008). A separação foi realizada por cromatografia de exclusão por tamanho e a detecção elementar específica por ICP-MS. Foram realizadas extrações em meios

com pH 5, 7 e 10, e os ácidos húmicos e fúlvicos extraídos e isolados seguindo o procedimento recomendado pela IHSS. O cromatograma para os ácidos húmicos apresentou um pico no volume morto, indicando a saída de compostos com massa molecular maior que 81 kDa, e outro a 3,3 kDa, com grande dispersão indicando alta heterogeneidade do composto molecular eluído, enquanto que os ácidos fúlvicos apresentaram menor dispersão e um pico por volta de 0,96 kDa. Na cromatografia dos extratos, os autores observaram que com o aumento do pH mais substâncias de maior massa molecular foram eluídas, sendo compatível com a teoria dos equilíbrios de dissolução de ácidos húmicos e fúlvicos. Em pH 5 houve confirmação deste padrão de eluição apenas de ácidos fúlvicos, enquanto que em pH 7 houve uma mistura e em pH 10 a concentração de HAs extraídos aumentou significativamente. Para determinar as diferentes proporções de HAs e FAs extraídos em diferentes pHs, a deconvolução da resposta UV foi realizada considerando a soma dos picos cromatográficos como os picos dos compostos isolados na primeira etapa, uma vez que a distribuição Gaussiana é prevalente. Para a distribuição elementar, em pH 7, foi possível observar que para o Co e Cu há uma banda larga, com massas entre 0,2 e 35 kDa, enquanto que para o Pb e o Bi há dois picos de máximo, um no volume morto e outro entre 4,3 e 1,5 kDa. Além disso, a similaridade do cromatograma do Co com o espectro UV mostra que este elemento estava majoritariamente ligado a substâncias húmicas. Ainda, nos cromatogramas obtidos, é possível observar a presença de substâncias não húmicas e a interação de alguns metais com elas. Assim, com o uso de deconvolução, foi possível estimar a concentração dos elementos e a sua ligação com substância húmicas e fúlvicas (LABORDA et al., 2008).

A comparação de ultrafiltração (UF), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e *Field-Flow Fractionating* (FFF) foram abordadas no trabalho de Bolea et al. (2006) para caracterização de substâncias húmicas extraídas de um composto, submetido a extração com água. Para a UF, não foi observado sinal para a fração maior que 10 kDa, indicando que não foi detectada a presença de HA. A fração menor que 1 kDa continha a maior parte do material húmico, indicando que este é composto majoritariamente por ácidos fúlvicos. Os elementos se distribuíram ao longo das diversas frações, não seguindo a distribuição das substâncias húmicas. Metais alcalinos, Mg e elementos presentes como oxiânions (B, W, Mo, As) estavam majoritariamente na forma iônica, não ligados a material húmico. A maioria dos metais de transição, alcalinos terrosos e o urânio estavam nas frações > 1 kDa e < 10 kDa, associados à matéria orgânica. Cátions tri e tetravalentes, assim como alguns divalentes pesados, tiveram suas concentrações bem distribuídas ao longo das frações. O cromatograma obtido mostrou resultados bastante similares ao de ultrafiltração, onde a maior parte das substâncias húmicas estavam na fração < 10 kDa. Para micronutrientes como Co, Cu, Ni e Zn há um pico em 0,9 kDa, indicando sua associação com material fúlvico. As recuperações obtidas (calculadas em comparação à injeção sem a coluna) variaram de 105% (Cr) a 35% (Zn). Outros elementos como Zr, Fe, Sn e Al apresentaram recuperações abaixo de 60%, indicando que podem ter ficado retidos na coluna. Os três métodos utilizados apresentaram resultados semelhantes não apenas para o fracionamento de substâncias húmicas, mas também para a especiação dos elementos nas diversas frações (BOLEA et al., 2006).

A interação de Fe com ácido húmico foi avaliada por SEC-UV-GFAAS por Fang et al. (2015). Neste tipo de acoplamento entre técnica de separação e técnica

de detecção elementar específica é necessário selecionar os tempos de retenção de interesse e coletar as frações, que serão analisadas por GF AAS por injeção, e não em fluxo, sendo um acoplamento do tipo *off-line*. Com a concentração crescente de Fe adicionada, a uma razão molar de 0,0052 foi atingido um patamar, que foi interpretado como a saturação da complexação de Fe por ácidos húmicos, identificado como área constante do cromatograma. A força iônica foi ajustada com NaCl, e quanto maior a concentração de sal (a partir de 0,004 mol L⁻¹) menor a área do pico de Fe associado a HA. Segundo os autores, quanto maior a força iônica menor a repulsão entre os grupos funcionais adjacentes presentes nos HAs, permitindo que as moléculas adquiram uma conformação mais compacta (CHIN e GSCHWEND, 1991), e gerando um efeito de proteção dos grupos para a complexação com o Fe. O pH foi variado de 2 a 10, e foram observadas 3 regiões distintas de comportamento: pouca complexação em pH de 2 a 4, e presença de íons Fe livre; aumento da complexação de forma crescente em pH de 4 a 6, com hidrólise do Fe concomitante com desprotonação dos ácidos húmicos, sendo este segundo efeito o mais importante, já que houve o máximo de complexação e decréscimo suave em pH 7 a 10, devido à hidrólise mais severa do Fe. A temperatura também apresentou um padrão de gaussiana, com baixa complexação em temperaturas menores pela baixa mobilidade molecular, melhor complexação em cerca de 25°C e queda na complexação em temperaturas acima disso, indicando que o complexo formado pode ser instável (FANG et al., 2015).

2. Objetivos

O objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento de métodos para determinações elementares totais em fertilizantes base orgânica, substrato e condicionadores de solo, bem como estudos de fracionamento e análise de especiação de Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn e caracterização em termos de morfologia e composição das frações do fertilizante orgânico.

3. Experimental

3.1. Instrumentação

As amostras e materiais certificados foram pesados em balança analítica Ohaus Adventurer (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), com precisão de até 0,0001 g, secas em Liofilizador Modulyo D-115 (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Inglaterra) e moídas em moinho automático com almofariz e pistilo de ágata, modelo RM 200 (Retsch, Haan, Alemanha).

A separação da amostra em diferentes tamanhos de partícula foi realizada em peneirador automático vibratório AS 200 (Retsch), utilizando peneiras com 500, 400, 300, 200, 100 e 50 μm de abertura.

Mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis, São Paulo, Brasil), foi utilizada para promover a homogeneização e agitação constante durante as extrações. Centrífuga para tubos, modelo Q222TM (Quimis), foi empregada na separação do sobrenadante das soluções e agitador tipo Vortex, modelo Q220, (Quimis), foi utilizado para auxiliar a solubilização do ácido bórico nos digeridos.

Ajustes e medidas de pH foram realizadas com pHmetro, modelo DM-20 (Digimed, São Paulo, Brasil).

Análises dos teores de carbono e nitrogênio foram realizadas em analisador %CHN 2400 (Perkin Elmer, Connecticut, EUA), pela Central Analítica do IQ-USP.

A digestão das amostras e material de referência certificado foi realizada em forno de micro-ondas de alta pressão, modelo UltraWAVE (Milestone, Bergamo, Itália), com tecnologia de Câmara Única de Reação (SRC, *Single Reaction*

Chamber), pré-pressurização da cavidade com nitrogênio e utilizando tubos de TFM® de 15 mL com tampas de mesmo material em *rack* de 15 posições.

Três instrumentos foram utilizados para as determinações elementares:

- ICP OES modelo iCAP série 6000 Duo (Thermo Fisher Scientific), com vista axial e radial, detector simultâneo CID (*Charge Injection Device*, Dispositivo de injeção de carga), com intervalo de trabalho de 166,25 a 847,0 nm, resolução espectral de 7 pm a 200 nm, 383 mm de distância focal, policromador Echelle com 52,91 linhas mm⁻¹ e fonte de radiofrequência de 27,12 MHz, que permite ajuste da potência aplicada de 750 a 1350 W. Foi utilizado sistema de introdução de amostra constituído por nebulizador do tipo Burgener MiraMist® concêntrico de Teflon®, com câmara de expansão ciclônica de Teflon® e tocha de quartzo com canal central de cerâmica com 2 mm de diâmetro.
- GF AAS ZEE nit 60 (AnalytikjenaAG, Jena, Alemanha) equipado com corretor baseado no efeito Zeeman ajustado para correções de fundo em 2 e 3 campos, atomizador recoberto com grafite pirolítico aquecido transversalmente e plataforma de grafite pirolítico do tipo boat, utilizando lâmpadas de catodo oco de As ($\lambda = 193,7$ nm, $i = 4,0$ mA), Cd ($\lambda = 228,8$ nm, $i = 4,0$ mA) e Se ($\lambda = 196,0$ nm, $i = 8,0$ mA) como fontes de radiação.
- ICP-MS Agilent 7900 (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), com fonte de radiofrequência de 27 MHz, permitindo ajuste da potência de 500 a 1600 MHz, profundidade de amostragem ajustável de 3 a 28 mm, cone de amostragem com orifício de 1 mm de diâmetro e *skimmer* com orifício de 0,45 mm (ambos de níquel), equipado com Sistema de Reação por Octapolo

(Octapole Reaction System, ORS⁴) utilizado no modo de colisão com He, analisador de massas de quadrupolo, com intervalo de trabalho de 2 a 260 u.m.a. e resolução variável de 0,3 a 1 u.m.a e detector em arranjo de dinodos. Para introdução das amostras, foi utilizado nebulizador concêntrico de quartzo MicroMist[®], câmara de expansão de duplo passo refrigerada por sistema Peltier a -5 °C e tocha de quartzo com injetor de 2,5 mm de diâmetro interno.

Espectrômetro UV-Visível, modelo Varian Cary 50 Probe com cell holder para 18 cubetas, foi utilizado para medidas de absorção molecular em extratos.

As fases cristalinas foram investigadas com difratômetro de Raios-X DRX-Miniflex, (Rigaku, Tóquio, Japão), que opera a 8 keV e radiação K α a 1,5418 Å, da Central Analítica do IQ-USP. A varredura foi realizada de 5° a 70°, a um passo de 0,02° s⁻¹.

Foi realizada análise por espectrometria de absorção de Raios-X próximos à borda (*X-ray Absorption Near Edge Structure*, XANES) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Capinas, São Paulo, utilizando a linha XAFS2, com fonte de íons Bending Magnetic D08B (15°), monocromador de silício, intervalo de energia de 3,5 a 17,0 keV, feixe de dimensões 450 x 250 μm^2 , fluxo de fótons de $2,78 \times 10^9$ fótons s⁻¹ (a 7 keV, 100 mA), resolução de $1,71 \times 10^{-4}$ (a 7 keV) e detector de Ge de estado sólido.

A separação cromatográfica de exclusão por tamanho foi realizada em coluna Superdex[®] 75 10/300 com corte molecular de 3 a 70 kDa (Amersham Biosciences, GEHealthcare, Chicago, EUA), em cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com sistema de desgaseificação (DGU - 20

A3), bombas de pistão recíprocas (LC – 6 AD), detector UV-Vis (SPD – 20 A) e sistema coletor de frações (FRC – 100 A).

Banho ultrassônico com capacidade para 2 L, modelo 75 D (VWR Scientific Instruments, Radnor, EUA) com frequência de 40 kHz e sistema de filtração a vácuo com membrana de éster de celulose com 0,45 µm de porosidade foram utilizados para o preparo da fase móvel utilizada na cromatografia de exclusão por tamanho.

3.2. Reagentes e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água de elevado grau de pureza (resistividade maior que 18.2 MΩ cm), obtida em um desionizador com sistemas de ultra purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, USA).

Foram utilizadas amostras de fertilizante orgânico misto (Lote: 0409), substrato (Lote: 270913-1) e condicionadores de solo (Lotes: PT300712-10 e 2505), fornecidas pela Associação Brasileira de Insumos para Agricultura Sustentável (INPAS).

Material de referência certificado de lodo de esgoto CRM 029 (*trace elements in sewage sludge 2* - Sigma-Aldrich, Missouri, USA) foi utilizado para o desenvolvimento de método da digestão por forno de micro-ondas e determinações elementares por ICP OES.

As soluções analíticas de referência foram preparadas a partir de soluções estoques contendo 1000 mg L⁻¹ de alumínio (AlCl₃), arsênio (As₂O₅), cálcio (CaCl₂), cádmio (CdCl₂), chumbo (Pb(NO₃)₂), cobre (CuCl₂), crômio (CrCl₃), ferro(FeCl₃), magnésio (MgCl₂), manganês (MnCl₂), potássio (KNO₃), selênio (SeO₂), sódio (NaNO₃), vanádio (NH₄VO₃) e zinco (ZnCl₂), todas Titrisol® (Merck, Darmstadt,

Alemanha) em meio de 0,1% v v⁻¹ de ácido nítrico (Merck). Fósforo (H₃PO₄) e enxofre (H₂SO₄) eram Fluka® (Sigma-Aldrich).

Para o preparo do modificador químico para as determinações por GF AAS foram utilizadas soluções de Mg(NO₃)₂ 1000 mg L⁻¹ e Pd(NO₃)₂ 10000 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich).

Soluções de 1000 mg L⁻¹ de Ga(NO₃)₃ e Rh(NO₃)₃ foram utilizadas para o preparo da solução que foi utilizada como padrão interno para as determinações por ICP-MS.

O gás utilizado para purgar a óptica, formar o plasma, como gás auxiliar e de introdução da amostra em ICP OES e ICP-MS, bem como para purga e proteção do forno de grafite durante as determinações por GF AAS foi argônio 99,998% v v⁻¹ (Oxilúmen, São Paulo, SP). O gás utilizado na célula de colisão do ICP-MS foi hélio 99,999% v v⁻¹ (Air Liquide, São Paulo, Brasil).

Ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e ácido bórico (Merck) e ácido tetrafluorobórico (Sigma-Aldrich) foram utilizados para digestão das amostras.

Ácido acético, peróxido de hidrogênio, acetato de amônio, hidróxido de amônio (Merck) e hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) foram utilizados no preparo das soluções extratoras.

Pastilhas de Cr(NO₃)₃, Cr₂O₃, K₂Cr₂O₇, Fe₂O₃, FeO, FeSO₄, e folhas metálicas de Cr e Fe foram utilizados como referências nas análises por XANES.

Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) foi utilizado para preparo da solução-tampão utilizada como fase móvel na cromatografia de exclusão por tamanho.

Ácido húmico, ácido fúlvico e lignina sólidos (Sigma-Aldrich) foram utilizados como padrões para as investigações de cromatografia de exclusão por tamanho.

Conjuntos para filtração em gel contendo anidrase carbônica, ovoalbumina, conalbumina e Blue Dextran (GE Healthcare) e albumina (Sigma-Aldrich) foram utilizados para calibração da coluna de cromatografia de exclusão por tamanho.

3.3. Procedimento

Todas as vidrarias e frascos de polipropileno utilizados neste trabalho foram lavados com água e detergente, enxaguados com água destilada, mergulhados por no mínimo 24 horas em solução ácido nítrico 10% (v v⁻¹), enxaguados novamente com água deionizada e secos em capela de fluxo laminar classe 100 (Veco, São Paulo, Brasil) antes do uso. A eficiência desse procedimento de descontaminação foi sempre monitorada pelo controle dos brancos analíticos.

3.3.1. Pré-tratamento e caracterização das amostras

3.3.1.1. Liofilização

Cerca de 400 g das amostras foram distribuídas em diferentes pratos no liofilizador durante aproximadamente 96 horas, até que a massa fosse constante. A temperatura do sistema foi fixada em -35 °C e a pressão de, aproximadamente, 1,9 mm Hg.

3.3.1.2. Moagem

As amostras eram visivelmente bastante heterogêneas, com raízes e pedaços de folhas parcialmente decompostos, como pode ser observado na Figura 4. Assim, para todas as análises (exceto a distribuição por tamanhos de partícula) foi realizada moagem das amostras com moinho de almofariz e pistilo automático de ágata, de modo a garantir maior homogeneidade das alíquotas de amostra utilizadas nas próximas etapas do trabalho (SANTOS et al., 2016).

Figura 4: Foto com as amostras de fertilizante, condicionadores e substrato *in natura*.

Massas de 50 g de amostra foram submetidas a moagem, por aproximadamente 10 min, alterando a altura do pistilo de tempos em tempos de

modo a aumentar a pressão entre as peças, contribuindo para uma maior cominuição do material. Para as determinações elementares totais, também foram submetidas à moagem as frações com tamanho de partícula $> 500 \mu\text{m}$ e entre 500 e $400 \mu\text{m}$ da amostra de fertilizante orgânico.

3.3.1.3. *Peneiramento para fracionamento por tamanho de partículas*

Aproximadamente 20 g das amostras foram colocadas sobre a peneira de maior abertura (500 μm). Cada uma das peneiras de menor abertura foi colocada consecutivamente uma abaixo da outra, de modo a recolher a fração de menor tamanho ($< 50 \mu\text{m}$) em um prato posicionado abaixo da última peneira. O equipamento foi programado para uma amplitude de vibração de 1,50 mm g^{-1} , durante 45 minutos (Figura 5). As frações de cada um dos tamanhos de partícula foram recolhidas, pesadas e armazenadas em frascos de polipropileno.

Figura 5: Representação gráfica do sistema de peneiramento automático, com o tamanho de cada fração retida nas peneiras.

Em cada uma das frações obtidas após o peneiramento foram feitas determinações dos teores de C e N no equipamento da Central Analítica do IQ-USP e determinação elementar total por ICP OES, utilizando o procedimento de digestão assistida por micro-ondas desenvolvido.

3.3.2. Determinação elementar total

3.3.2.1. Otimização do método de preparo de amostra com forno de micro-ondas

O uso de sistemas de digestão assistida por micro-ondas tem ganhado espaço por apresentar diversas vantagens frente aos métodos tradicionais de digestão de amostras tais como menores tempos, melhores recuperações de elementos voláteis, menores volumes de reagentes utilizados, melhor reprodutibilidade e menor possibilidade de contaminação, principalmente para os sistemas com frasco fechado (AGAZZI e PIROLA, 2000; MORAES et al., 2016).

O aquecimento assistido por radiação micro-ondas ocorre com a resistência da solução ao efeito de migração iônica e rotação de dipolo, ou seja, apenas soluções ou materiais que sejam suscetíveis a tais efeitos absorvem a radiação micro-ondas (KINGSTON e HASWELL, 1997). Com o uso de frascos fechados, há também o aumento da pressão, que leva ao aumento da temperatura de ebulição dos líquidos. Como as paredes dos frascos e a fase vapor continuam com temperaturas mais baixas do que a solução, pois não absorvem a radiação com a mesma eficiência, a taxa de condensação é muito elevada se comparada a um sistema de aquecimento condutivo, gerando um sistema de refluxo e regenerando os ácidos para a digestão (AGAZZI e PIROLA, 2000). Adicionalmente, em altas

temperaturas também pode ser observado um aumento no potencial de oxidação de alguns ácidos, o que também facilita a digestão dos materiais (RICHTER et al., 2001).

Há dois tipos mais comuns de fornos de micro-ondas: com cavidade e frasco fechado, operando a altas pressão e temperatura e o focalizado com frasco aberto, operando a pressão ambiente e menores temperaturas. No micro-ondas com cavidade, um magnetron produz a radiação que é direcionada por um guia de ondas até chegar à cavidade do forno, onde estão os frascos com as amostras e soluções. Os frascos fechados são dispostos em um carrossel, que gira para que todas as amostras recebam a mesma quantidade de radiação. No geral, o sistema é mais complexo, pois necessita de sistemas de controle de pressão e de temperatura. O micro-ondas focalizado difere no posicionamento do frasco com amostra e solução no próprio guia de ondas, recebendo diretamente a radiação. Geralmente são utilizados sistemas abertos ou com uma tampa adaptada para o refluxo, no qual é possível fazer a adição de reagentes durante o funcionamento do equipamento (RICHTER et al., 2001).

O forno de micro-ondas utilizado neste trabalho para a digestão das amostras de fertilizante orgânico, substrato e condicionados de solo é do tipo com cavidade e fechado, porém diferente dos fornos de micro-ondas tradicionais, pois a cavidade de aço inox (*Single Reaction Chamber*, SRC) acondiciona um frasco de Teflon®, dentro do qual serão posicionados os frascos contendo amostra e reagentes para digestão. Ao frasco de Teflon® é adicionada uma solução contendo 130 mL de H_2O + 5 mL de H_2O_2 + 2 mL de H_2SO_4 , na qual os frascos contendo as amostras e reagentes ficam parcialmente imersos. A presença do ácido sulfúrico potencializa os efeitos de migração iônica, garantindo maior homogeneidade do aquecimento desta

solução e, conseqüentemente, entre os diversos frascos de digestão nela mergulhados, enquanto que o peróxido oxida gases que nesta solução se dissolvem (e.g. NO), evitando o escape para a atmosfera do laboratório. Um desenho esquemático dos frascos de digestão dentro da SRC está representado na Figura 6.

Figura 6: Desenho esquemático dos frascos de digestão dentro do sistema do UltraWAVE (MILESTONE, 2017).

Para a escolha da mistura ácida a ser utilizada no procedimento de digestão, aproximadamente 150 mg de material de referência certificado de lodo de esgoto (CRM 029) foram pesados diretamente nos frascos de digestão de TFM, em seguida adicionadas as misturas ácidas descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Misturas ácidas utilizadas na otimização do procedimento de digestão das amostras de fertilizante orgânico, substrato e condicionadores de solo

Procedimento	HNO₃ (mL)	H₂O₂ (mL)	HF (mL)	H₃BO₃ (mg)	H₂O (mL)	HB₄ (mL)
A	3	1	-	-	2	-
B	3	1	0,3	-	0,7	-
C	3	1	0,3	150	0,7	-
D	3	1	0,3	150*	0,7	-
E	3	1	1	-	1	-
F	3	1	1	200	1	-
G	3	1	1	200*	1	-
H	3	1	1*	200*	2	-
I	3	1	1*	-	2	-
J	5	-	1	200	-	-
K	5	-	1	200*	-	-
L	3	-	1	200	2	-
M	3	-	1	200*	2	-
N	5	-	1*	-	-	-
O	5	-	1*	200*	-	-
P	3	-	-	-	2	1

* Reagentes adicionados após a etapa de digestão por micro-ondas

Os reagentes utilizados para as digestões foram escolhidos com base na literatura, sendo frequentemente utilizado ácido nítrico (NOGUEIROL et al., 2013; ABBRUZZINI et al., 2014; HERNÁNDEZ et al., 2014), misturado a outros ácidos e reagentes (VIEIRA et al., 2005; NEMATİ et al., 2010; OKORIE et al., 2010; NOGUEIROL et al., 2013; KUPPER et al., 2014). A muitas das misturas ácidas foram feitas adições de água para avaliar o desempenho dos ácidos diluídos (ARAÚJO et al., 2002; NÓBREGA et al., 2012).

Após o fechamento com tampas de TFM, os frascos foram posicionados no rack de 15 posições, que por sua vez era colocado dentro da SRC, que era travada e pressurizada com 40 bar de N₂. Esta pressurização permite realizar decomposições em pressões de até 199 bar e com temperaturas de até 250 °C, prevenindo projeção das misturas ácidas e reduzindo riscos de contaminação cruzada. A homogeneidade de temperatura aliada ao seu alto valor e à pressurização do sistema permite que amostras com características químicas distintas sejam digeridas simultaneamente, bem como é possível o uso de diferentes misturas ácidas nos frascos de digestão (MORAES et al., 2016).

Todas as misturas ácidas foram avaliadas seguindo um único programa de aquecimento proposto, descrito na Tabela 3. Os brancos de digestão foram constituídos por cada uma das misturas ácidas utilizadas, sempre presentes em cada rodada de digestão.

Tabela 3: Programa de aquecimento executado para digestão das amostras no forno de micro-ondas

Temperatura interna (°C)	Temperatura externa (°C)	Rampa (min)	Patamar (min)
140	60	05	03
180	60	05	03
210	60	04	20

*Após o fim da digestão, o sistema era resfriado a 50 °C e a pressão liberada a 10 bar min⁻¹

Os produtos de digestão foram transferidos para frascos de polipropileno, diluídos a 15 mL com água ultrapura, quando necessário, centrifugados e os sobrenadantes analisados por ICP OES.

3.3.2.2. *Determinações elementares por ICP OES*

Nas soluções das amostras digeridas foram realizadas determinações simultâneas de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, S, Se, V e Zn por espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

O ICP OES foi purgado com Ar durante aproximadamente 12 horas antes de cada uso, e foi otimizado de modo a garantir que o método utilizado nas determinações elementares fosse robusto, ou seja, com capacidade de suportar alterações na matriz da amostra sem alterar significativamente os resultados obtidos.

Para operar em condições robustas foi empregada a proposta de Mermet e Poussel (1995), a qual avalia a razão das intensidades das linhas de emissão iônica (280,270 nm) e atômica (285,213 nm) do magnésio (Mg (II)/ Mg (I)) de uma solução aquosa de 1,0 mg L⁻¹. Segundo esses autores, uma razão acima de 10 indica que as condições do ICP OES são robustas, ou seja, o equipamento está operando em condições energéticas e de temperatura suficientes para suportar pequenas variações na composição química das amostras (MERMET e POUSSEL, 1995).

Como foi utilizada tocha no modo axial, a razão de Mg (II)/ Mg (I) foi multiplicada por um fator de correção ($\epsilon=1,347$), com o propósito de corrigir desvios da ótica. Esta correção baseou-se no cálculo da razão dos valores de sinais de fundo (S_{fundo}) de ambas as linhas de Mg ($\epsilon = S_{\text{fundoMg(II)}}/S_{\text{fundoMg(I)}}$) (STEPAN, MUSIL et al. 2001). Os parâmetros instrumentais do ICP OES (Tabela 4) foram fixados de acordo com prévio trabalho desenvolvido no laboratório (KELMER, 2016).

Para as determinações de Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, S, Se, V e Zn foram selecionadas as linhas de emissão menos susceptíveis a interferências espectrais e com maiores intensidades, exceto para o Ca, K, Mg e Na,

para os quais foram selecionadas linhas de baixa intensidade de emissão devido ao alto intervalo de concentração esperado na amostra. As linhas escolhidas estão descritas na Tabela 4, juntamente com os parâmetros instrumentais otimizados do ICP OES.

Tabela 4: Parâmetros instrumentais utilizados nas medidas por ICP OES

Parâmetro		Valor
Potência de radiofrequência		1250 W
Gás do plasma		12 L min ⁻¹
Gás auxiliar		0,6 L min ⁻¹
Gás de nebulização		0,5 L min ⁻¹
Orientação da tocha		Axial
Nebulizador <i>Burgener MiraMist</i> [®]		
Linhas de emissão selecionadas (nm)		
Al(I) 309,271	Fe(II) 259,940	Pb(I) 216,999
As(I) 193,759	K(I) 769,896	S(I) 180,731
Ca(II) 318,128	Mg(I) 285,213	Se(I) 196,090
Cd(II) 226,502	Mn(II) 257,610	V(II) 309,311
Cr(II) 267,716	Na(I) 818,341	Zn(I) 213,856
Cu(I) 324,754	P(I) 177,495	

(I) Linha de emissão atômica e (II) linha de emissão iônica

As curvas analíticas de calibração foram preparadas a partir de diluições sucessivas das soluções analíticas de referência e combinadas em grupos: (i) Al, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, S, Zn; e (ii) As, Cd, Mn, Pb, Se, V de acordo com as concentrações e os contra íons, compondo uma solução multi-elementar na concentração de 100 mg L⁻¹ diluída sucessivamente em tubos de polipropileno, preparadas em cada um dos meios de digestão. Os intervalos de calibração

variaram de 1 a 80 mg L⁻¹ para os elementos do grupo *i*, enquanto que para o grupo *ii* o intervalo foi de 0,2 a 15 mg L⁻¹.

Para avaliar a exatidão do método, o erro relativo para a determinação elementar no CRM 029 foi calculado como descrito na Equação 1:

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{C_{\text{CRM}} - C_{\text{M}}}{C_{\text{CRM}}} \times 100\% \quad (1)$$

Onde, C_{M} é a concentração determinada pelo método proposto para o material de referência e C_{CRM} é a concentração certificada ou recomendada para o elemento no material utilizado.

Para avaliar a exatidão nas determinações dos elementos nas amostras, testes de adição e recuperação foram realizados adicionando-se em tubos de polipropileno 2 mL de solução da amostra e 1 mL de água ou solução multi-elementar utilizada na calibração, completando o volume para 5 mL com água ultrapura. A recuperação foi calculada segundo a Equação 2 (WELZ e SPERLING, 2008):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{AS}} - C_{\text{A}}}{C_{\text{S}}} \times 100\% \quad (2)$$

Onde, C_{AS} é a concentração encontrada na amostra à qual foi adicionada solução de concentração conhecida (*spike*), C_{A} é a concentração encontrada para a amostra e C_{S} é a concentração da solução adicionada.

Os limites de detecção (LD) para cada elemento, nos diferentes meios de ácidos utilizados, foram calculados com base na Equação 3, utilizando os desvios

padrões relativos (RSD) de dez medidas do branco analítico, a concentração equivalente à radiação de fundo (*Background Equivalent Concentration*, BEC) e a razão sinal/ruído (*Signal to Background Ratio*, SBR):

$$LD = \frac{3 \times BEC \times RSD}{100} \quad BEC = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad (3)$$

Onde, C_{sr} é a concentração de uma solução de referência, I_{sr} é a intensidade de emissão dessa solução e I_{branco} é a intensidade de emissão do branco. Para a determinação do limite de quantificação (LQ), o limite de detecção foi multiplicado por 10 (MONTASER, 1998; NAOZUKA et al., 2011).

3.3.2.3. *Análise de Componentes Principais (PCA) para escolha do procedimento de digestão*

A grande quantidade de misturas ácidas utilizadas para digestão da amostra de fertilizante orgânico no micro-ondas e o grande número de resultados gerados a partir das determinações dos elementos no ICP OES tornaram difícil a interpretação dos vários resultados sem a ajuda de ferramentas estatísticas. Assim, o uso de *Análise de Componentes Principais (Principal Components Analysis, PCA)* foi essencial para a escolha do melhor procedimento de preparo da amostra.

A PCA permite a redução do número de variáveis iniciais sem que haja perdas de informações. Nesta ferramenta, os dados são transformados em componentes não correlacionados (ou fatores), por combinações lineares das variáveis originais, como mostrado na Equação 4:

$$PC_{jk} = a_{j1}x_{k1} + a_{j2}x_{k2} + \dots + a_{jn}x_{kn} \quad (4)$$

Onde, PC_{jk} é o *score* (ou valor) de um objeto k em uma componente j , a_{j1} é o peso (ou *loading*) de uma variável 1 na componente j , x_{k1} é o valor medido da variável 1 no objeto k e n é o número total de variáveis. As diversas componentes principais (*PCs*) geradas são ortogonais entre si e, conseqüentemente, com a construção de gráficos que contenham duas ou três *PCs* será descrita uma distribuição espacial dos objetos. Assim, a PCA geralmente é utilizada para reconhecimento de padrões de similaridade entre objetos, logo, há grande aplicabilidade na otimização de métodos de análise química (KOKOT et al., 1992).

Para a escolha do procedimento de digestão, os resultados obtidos para os elementos foram comparados por PCA, utilizando cada resultado de concentração como uma variável. Após escolhido o procedimento, o mesmo foi utilizado para a digestão das amostras de fertilizante orgânico, substrato, condicionadores de solo e frações da amostra de fertilizante orgânico.

3.3.2.4. *Determinações elementares por GF AAS*

Os elementos As, Cd e Se nos digeridos foram analisados por espectrometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite (GF AAS) utilizando programa de aquecimento desenvolvido previamente no grupo (LEITE, 2015), descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Programa de aquecimento para o forno de grafite utilizado nas determinações de As, Cd e Se. Em todas as análises, o fluxo de Ar foi mantido a 1 L min⁻¹, apenas interrompido durante a etapa de atomização.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s⁻¹)	Patamar (s)
Secagem	130 ^{a,b,c}	10 ^{a,b,c}	20 ^{a,b,c}
Pirólise	1200 ^a , 600 ^b , 1000 ^c	107 ^a , 94 ^b , 87 ^c	20 ^{a,b} , 40 ^c
Atomização	2400 ^a , 1500 ^b , 2200 ^c	FP*	6 ^{a,c} , 5 ^b
Limpeza	2600 ^{a,b,c}	FP*	3 ^{a,b,c}

^aAs, ^bCd e ^cSe,

*FP = Full Power (aproximadamente 1800°C s⁻¹)

Para as determinações de Cd foi utilizado modificador químico com 5 µg Pd + 3 µg Mg, enquanto que para As e Se foi utilizado 20 µg Pd + 10 µg Mg. Alíquotas de 20 µL das amostras ou soluções analíticas foram co-injetadas no tubo de grafite com 10 µL de modificador químico.

As curvas analíticas de calibração foram preparadas a partir das soluções estoques, após diluições sucessivas em tubos de polipropileno, nos intervalos de concentração de 8 a 100 µg L⁻¹ para o As, 1 a 50 µg L⁻¹ para o Cd e 20 a 100 µg L⁻¹ para o Se.

Os limites de detecção foram calculados utilizando os desvios padrão de dez medidas do branco analítico, como descrito na Equação 5, sendo *SD* o desvio padrão das medidas e *a* o coeficiente angular da curva analítica de calibração:

$$LD = 3 \times \frac{SD}{a} \quad (5)$$

3.3.3. *Extrações sequenciais e de etapa única para fertilizante orgânico*

3.3.3.1. *Procedimento de extração do BCR e em etapa única*

A disponibilidade de elementos em solos e sedimentos pode ser avaliada por extrações de etapas únicas ou sequenciais. O procedimento do BCR (*Community Bureau of Reference*) para avaliação de bioacessibilidade e mobilidade de elementos apresenta quatro etapas de extração que auxiliam na identificação da associação dos elementos a diferentes frações da amostra (BACON e DAVIDSON, 2008).

Na Figura 7 pode ser observado um fluxograma com o procedimento de extração do BCR aplicado à amostra de fertilizante orgânico. Aproximadamente 1 g da amostra foi pesado diretamente em tubos de polipropileno com volume de 50 mL, e a ela adicionados diretamente cada um dos extratores.

Figura 7: Fluxograma das etapas de extração sequencial usando o procedimento do BCR. Cada solução extratora utilizada fornece diferentes informações sobre a mobilidade e a associação dos elementos a diferentes componentes da matriz.

A Etapa 1 representa a fração trocável em meio ácido e simula o efeito da chuva ácida, sendo nela extraídos os elementos mais móveis e bioacessíveis. A Etapa 2 representa a redução que ocorre após assentamento de uma coluna de sedimento, permitindo que sejam determinados os elementos que ficariam associados a óxidos de Fe e de Mn. A Etapa 3 representa a oxidação necessária

para lixiviar elementos associados a compostos orgânicos. A última etapa contém os elementos que apresentam as menores mobilidade e disponibilidade, estando fortemente associados à matriz.

Entre cada uma das etapas, os frascos de polipropileno foram centrifugados por 20 minutos, os sobrenadantes separados, adicionados 20 mL de água deionizada seguida de agitação por 15 minutos e nova centrifugação por 20 minutos (RAURET et al., 1999; BACON e DAVIDSON, 2008). A digestão da fração residual foi realizada utilizando o procedimento de digestão descrito na Seção 4.1.1.1.

Os procedimentos de extração em etapa única são utilizados para estudar mobilidade dos elementos e a influência de materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto menor o pH necessário para a extração do elemento, menos móvel ele está (AMIR et al., 2005) e quanto maior o pH utilizado, mais substâncias húmicas são extraídas, fornecendo também informações de associação dos elementos com estes compostos (STEVENSON, 1994).

Massas de aproximadamente 1 g de fertilizante orgânico foram pesadas diretamente em tubos de polipropileno e adicionados 40 mL dos seguintes extratores: (i) HNO_3 0,01 M; (ii) HCl 0,01 M; (iii) H_3CCOOH 0,01 M; (iv) H_2O ; e (v) NH_4OH 0,01 M. Os tubos foram agitados por 4 horas em mesa agitadora, posteriormente centrifugados por 15 minutos e os sobrenadantes analisados por espectrometria de absorção molecular, para determinações dos ácidos húmico e fúlvicos e por ICP-MS, para determinações dos elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn extraídos. Os resíduos dessas extrações foram digeridos utilizando o procedimento de digestão desenvolvido na Seção 4.1.1.1. e as soluções resultantes analisadas por ICP-MS.

3.3.3.2. Determinações elementares por ICP-MS

Com a expectativa de serem encontradas concentrações muito baixas dos elementos nos extratos, as determinações de Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn foram realizadas por ICP-MS. Esta técnica multi-elementar é muito mais sensível que o ICP OES, sendo muito adequada para as determinações dos elementos nos extratos (OLESIK, 1991; THOMAS, 2013).

Antes de cada análise, o equipamento foi calibrado com solução multi-elementar (contendo Li, Y, Ce, Mg, Tl e Co) fornecida pelo fabricante, em um procedimento denominado *Tuning*. Durante este procedimento, são ajustados parâmetros como a voltagem das lentes iônicas e do quadrupolo de modo que o máximo de íons de analito seja transportado através da interface até o detector, com o mínimo de perdas ao longo do trajeto. Para isso, a capacidade de detecção dos isótopos (^{24}Mg , ^{59}Co , ^{89}Y e ^{205}Tl) e de resolução (^7Li , ^{89}Y e ^{205}Tl) para os diferentes intervalos de massas é otimizada. Durante o *Tuning*, outros parâmetros do equipamento como potência refletida do plasma e voltagem aplicada ao detector são também otimizados. A melhor potência usada para manter o plasma é avaliada a partir da medida da razão de óxidos, monitorando a massa $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$, que deve ser menor que 1,2%.

Como padrão interno (*PI*) foram selecionados Ga para o Cr, Cu, Fe, Mn e Zn e Rh para o Pb, escolhidos por terem massas próximas as dos analitos e por serem elementos que não devem estar presentes na matriz de fertilizante orgânico. O uso de PI é de grande importância para análises quantitativas por ICP-MS, que por ser uma técnica muito sensível, qualquer alteração na introdução da amostra e transporte dos íons através da interface e ao longo do espectrômetro de massas

resultará em uma grande alteração no sinal analítico bruto. Tais alterações de introdução de amostra podem ser causadas pelo acúmulo lento e constante de componentes da matriz nos cones de amostragem e *skimmer*, alterando a taxa de amostragem dos íons (THOMAS, 2013).

Para a determinação elementar foram selecionados os isótopos dos analitos de maior abundância isotópica e livres de interferência isobárica, com o objetivo de obter a maior sensibilidade. Os isótopos de maior abundância para cada um dos elementos de interesse juntamente com as prováveis interferências poliatômicas estão listados na Tabela 6.

Tabela 6: Isótopos selecionados, suas abundâncias e principais interferentes poliatômicos

Isótopos (abundância %)	Interferências poliatômicas
^{52}Cr (83,7%)	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$
^{63}Cu (69,2%)	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$
^{56}Fe (91,7%)	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$
^{55}Mn (100%)	$^{39}\text{K}^{16}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}$
^{208}Pb (52,4%)	$^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}$
^{64}Zn (48,6%)	$^{32}\text{S}_2$

É possível observar que todos os elementos selecionados apresentam algum tipo de interferência poliatômica, sendo a mais crítica a formação de $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ para a determinação do Fe. Estas espécies interferentes são formadas principalmente pelo próprio gás do plasma ou ar atmosférico (formando íons poliatômicos contendo Ar, C, H, N e O), pelo uso de ácidos ou solventes (formando óxidos, hidróxidos ou espécies contendo C, N, S ou Cl), pelo uso de solução-tampão e sais ou ainda por componentes majoritários presentes na matriz (LUM e LEUNG,

2016). Assim, para utilizar o isótopo de maior abundância foi necessário recorrer ao uso da célula de colisão (*Octapole Reaction System, ORS⁴*), reduzindo o efeito de interferências poliatômicas.

No equipamento utilizado nesta pesquisa, a célula de colisão consiste em um sistema de octapolo que permite o uso de He ou H₂. Estes gases colidem tanto com íons de analito quando com íons de interferentes, porém como as espécies poliatômicas possuem maior área de seção transversal, estão mais propensas a este choque e, portanto, a perda de energia cinética. Assim, ajustando uma diferença de potencial abaixo da voltagem do quadrupolo há a transmissão de apenas íons do analito para o analisador de massas, pois os íons interferentes, com energia cinética mais baixa, não são transmitidos com o uso deste potencial menor, reduzindo então o efeito de interferências poliatômicas (THOMAS, 2013; LUM e LEUNG, 2016). Um desenho esquemático do funcionamento da célula de colisão está apresentado na Figura 8.

Figura 8: Desenho esquemático do funcionamento da célula de colisão. Antes da colisão, tanto o analito (no caso, $^{56}\text{Fe}^+$) quanto o interferente ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$) seguem o caminho para o analisador de massas. Após a colisão, há perda de energia cinética pelos íons que colidiram com o gás de colisão (He). Assim, apenas os analitos seguem para o analisador de massas, enquanto que os interferentes colidem com as barras do octapolo.

Assim, mesmo na presença de possíveis interferências poliatômicas, os isótopos de maior abundância foram selecionados para as determinações de Cr, Cu, Fe, Mn e Zn, sendo utilizada a célula de colisão para a atenuação de seus efeitos. Para a determinação de Pb, foi monitorado o isótopo de maior abundância e sem o uso da célula de colisão, já que a única possibilidade de interferência poliatômica é improvável na matriz estudada. Assim, é evitada a maior desvantagem do uso da célula de colisão, que é a perda de sensibilidade do analito, uma vez que há a colisão dos gases tanto com íons de analito quanto com íons de interferentes (LUM e LEUNG, 2016). As condições instrumentais e os isótopos selecionados para as determinações dos elementos estão descritos na Tabela 7.

As curvas analíticas de calibração foram preparadas a partir de diluições sucessivas das soluções analíticas de referência, compondo uma solução multi-elementar na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, diluída sucessivamente em tubos de polipropileno, preparadas em cada um dos meios de extração. Os extratos em meio de H_2O e NH_4OH foram acidificados com HNO_3 10% (v v^{-1}) até $\text{pH} = 1.5$ para a nebulização no ICP-MS. Os intervalos de calibração variaram de 0,5 a $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Como padrão interno, foi utilizada solução de Ga e Rh na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo introduzida por sistema de confluência simultaneamente à amostra. A razão sinal/sinal do padrão interno foi utilizada para a construção da curva de calibração e para determinação dos elementos nas amostras.

Tabela 7: Condições instrumentais para análise por ICP-MS

Parâmetro		Valor fixado
Potência de radiofrequência		1550 W
Gás do plasma		15 L min ⁻¹
Gás auxiliar		0,9 L min ⁻¹
Gás de nebulização		1,07 L min ⁻¹
Rotação da bomba peristáltica		0,1 rps
Profundidade de amostragem		15 mm
Fluxo de He na célula de colisão		10 mL min ⁻¹
Energia de discriminação da célula de colisão		7,0 V
Nebulizador concêntrico <i>MicroMist</i> ®		
Isótopos (m/z)		
⁵² Cr ⁺	⁶³ Cu ⁺	⁵⁶ Fe ⁺
⁵⁵ Mn ⁺	²⁰⁸ Pb ⁺	⁶⁴ Zn ⁺
⁷¹ Ga ⁺⁺	¹⁰³ Rh ⁺⁺	

* Padrão interno

Os limites de detecção foram calculados utilizando os desvios padrão propagados para dez medidas de cada uma das soluções de branco analítico, divididas pelo sinal de dez medidas de padrão interno, como descrito na Equação 6:

$$LD = 3 \times \frac{RSD_{\text{branco}/PI}}{a} \quad (6)$$

Onde, $RSD_{\text{branco}/PI}$ é o desvio padrão de dez medidas do branco analítico dividido pelo sinal obtido para o padrão interno, e a o coeficiente angular da curva analítica de calibração.

Para avaliar a exatidão nas determinações dos elementos nas amostras, testes de adição e recuperação foram realizados adicionando-se em tubos de polipropileno 2 mL de solução multi-elementar utilizada na calibração, 2 mL de

extrato, completando o volume para 5 mL com água ultrapura. A recuperação foi calculada segundo a Equação 2 (Seção 3.3.2.2).

3.3.4. *Análise de Especiação*

3.3.4.1. *Análise de especiação de Cr e Fe por XANES*

A espectrometria de absorção de Raios-X próximos à borda (*X-Ray Absorption Near Edge Structure*, XANES) é uma ferramenta para identificar, em escalas atômica e molecular, a estrutura de um elemento contido em um material. Pode ser aplicada não apenas a estruturas cristalinas, mas também a materiais que possuem pouco ou nenhum ordenamento de longo alcance, que é o caso de grande parte dos materiais biológicos e de parte da matriz de fertilizante orgânico (BUNKER, 2010).

A quantidade básica medida é o coeficiente de absorção $\mu(E)$ de Raios-X, que descreve quão fortemente esses raios são absorvidos como função da energia E dos raios-X. Geralmente $\mu(E)$ decresce à medida que a energia aumenta, ou seja, o Raios-X torna-se mais penetrante. Porém, em energias específicas que são características dos átomos no material, existem aumentos abruptos denominadas *bordas de absorção*, que correspondem aos valores das energias de ligação dos elétrons nas camadas eletrônicas de um dado elemento, sendo estas chamadas de borda K, borda L, etc. (BUNKER, 2010).

As técnicas de absorção de Raios-X são utilizadas em análise de especiação principalmente para determinar o estado de oxidação dos elementos e comprimento de ligação dos elementos em questão, sem que haja necessidade de

transformação da matriz, o que leva a um resultado muito próximo do real (BLUEMLEIN et al., 2008).

A região de XANES está compreendida na faixa de até 50 eV acima da borda de absorção, a qual apresenta variações estreitas e intensas da absorção. O espectro XANES trabalha na região onde o comprimento de onda do fotoelétron é da ordem das distâncias interatômicas e, portanto, o seu caminho livre médio é longo o suficiente para que possam ocorrer espalhamentos múltiplos antes que ele retorne ao átomo central. Dessa maneira, o espectro XANES envolve espalhamentos múltiplos e transições para níveis desocupados, sendo rico em informações cristaloquímicas do átomo absorvedor, como o estado de oxidação, a densidade de estados desocupados e a estrutura cristalina em que está inserido o átomo absorvedor (BUNKER, 2010).

Cromo e ferro foram medidos por XANES em pastilhas constituídas por 300 mg da amostra sem fracionamento e da fração menor que 300 μm , liofilizadas e moídas, e também de padrões de espécies de cada um dos elementos, conforme o programa de medida descrito na Tabela 8, sendo E_i a energia inicial da medida do espectro, E_f energia final, T medida realizada por transmitância e F por fluorescência.

Como referência de medida da borda, foram utilizadas folhas metálicas dos próprios elementos. Também foram utilizadas pastilhas preparadas com diversos sais e óxidos para cada elemento, de forma a obter os espectros para cada espécie química.

Tabela 8: Parâmetros utilizados nas medidas por XANES

Elemento (medida)	Amostra	E _i (eV)	E _f (eV)	Incrementos (eV)	Tempo de aquisição por ponto (s)
Cr (F)	Cr (folha),	5850	5970	5	1
	K ₂ Cr ₂ O ₇ , Cr ₂ O ₃ ,	5970	6115	0,3	2
	CrNO ₃	6115	6150	5	1
Cr (T)	Fertilizante orgânico e fração < 300 µm	5850	5970	5	1
		5970	6010	0,3	7
		6010	6115	0,3	5
		6115	6150	5	1
Fe (F)	Fe (folha), Fe ₂ O ₃ ,	6965	7080	5	1
	FeSO ₄ , FeO,				
	fertilizante	7080	7160	0,3	3
	orgânico e fração < 300 µm	7160	7300	5	1

F: medida realizada no modo de fluorescência e T: medida realizada no modo de transmitância

Foram utilizadas as bordas K dos elementos, a 5989 eV (Cr) e 7119 eV (Fe), cada amostra sendo medida em triplicata. Para o tratamento de dados, foi utilizado o software ATHENA, no qual os gráficos das replicatas foram normalizados em relação à referência de folha metálica e combinados de forma a obter um gráfico médio das replicatas.

3.3.4.2. Análise de especiação por SEC-ICP-MS

Na cromatografia por exclusão por tamanho (SEC) são utilizadas, no geral, colunas poliméricas que contém uma rede uniforme de poros e a separação ocorre a

partir das interações diferenciais dos componentes a serem separados com a coluna. As moléculas maiores terão tempos de retenção menores, pois são eluídas em primeiro momento, passam rapidamente através dos poros, enquanto que as menores ficam retidas por mais tempo (SKOOG, 2004). Não há interação física ou química do soluto com a coluna, ao contrário, elas são indesejadas, pois podem afetar o tempo de vida útil da coluna (SNYDER et al., 2011).

Assim, moléculas muito grandes eluem em um volume de fase móvel que corresponde o volume intersticial entre as partículas de fase estacionária (V_0), pois não interagem com os poros, enquanto que moléculas que são muito pequenas e interagem mais efetivamente com os poros eluem em um volume correspondente ao volume intersticial dos poros somado ao volume do sistema de poros (V_i). Moléculas com tamanhos intermediários interagem parcialmente com os poros, dependendo de seu peso molecular e sua geometria e eluem em um volume de retenção V_R que deve estar entre V_0 e V_0+V_i . Assim, o volume total de fase móvel ou volume morto é representado por $V_M = V_0 + V_i$. A extensão com a qual um soluto penetra no sistema de poros é governada pelo coeficiente de distribuição representado na Equação 7:

$$K_D = \frac{V_R - V_0}{V_i} \quad (7)$$

Onde, K_D é o coeficiente de distribuição, V_R é o volume de retenção, V_0 o volume intersticial e V_i o volume intersticial dos poros somado ao volume do sistema de poros.

Assim, moléculas muito grandes terão $K_D = 0$ e moléculas muito pequenas terão $K_D = 1$ (SNYDER et al., 2011). Pelo fato de ser difícil estimar o V_i , pela alta retenção e

difficuldade de identificação do pico molecular, muitas vezes é utilizado o coeficiente de distribuição relacionado ao volume de eluição do analito e volume total da fase móvel, como demonstrado na Equação 8 (NASCIMENTO, 2011):

$$K_{AV} = \frac{V_R - V_0}{V_M - V_0} \quad (8)$$

Onde, K_{AV} é o coeficiente de distribuição relacionado ao volume de eluição do analito, V_R é o volume de retenção, V_0 o volume intersticial e V_M o volume total de fase móvel.

Assim, a relação entre o peso molecular e o volume (ou tempo) de retenção é utilizada para estimar o peso molecular de um analito, e uma curva de calibração pode ser construída relacionando o logaritmo dos pesos moleculares de padrões pelo tempo de retenção (ou pelo volume de retenção), sendo linear entre os tempos correspondentes ao intervalo $V_0 - V_i$. Ainda, é importante frisar que a retenção é definida pelo raio hidrodinâmico das espécies, que pode variar com a hidratação e com a geometria molecular (SNYDER et al., 2011).

De modo a realizar a identificação de espécies elementares associadas a compostos orgânicos foi realizado o acoplamento do sistema de separação (no caso, o HPLC) com uma técnica de detecção elementar específica (no caso, o ICP-MS). Assim, foram obtidos quase simultaneamente o sinal de absorção molecular, relacionado aos compostos orgânicos separados chegando ao detector UV-Vis, e o sinal elementar associado a estes compostos orgânicos (Figura 9). Ao sobrepor os sinais obtidos por ambas as técnicas de detecção, é possível associar os elementos detectados às frações moleculares identificadas.

Figura 9: Desenho esquemático do acoplamento HPLC-ICP-MS

Para realizar a análise de especiação, a saída do detector UV-Vis do sistema de cromatografia líquida foi diretamente acoplada à bomba peristáltica que faz a introdução de amostra no ICP-MS, juntamente com solução de padrão interno introduzido por confluência. Para que isto fosse possível, a rotação da bomba peristáltica foi ajustada para 0,3 rps, de modo que a vazão de introdução de amostra fosse de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, a mesma utilizada para a cromatografia líquida.

Os parâmetros instrumentais do HPLC foram ajustados de modo que a pressão máxima de trabalho fosse de 18 bar, conforme especificado no manual da coluna Superdex[®] 75, e estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros instrumentais para a cromatografia de exclusão por tamanho e para a análise de especiação

Parâmetro	Valor Fixado
<i>HPLC</i>	
Fase móvel	Tampão fosfato pH = 7,4
Vazão da fase móvel	0,8 mL min ⁻¹
Detector UV-Vis (λ)	254 nm
Tempo de corrida	45 min
Volume da alça de amostragem	100 µL
<i>ICP-MS</i>	
Potência de radiofrequência	1550 W
Gás do plasma	15 L min ⁻¹
Gás auxiliar	0,9 L min ⁻¹
Gás de nebulização	1,27 L min ⁻¹
Rotação da bomba peristáltica	0,35 rps
Profundidade de amostragem	15 mm
Fluxo de He na célula de colisão	10 mL min ⁻¹
Energia de discriminação da célula de colisão	7,0 V
Nebulizador concêntrico <i>MicroMist</i> ®	
Isótopos (m/z)	
⁵² Cr ⁺	⁶³ Cu ⁺
⁵⁵ Mn ⁺	²⁰⁸ Pb ⁺
⁷¹ Ga ⁺⁺	¹⁰³ Rh ⁺⁺
⁵⁶ Fe ⁺	⁶⁴ Zn ⁺

*Padrão interno

O tampão utilizado como fase móvel foi preparado pela dissolução de 3,55 g de Na₂HPO₄ para um volume final de 1 L de solução, e a ele adicionado NaOH até pH = 7,4, filtrado em sistema com membrana de éster de celulose com 0,45 µm de porosidade e colocado em banho de ultrassom por 15 minutos para desgaseificação.

Para a determinação dos pesos moleculares das espécies, a coluna de exclusão por tamanho foi calibrada utilizando padrões de anidrase carbônica (29

kDa), ovoalbumina (43 kDa), albumina (66,4 kDa) e conalbumina (75 kDa), sendo utilizado o logaritmo do peso molecular *versus* o tempo de retenção. Blue dextran (2000 kDa) foi utilizado para cálculo do volume morto (V_0).

Para a determinação elementar, a detecção do ICP-MS foi realizada em modo transiente, sendo a curva analítica de calibração construída utilizando volumes fixos (200 μ L) de soluções multielementares com concentrações crescentes, aspirados de maneira intercalada diretamente para o ICP-MS. As concentrações foram calculadas a partir da área integrada dos picos dos analitos dividida pela área integrada dos picos do padrão interno. Os limites de detecção foram calculados como descrito na Equação 6 (Seção 3.3.3.2), porém utilizando o desvio padrão entre 10 medidas de área do branco, sendo utilizados 200 μ L de solução, sendo esta a fase móvel sendo injetada diretamente no ICP-MS, dividida pela área do padrão interno.

Foram realizadas as análises de especiação dos extratos de fertilizante orgânico e suas frações de tamanhos de partícula maiores e menores que 300 μ m em diferentes meios (HCl, H₂O e NH₄OH), bem como dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos do fertilizante orgânico.

3.3.4.3. *Extrações de ácidos húmicos e fúlvicos*

Ácidos húmicos (HAs) e fúlvicos (FAs) foram extraídos da amostra de fertilizante orgânico com base no procedimento sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) (SPARKS, 2003; BOLEA et al., 2006; LABORDA et al., 2008). Pelo fato de os HAs serem solúveis apenas em meio básico e os FAs serem solúveis em qualquer meio, este procedimento é baseado na

precipitação e dissolução de ambos os compostos, utilizando extratores básicos e precipitação de ácidos húmicos em meio ácido. O procedimento resumido está descrito na Figura 10.

Figura 10: Extração dos ácidos húmicos e fúlvicos das amostras de fertilizante orgânico e frações, seguindo o procedimento da IHSS.

Assim, massas de aproximadamente 6 g do fertilizante orgânico e de suas frações maior e menor que 300 μm foram pesadas diretamente em frascos de polipropileno, e a eles adicionados $\text{NaOH } 10^{-3} \text{ M}$, realizada de maneira exaustiva e solubilizando as HS presentes nas amostras. Os extratos obtidos foram acidificados com $\text{HCl } 10\% \text{ (v v}^{-1}\text{)}$ até pH 1, promovendo a precipitação dos HAs, sendo os FAs mantidos em solução. As fases foram separadas por centrifugação, transferidas para diferentes frascos e os HAs precipitados foram redissolvidos com a adição de $\text{NaOH } 1 \text{ M}$. Nos extratos obtidos foram realizadas determinações por espectrometria UV-Vis para comparação das razões entre as absorvâncias obtidas a 465 nm e 665 nm (razão E_4/E_6), de modo a avaliar o grau de humificação.

As soluções dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos por este procedimento foram injetadas no HPLC e seus pesos moleculares definidos conforme a calibração obtida para a coluna de SEC.

4. Resultados e discussões

4.1. Pré-tratamento e caracterização das amostras

O primeiro estudo feito neste trabalho foi a caracterização geral das amostras. Na Figura 11 está representado o gráfico de distribuição dos tamanhos de partícula, obtido com a medida da massa retida em cada peneira utilizada, em relação à massa total de amostra. Pode ser observado que três das quatro amostras estudadas continham cerca de 50% da massa formada por material com tamanho de partícula acima de 500 μm . O material retido na peneira de maior granulometria (> 500 μm) tenha aparência fibrosa, semelhante a cascas de plantas e raízes, indicando possível origem vegetal (Figura 12). As frações retidas nas peneiras de menor granulometria aparentavam maior homogeneidade e assemelhavam-se a solo e sedimento.

Figura 11: Distribuição de massa de material por fração de tamanho de partícula para as amostras.

Figura 12: Frações das amostras com tamanho de partícula $>500 \mu\text{m}$. Nota-se a heterogeneidade do material, e a presença de material vegetal não decomposto.

As análises de C e N revelaram que os teores de carbono das amostras secas variaram de 16 a 36%, enquanto que os teores de nitrogênio variaram de 0,42 a 1,22% (Tabela 10). Pode ser observado que o fertilizante orgânico, por apresentar apenas 36% de carbono total em sua composição, não era composto apenas por matéria orgânica, indicando enriquecimento com fração mineral, prática permitida por lei.

Tabela 10: Teor de carbono e nitrogênio e razão C/N nas diferentes amostras

Amostra	C (%)	N (%)	C/N
Fertilizante	36	0,62	58
Substrato	25	0,42	59
Condicionador 2505	16	0,56	29
Condicionador PT 300712-10	22	1,22	18

A razão C/N em solos e amostras de compostagem tem sido utilizada como parâmetro para a avaliação da maturidade de compostos, e quanto menor esta razão, maior o teor de humificação (KO et al., 2008; SCIUBBA et al., 2015). Isto ocorre, pois durante a ação bacteriana há a perda de carbono na forma de CO_2 ,

enquanto que o N permanece praticamente constante, na forma de amônia ou como nitrato, resultando em menores razões C/N quanto maior foi o tempo de compostagem. Além disso, os compostos nitrogenados têm um papel fundamental nas propriedades de complexação do fertilizante orgânico, pois conferem as propriedades de complexação aos ácidos húmicos e fúlvicos, afetando a mobilidade e bioacessibilidade de elementos (STEVENSON, 1994).

Os valores encontrados para a razão C/N indicam que os condicionadores de solo são muito mais humificados que o fertilizante e o substrato. De acordo com a literatura, valores de razão C/N entre 25 e 40 são comuns no início do processo de compostagem, e podem vir a ser maiores quanto maior a presença de material lignoso, que é menos susceptível à ação bacteriana (TUOMELA et al., 2000). Ainda, esta razão pode variar com a origem do material utilizado como fertilizante orgânico, com valores de cerca de 6,5 para lodo de esgoto, aproximadamente 20 para esterco, cerca de 40 para húmus de minhoca comercial e chegando até a ordem de 100 para resíduos de jardinagem (VIEIRA et al., 2005; FIALHO et al., 2010; INGELMO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014; SCIUBBA et al., 2015). Assim, pode-se dizer que o fertilizante orgânico utilizado apresenta alto teor da razão de C/N, sendo de baixo teor de humificação se comparado a outros materiais.

Ainda, os resultados da porcentagem de carbono das amostras foram levados em consideração para a escolha do material de referência certificado utilizado para o desenvolvimento do método de digestão, que no caso, foi o lodo de esgoto (CRM 029).

4.1.1. Determinação elementar total

4.1.1.1. Avaliação das misturas ácidas propostas

A eficiência das misturas ácidas, propostas na Tabela 2 (Seção 3.3.2.1), para digestão das amostras foi avaliada com base no erro relativo entre concentrações recomendadas e encontradas nas determinações dos elementos de interesse no material de referência certificado CRM 029.

As primeiras misturas testadas (Tabela 2, A a I) foram uma combinação de ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio, na presença ou ausência dos ácidos fluorídrico e bórico, em diferentes ordens de adição. O uso de ácidos diluídos traz diversas vantagens se comparado ao uso de ácidos concentrados, pois há menor consumo de reagentes, redução dos resíduos gerados e menores valores de branco analítico (NÓBREGA et al., 2012; BIZZI et al., 2014).

Durante a decomposição da matéria orgânica com HNO_3 em sistema fechado, há a liberação de NO, que na presença de O_2 (gerado na decomposição do H_2O_2) e vapor de água regenera o ácido nítrico, que por sua vez condensa e retorna à solução, segundo mecanismo demonstrado pelas reações de 1 a 3 (ARAÚJO et al., 2002; MORAES et al., 2016).

A digestão do CRM 029 com a mistura *A* (apenas ácido nítrico e peróxido diluídos) resultou em grande quantidade de sólido residual, indicando que parte do material não pôde ser efetivamente solubilizada. Na tentativa de diminuir o resíduo sólido, foram adicionados à mistura anterior 0,3 mL de ácido fluorídrico (mistura *B*), que reage com silicatos de acordo com as reações 4 e 5 (Krug, Nóbrega et al. 2016):

Foi observado que o resíduo persistiu, indicando que foi utilizado volume de reagente insuficiente para a solubilização ou ainda que pode ter havido a formação de fluoretos insolúveis com elementos presentes na amostra, como Al, metais alcalinos e alcalino-terrosos (MARGUI et al., 2005; VIEIRA et al., 2005).

Para eliminar o excesso de fluoretos, o ácido bórico foi adicionado antes (mistura *C*) ou depois (mistura *D*) do aquecimento assistido por micro-ondas, de forma a solubilizar fluoretos insolúveis, como descrito nas reações 6 e 7 (KRUG et al., 2016):

Ambos os procedimentos de digestão apresentaram dissolução parcial dos resíduos, então o volume de HF utilizado foi aumentado para 1 mL e testados nas misturas *E* (sem ácido bórico), *F* (com ácido bórico antes) e *G* (com ácido bórico depois). A mistura *E* apresentou um volume ainda maior de resíduo sólido do que

observado anteriormente, indicando que este aumento na quantidade de HF pode ter levado à maior precipitação de fluoretos insolúveis. Ambos os procedimentos F e G apresentaram evidente redução na quantidade de resíduo sólido.

Considerando a formação de SiF_4 volátil (Reação 5), também foi avaliada a adição de HF em sistema aberto, com ou sem a adição de H_3BO_3 , nas misturas *H* e *I*.

Todas as misturas ácidas avaliadas até então continham peróxido de hidrogênio, que gerava rapidamente uma espuma densa no momento que era adicionado sobre a amostra, como pode ser observado na fotografia da Figura 13.

Figura 13: Espuma formada com a adição de H_2O_2 à amostra de fertilizante orgânico, antes de iniciar o processo de aquecimento

O uso deste reagente tornou o preparo de amostra lento e laborioso, já que era necessária sua adição de forma muito lenta e sob agitação constante. Assim, todas as misturas ácidas que continham H_2O_2 foram novamente avaliadas sem a adição deste reagente (misturas *L* e *M*). A digestão do material também foi avaliada

com o uso de ácido nítrico concentrado, uma vez que sem o H_2O_2 a regeneração de HNO_3 poderia ser comprometida (misturas *J*, *K*, *N* e *O*).

A pequena quantidade de sólido residual observado com a combinação de HF e H_3BO_3 incentivou o uso de HBF_4 como reagente, já que este era um dos produtos formado no meio reacional (Reação 7). O HBF_4 apresenta vantagens em relação ao HF , pois também é uma fonte de fluoreto para dissolver silicatos, porém muito menos tóxico (SUCHAROVA e SUCHARA, 2006). Sendo assim, este ácido foi avaliado em combinação com o HNO_3 em mistura diluída (mistura *P*).

Após as determinações das soluções resultantes das digestões do CRM 029, usando todas as misturas ácidas propostas e o programa de aquecimento do forno de micro-ondas, calcularam-se os erros relativos relacionados às concentrações encontradas e aquelas recomendadas para os elementos de interesse (Tabela 11). Para efeito de comparação, estão relacionados na Tabela 11 apenas os elementos que puderam ser determinados com uma única diluição (volume final do digerido de 15 mL).

Tabela 11: Erro relativo determinado a partir das concentrações recomendadas e encontradas para o material de referência de lodo de esgoto (CRM 029), usando todos os procedimentos de digestão avaliados (A-P)

Elemento/ Procedimento	Al	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	P	Pb	S	V
	Erro relativo (%)										
A	+47	+8	+0	+20	-6	+4	+20	+3	+5	-28	-3
B	+11	+4	1	+25	-4	+9	+20	+7	+8	-16	+8
C	+56	-1	-6	+19	-9	+2	+16	+3	-1	-30	-5
D	+0	-13	-15	+5	-23	-7	+0	-5	-11	-35	-12
E	-47	-7	-6	+10	-17	-5	+10	+2	-2	-22	-2
F	+9	-7	-9	+12	-18	-1	+4	+4	-6	-31	-6
G	-32	-6	-8	+10	-16	-3	+2	+5	-4	-23	-4
H	+42	-10	-12	+13	-20	+3	+12	+7	-9	-80	-14
I	+40	-13	-12	+5	-22	+1	-1	+6	-9	-36	-17
J	+4	-6	-12	+8	-22	-8	+8	+3	-10	-51	-10
K	-74	-8	-11	-28	-22	-46	+6	-3	-10	-34	-8
L	-41	-6	-10	+11	-22	-41	+4	+1	-7	-31	-9
M	-79	-14	-15	+0	-24	-20	-9	-3	-12	-34	-11
N	-1	-54	-33	-13	-38	-25	-21	-22	-32	-50	-33
O	+7	-27	-28	-9	-33	-22	-14	-15	-27	-45	-30
P	+21	+7	-12	-2	+1	-17	-8	+8	+14	-4	-7

A grande quantidade de informação gerada pode levar a dúvidas na escolha do procedimento de digestão mais adequado, uma vez que para cada uma das 16 misturas ácidas utilizadas foram determinados 11 elementos na solução final, gerando uma matriz de 172 dados. Assim, para avaliar de forma conjunta quais as misturas ácidas forneceram os resultados de concentração que mais concordavam com os valores certificados, foi utilizada a análise de componentes principais (PCA).

Assim, transformando todas as 11 variáveis (recuperações de 11 elementos para os 16 procedimentos) em duas componentes principais (totalizando 85,2% da variância total), chegou-se ao gráfico de *scores* mostrado na Figura 14.

Figura 14: Gráfico de scores das duas primeiras componentes principais, PC1 e PC2, que representam 71,4 e 13,8% da variância total, respectivamente.

No gráfico de scores, além de representadas as diferentes misturas, há também um ponto *Target*, que descreve as condições de 0% de erro relativo. Logo, as misturas E, G, L e P apresentam os resultados mais similares aos valores certificados, demonstrado como o ponto *TARGET* na PCA. Pode-se observar que todos apresentam ácido nítrico diluído em sua composição e que o uso de peróxido é opcional, uma vez que procedimentos que não utilizaram este reagente, como L e P, apresentaram boas recuperações, com a vantagem de não proporcionarem formação de espuma e transporte de amostra ao longo do frasco de digestão.

Entre os procedimentos utilizando H_3BO_3 (G e L) pode-se observar que não há diferenças significativas para os resultados de determinação elementar quando a adição é feita antes ou depois do processo de digestão por micro-ondas; é preferível que esta adição seja feita antes, uma vez que assim não é necessário novo aquecimento para dissolução dos precipitados. O uso de ácido tetrafluorobórico (procedimento *P*) é uma alternativa ao procedimento *L*, substituindo o uso de $\text{HF} + \text{H}_3\text{BO}_3$ e mostrando bom desempenho, uma vez que foi o procedimento que obteve resultados mais próximos ao *Target*. Aos resultados obtidos com o procedimento de digestão *P* foi aplicado teste estatístico *t-Student* e nenhuma diferença significativa foi encontrada na comparação entre as concentrações determinadas e as recomendadas para o CRM 029 a um nível de confiança de 95%.

Ainda assim, é importante observar que procedimentos sem ácido bórico também apresentaram bons resultados (mistura *E*), porém a quantidade de material residual é muito maior, sugerindo que para outros elementos além dos avaliados a eficiência de digestão possa ter sido menor.

Desta forma, considerando a menor quantidade de material residual, a adição de um reagente a menos e a ausência de H_2O_2 , o procedimento *P* (2 mL $\text{HNO}_3 + 1 \text{ mL HBF}_4 + 2 \text{ mL H}_2\text{O}$) foi escolhido para o preparo de todas as amostras. As características analíticas do método proposto estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12: Características analíticas do método proposto visando determinações multielementares por ICP OES usando o procedimento de preparo de amostra (2 mL HNO₃ + 1 mL HBF₄ + 2 mL HNO₃) aplicado ao CRM 029 (n = 3).

Analito	Intervalo linear (mg L ⁻¹)	R ²	LD (mg kg ⁻¹)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)
Al	1 – 80	0,9956	0,4	1,24 ± 0,72*	1,38 ± 0,31*
As	0,2 – 15	0,9945	0,01	27,4 ± 2,8	29,3 ± 0,93
Ca	1 – 80	0,9985	0,01	4,84 ± 0,22*	4,39 ± 0,11*
Cd	0,2 – 15	0,9985	0,7	487 ± 17	427 ± 12
Cr	1 – 80	0,9993	0,002	345 ± 15	339 ± 10
Cu	1 – 80	0,9986	0,001	1100 ± 24	1114 ± 19
Fe	1 – 80	0,9988	0,007	2,07 ± 0,14*	1,71 ± 0,25*
K	1 – 80	0,9998	0,02	3400 ± 290	5074 ± 50
Mg	1 – 80	0,9995	0,001	8280 ± 342	7366 ± 264
Mn	0,2 – 15	0,9995	0,003	399 ± 14	365 ± 57
Na	1 – 80	0,9887	0,01	1650 ± 384	2548 ± 95
P	1 – 80	0,9872	0,01	2,17 ± 0,11*	2,34 ± 0,13*
Pb	0,2 – 15	0,9966	0,7	300 ± 12	341 ± 11
S	1 – 80	0,9920	0,001	1,36 ± 0,67*	1,13 ± 0,08*
Se	0,2 – 15	0,9941	0,1	25,4 ± 3,3	26,1 ± 1,0
V	0,2 – 15	0,9939	2,0	41,5 ± 2,5	38,6 ± 0,8
Zn	1 – 80	0,9993	0,02	1400 ± 34	1302 ± 30

4.1.1.2. Determinações dos elementos nas amostras por ICP OES

Nas amostras foram determinados diversos elementos de forma a conhecer melhor a composição química das matrizes das amostras, com os resultados apresentados na Tabela 13. As, Cd e Se tiveram concentrações abaixo dos limites de detecção do ICP OES, então foram determinados por GF AAS por métodos já estudados previamente pelo grupo, como será discutido na Seção 4.1.1.3.

Tabela 13: Concentrações dos elementos para cada amostra analisada, em mg kg⁻¹ e em *% (m m⁻¹) (n = 3).

Elemento	Fertilizante orgânico	Substrato	Condicionador 2505	Condicionador PT300712-10
Al*	1,5 ± 0,1	0,71 ± 0,1	1,3 ± 0,01	1,6 ± 0,03
As	< LD	< LD	< LD	< LD
Ca*	2,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	4,8 ± 0,5	0,65 ± 0,10
Cd	< LD	< LD	< LD	< LD
Cr	81,7 ± 6,0	378,9 ± 10,8	41,8 ± 2,1	73,3 ± 1,6
Cu	12,0 ± 0,6	30,8 ± 3,1	35,2 ± 1,5	27,4 ± 6,7
Fe*	1,5 ± 0,04	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,03	1,4 ± 0,1
K*	0,53 ± 0,01	1,1 ± 0,02	1,1 ± 0,04	1,1 ± 0,1
Mg*	0,24 ± 0,02	1,2 ± 0,2	0,50 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Mn	520 ± 18	940 ± 38	881 ± 23	475 ± 23
Na*	0,53 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,71 ± 0,03	0,11 ± 0,02
P*	0,78 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,77 ± 0,04	0,21 ± 0,01
Pb	59,1 ± 1,7	62,7 ± 2,2	71,0 ± 7,7	81,6 ± 0,6
S*	0,54 ± 0,04	0,32 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,09 ± 0,001
Se	< LD	< LD	< LD	< LD
V	42,3 ± 0,9	53,7 ± 1,7	48,8 ± 1,5	140,6 ± 10,5
Zn	211 ± 0,5	358 ± 26	179 ± 9	49,0 ± 2

(*: valores em % m m⁻¹)

Os elementos As, Cr, Cd e Pb apresentaram concentrações abaixo dos limites definidos na instrução normativa SDA N.º27/2006 (MAPA, 2006). Alguns elementos, como Fe, K, Mg, Mn, P e S, apresentaram concentrações equiparáveis ao material de referência. Entre as diferentes amostras, é possível notar que a maior parte dos elementos estava presente em quantidades similares, com exceção do Cr e do Zn, que estavam em concentrações maiores na amostra de substrato, assim como o Mn na amostra Condicionador 2505.

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados dos testes de adição e recuperação para as amostras. Pode-se observar que grande parte dos valores encontrados ficaram no intervalo de 80 a 120% indicando que não houve contaminações ou perdas significativas durante a análise.

Tabela 14: Resultados de recuperação para cada uma das amostras analisadas, digeridas com mistura de 3 mL HNO₃ + 2 mL H₂O + 1 mL HBF₄

Analito	Conc. adicionada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)			
		Fertilizante	Substrato	Condicionador 2505	Condicionador PT 300712-10
Al	5,0	127	102	111	111
As	1,0	108	106	107	115
Ca	10,0	122	109	128	92
Cd	2,0	98	95	95	98
Cr	4,0	94	92	88	93
Cu	5,0	104	103	102	105
Fe	10,0	107	96	102	108
K	10,0	93	78	84	88
Mg	4,0	109	93	97	138
Mn	2,5	89	90	93	102
Na	5,0	132	110	124	128
P	5,0	78	66	82	106
Pb	2,0	111	109	110	114
S	5,0	114	102	117	139
Se	1,0	114	111	110	109
V	1,0	97	93	95	100
Zn	4,0	106	99	102	105

Comparando os resultados de concentração obtidos para os elementos de interesse neste trabalho (Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) com dados literatura, é possível dizer que os valores estão dentro do esperado. A concentração destes elementos

em amostras de fertilizante orgânico varia com o tipo de matéria-prima que é utilizado para o preparo do mesmo, sendo valores de concentrações mais altos normalmente associados à lodo de esgoto e resíduos sólidos urbanos e mais baixo quando referentes à restos de jardinagem e esterco. Intervalos de concentração típicos para os elementos são de 5 a 211 mg kg⁻¹ para o Cr, 4,2 a 669 mg kg⁻¹ para o Cu, 311 mg kg⁻¹ a 4,3% para o Fe, 224 a 2015 mg kg⁻¹ para Mn, abaixo do limite de quantificação dos trabalhos até 365 mg kg⁻¹ para o Pb e de 26 a 6936 mg kg⁻¹ para o Zn (SMITH, 2009; NOGUEIROL et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014).

4.1.1.3. *Determinações dos elementos nas amostras por GF AAS*

Os resultados da determinação elementar por forno de grafite e os limites de detecção para cada elemento são apresentados na Tabela 15. É possível observar que mesmo utilizando uma técnica analítica com maior sensibilidade que o ICP OES o Se ainda estava abaixo do limite de detecção. Como já constatado na análise por ICP OES, todos os elementos estavam abaixo dos limites estabelecidos pela instrução normativa SDA 27/2006.

Tabela 15: Concentrações (mg kg⁻¹) para cada amostra analisada e limites de detecção para cada elemento (µg kg⁻¹) (n = 3).

	Fertilizante orgânico	Substrato	Condicionador 2505	Condicionador PT 300712-10	LD
As	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,4	3,5 ± 0,1	6,0 ± 1,0	0,6
Cd	0,015 ± 0,001	0,042 ± 0,008	0,009 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,002
Se	< LD	< LD	< LD	< LD	0,9

Arsênio e selênio, elementos que podem apresentar diversas formas químicas, estavam em concentrações muito baixas nas amostras analisadas, e, portanto, não foram objeto de estudo de fracionamento e análise de especiação neste trabalho.

Com os resultados obtidos para a caracterização geral da amostra foi possível observar que há características distintas, além da própria distribuição de massa, entre as diversas frações de tamanho de partícula. Assim, foi estudada a composição química destas frações. Também foi constatado que todos os contaminantes estavam abaixo dos limites definidos pela legislação. Também foi possível concluir que alguns dos micronutrientes apresentaram concentrações apreciáveis nas amostras, chegando a quase 2% (m m^{-1}) da amostra no caso do Fe e mais do que 100 mg kg^{-1} para o Mn e o Zn. Assim, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn foram investigados quanto à sua associação com diferentes frações da amostra, sejam elas físicas (como em diferentes tamanhos de partícula) ou químicas (como compostos inorgânicos ou orgânicos), bem como as espécies em que eles se encontram.

4.2. Determinações elementares nas frações com diferentes tamanhos de partículas

Como primeira estratégia de fracionamento elementar, foi realizado o fracionamento por tamanhos de partícula da amostra de fertilizante orgânico, utilizando as frações obtidas com o peneiramento, que também foram empregadas na caracterização geral da amostra (Seção 4.1).

Na Figura 15 está representado o gráfico mostrando as concentrações de C e N e a relação entre elas em função dos diferentes tamanhos de partículas. A porcentagem de carbono total é maior nas frações de partícula com tamanho acima de 400 μm e permanece constante em frações de tamanhos menores ($< 400 \mu\text{m}$ a 50 μm). Por outro lado, o nitrogênio se mantém praticamente constante, com ligeiro aumento na concentração nas frações com tamanhos de partículas menores. A razão C/N diminui gradualmente com a redução do tamanho de partícula, indicando que há presença de material orgânico mais humificado do que nas frações de maiores tamanhos de partícula.

Figura 15: Porcentagens de carbono e nitrogênio (eixo vertical à esquerda) e razão C/N (eixo vertical à direita) para cada fração de tamanho de partícula.

Todas as frações com seus respectivos tamanhos de partículas foram submetidas à digestão assistida por micro-ondas, utilizando a mistura 2 mL HNO_3 + 1 mL HBF_4 + 2 mL HNO_3 e o programa de aquecimento apresentado na Tabela 3. Os elementos Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Pb, S e Zn foram determinados por ICP OES, como descrito na Seção 4.1.1.2.

Os resultados das concentrações dos elementos para cada fração do fertilizante orgânico estão apresentados na Tabela 16. Os resultados indicam tendência de aumento da concentração elementar com a redução do tamanho de partícula, principalmente de elementos relacionados a componentes minerais, como Al, Fe, Mn e Zn. No geral, é possível observar que o somatório das porcentagem dos elementos é maior nas frações de menores tamanhos de partículas, variando de 6,3% m m^{-1} ($> 500 \mu\text{m}$) a 9,8% m m^{-1} ($< 50 \mu\text{m}$), indicando um aumento do caráter inorgânico dessas frações com menores tamanhos de partículas.

No entanto, comparando as concentrações encontradas para os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn com a razão C/N em cada uma das frações de tamanho de partícula (Figura 16) é possível observar uma tendência de aumento da concentração destes elementos com o aumento do teor de humificação (menor razão C/N). Sendo assim, é possível supor que estes elementos podem estar tanto associados a material húmico, na forma de complexos, quanto a frações inorgânicas da amostra.

Tabela 16: Concentrações de macro, micronutrientes e elementos potencialmente tóxicos em frações com diferentes tamanhos de partículas

Elemento	Fração de tamanho de partícula (µm)						
	> 500	500 - 400	400 - 300	300 - 200	200 - 100	100 - 50	< 50
Concentrações (mg kg ⁻¹)							
Al*	1,58 ± 0,34	1,21 ± 0,08	0,943 ± 0,074	1,18 ± 0,01	1,92 ± 0,12	1,76 ± 0,09	1,83 ± 0,10
Ca*	1,25 ± 0,02	1,30 ± 0,06	0,960 ± 0,027	1,32 ± 0,01	1,46 ± 0,07	1,31 ± 0,15	1,46 ± 0,09
Cr	11,9 ± 1,04	40,9 ± 3,2	25,8 ± 5,8	51,2 ± 18,1	62,8 ± 7,1	66,9 ± 5,7	86,5 ± 0,59
Cu	10,8 ± 0,7	21,2 ± 1,00	12,8 ± 2,1	19,0 ± 2,3	22,8 ± 1,9	21,9 ± 1,1	24,5 ± 0,8
Fe*	0,587 ± 0,048	0,973 ± 0,020	0,818 ± 0,220	1,20 ± 0,01	1,37 ± 0,03	1,40 ± 0,09	1,34 ± 0,03
Mg*	0,289 ± 0,010	0,172 ± 0,003	0,141 ± 0,049	0,183 ± 0,005	0,208 ± 0,005	0,202 ± 0,007	0,209 ± 0,11
Mn	70,4 ± 3,0	326 ± 54	257 ± 51	433 ± 62	508 ± 104	509 ± 111	528 ± 28
P*	0,328 ± 0,014	0,578 ± 0,093	0,464 ± 0,036	0,682 ± 0,167	0,825 ± 0,016	0,906 ± 0,006	1,00 ± 0,01
Pb	1,02 ± 0,08	4,95 ± 1,04	4,80 ± 0,12	9,35 ± 1,40	9,11 ± 1,38	10,7 ± 1,6	12,7 ± 1,4
S*	1,72 ± 0,01	2,44 ± 0,01	1,93 ± 0,02	2,50 ± 0,01	2,55 ± 0,01	2,46 ± 0,01	3,04 ± 0,01
Zn	32,3 ± 1,0	74,0 ± 3,8	31,5 ± 1,4	80,1 ± 5,1	108 ± 2	120 ± 11	143 ± 19

*%m m⁻¹

Figura 16: Gráfico mostrando as relações entre concentração de Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn (linhas) com a variação da razão C/N (barras) nos diferentes tamanhos de partículas para o fertilizante base orgânica.

Também é possível observar que há características distintas para as frações com tamanho de partícula > 300 e < 300 µm. Acima de 300 µm (> 500 µm a 300 µm) pode-se observar aumento da concentração dos elementos e tendência de queda na razão C/N; por outro lado, para tamanhos de partículas abaixo de 300 µm (300 µm a < 50 µm) pode-se observar que tanto as concentrações dos elementos como a razão C/N permanecem praticamente constante. Sendo assim, devido a esse comportamento distinto, essas duas frações de tamanhos de partículas (maior e menor que 300 µm) foram selecionadas para a análises de difração de Raios-X (Figura 17).

Figura 17: Difratogramas de Raios-X da amostra de fertilizante orgânico, fração de tamanho de partícula maior que 300 μm , e menor que 300 μm , comparadas ao padrão de quartzo.

O difratograma do fertilizante orgânico e suas frações foi comparado com diversos materiais que podem ser componentes do mesmo ou adicionados na fração mineral, como magnetita, dolamita, quartzo, hidrogenofosfato de amônio e potássio, anidrita e sulfato de potássio e cálcio hidratado. Dentre estes materiais avaliados, apenas foi reconhecida a presença de material amorfo e de quartzo, este segundo sendo o responsável pela dificuldade de dissolução da amostra, requerendo HF ou HBF_4 na mistura ácida para digestão assistida por micro-ondas.

Nos difratogramas da amostra de fertilizante orgânico e suas frações, é possível observar que apenas na amostra sem fracionamento e na fração de tamanho de partícula menor que 300 μm (Figura 17) são observados os picos

referentes à presença de quartzo. Assim, a presença deste material recalcitrante no fertilizante orgânico tem origem em suas frações de menor tamanho de partícula, corroborando os resultados observados na determinação elementar em cada tamanho de partícula, nos quais foi concluído que as menores frações de tamanho de partícula também apresentam composição de caráter mais inorgânico.

Com os resultados obtidos para o fracionamento por tamanho de partícula, foi possível observar que as maiores concentrações elementares são observadas nos menores tamanhos de partícula e também nas frações mais humificadas. Esses resultados concordam com a literatura para outros elementos potencialmente tóxicos e micronutrientes em fertilizantes orgânicos (MARCATO et al., 2008; XU et al., 2014). Sendo assim, devido as diferentes características observadas para as frações de tamanho de partícula maior do que 300 μm e menor que 300 μm , as mesmas foram selecionadas para os estudos posteriores de fracionamento por extrações sequenciais e de etapa única bem como para a especiação elementar.

4.3 Extrações sequenciais e de etapa única no fertilizante orgânico

As extrações sequenciais e de etapa única foram aplicadas ao fertilizante orgânico de modo a identificar as frações da matriz às quais os elementos estavam associados e avaliar a influência deste fracionamento na mobilidade em diferentes meios.

4.3.1. *Extração sequencial usando o método BCR*

O procedimento de extração sequencial do BCR foi aplicado à amostra de fertilizante orgânico e as frações com tamanhos de partículas maiores e menores que 300 µm. Nesses extratos e no digerido do sólido residual foram determinados os elementos Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn por ICP-MS.

As determinações dos elementos nas soluções extratoras foram feitas por ICP-MS, usando o Ga como padrão interno para Cr, Cu, Fe, Mn e Zn e Rh para Pb. Com o intuito de minimizar erros associados à matriz e, eventualmente, ao transporte da solução até o plasma, as soluções analíticas de calibração foram preparadas nos respectivos meios extratores, propostos pelo procedimento do BCR (ácido acético, hidroxilamina em meio de ácido clorídrico, acetato de sódio). As soluções analíticas de calibração para as determinações dos elementos no digerido da fração residual foram preparadas em meio contendo HNO_3 e HBF_4 na mesma concentração que a esperada nos digeridos diluídos.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 18, apresentados na forma de barras que mostram, para cada extrator, as porcentagens extraídas de cada elemento. Esses valores de porcentagens foram calculados em relação a concentração total, conforme os resultados apresentados nas Tabelas 13 e 16.

Figura 18: Resultados da extração sequencial BCR para o fertilizante orgânico e suas frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 µm. Os elementos estão distribuídos nas seguintes frações: □ Trocável (CH₃COOH), ■ Redutível (NH₂OH.HCl), ■ Oxidável (H₂O₂/CH₃COONa) e ▨ Residual (Digestão).

Na Figura 18 é possível observar que Cr, Cu, Fe e Pb não foram detectados na fração trocável (0,11 mol L⁻¹ de CH₃COOH) aplicada no fertilizante orgânico e tampouco nas frações de tamanhos de partículas maiores e menores que 300 µm,

indicando que esses elementos têm baixa mobilidade neste meio. Para o Cr, o Fe e o Pb, é possível observar que a parcela mais representativa é a referente à fração residual (digestão com HNO_3 e HBF_4), indicando que estes elementos estão fortemente associados à matriz. Para o Cr, é também possível observar que houve baixa extração relacionada à fração orgânica (menor do que $300\ \mu\text{m}$), entre 10 e 19%, porém um pouco maior que a fração redutível (menor que 8%), indicando que uma pequena parte deste elemento pode estar associada a compostos orgânicos. Para o Fe e o Pb tendência oposta foi observada, onde a maior extração ocorreu na fração redutível e não na fração orgânica, indicando que estes elementos podem estar mais associados a compostos minerais. Para o Fe, também é possível observar que para a fração de tamanho de partícula maior que $300\ \mu\text{m}$ houve maior extração desse elemento, que pode estar mais associado a óxidos e a matéria orgânica do que a fração menor que $300\ \mu\text{m}$, indicando que na fração mais humificada este elemento está ligeiramente menos disponível ao meio. Sendo assim, é possível concluir que o Fe, apesar da alta concentração presente no fertilizante estudado (quase 1%) tem baixa mobilidade.

Para o Cu, apesar de observada a mesma tendência do Cr de baixa extração em meio redutor, a porcentagem de material associado a compostos orgânicos foi muito alta, sendo maior que 50% no fertilizante sem fracionamento e na fração de tamanho de partícula maior que $300\ \mu\text{m}$, e de aproximadamente 25% na fração menor que $300\ \mu\text{m}$. Estes resultados permitem observar que o Cu está mais associado à matéria orgânica em um meio com baixa humificação, como observado pelas medidas de razão C/N (Figura 16). Já na fração de tamanho de partícula com menor razão C/N, apesar da concentração total deste elemento ser mais alta há menor mobilidade.

Manganês e zinco foram os elementos que demonstraram maior mobilidade, com porcentagem de extração na fração trocável (CH_3COOH) de até 54 e 34%, respectivamente. Para o Mn, o fertilizante sem fracionamento e a fração acima de 300 μm apresentaram porcentagens maiores de extração que a fração menor que 300 μm , indicando que quando associado a compostos menos humificados este elemento tem maior mobilidade. Já para o Zn foi observado que para a fração de tamanho de partícula menor que 300 μm há maiores porcentagens de extração, indicando que este elemento tem maior mobilidade na amostra de fertilizante orgânico quando associado a materiais altamente humificados ou com características mais inorgânicas. Ambos Mn e Zn também foram extraídos na fração redutível e pouco extraídos na fração oxidável, sendo também pouco presentes na fração residual.

Alguns balanços de massa não apresentaram resultados satisfatórios, indicando que o procedimento de digestão utilizado não foi adequado para a dissolução do resíduo. Conforme há os processos de extração sequencial do BCR há também uma pré-concentração de materiais mais refratários, como o quartzo identificado na difração de Raios-X (Seção 4.2) que ficam como resíduo no final do procedimento. Assim, o resíduo final é um material de matriz complexa e de difícil dissolução, e como a mistura ácida foi otimizada anteriormente com base na eficiência de digestão de material de lodo de esgoto e de fertilizante orgânico, não apresentou mesma eficiência em um material rico em compostos inorgânicos.

4.3.2. *Extrações em etapa única*

As extrações em etapa única foram realizadas de modo a avaliar a influência do tamanho de partícula na mobilidade dos elementos em meios extratores com diferentes pHs.

Os resultados obtidos para os procedimentos de extração em etapa única para cada um dos elementos nas duas frações de tamanho de partícula estão dispostos na Figura 19. A porcentagem extraída para cada elemento foi baseada na concentração total do respectivo elemento nas frações maiores e menores do que 300 μm (Tabela 16).

Figura 19: Porcentagens de extração dos elementos em cada meio extrator para o procedimento de etapa única. Os elementos foram determinados por ICP-MS

É possível observar que Cr, Cu, Fe e Pb praticamente não foram extraídos nos meios avaliados, cujos pHs variaram de 2,0 (HNO₃ e HCl) a 9,2 (NH₄OH), indicando pequena influência do pH na mobilidade de espécies desses elementos. É possível também observar que eles não estariam associados a

compostos facilmente dissolvidos, como carbonatos, nitratos e cloretos, como seria esperado para os extratores HNO_3 e HCl .

Manganês e zinco foram bastante extraídos em meio ácido, corroborando com os resultados de mobilidade observados no procedimento de extração sequencial do BCR. Novamente, a fração com tamanho de partícula maior do que 300 μm apresentou maior mobilidade para o Mn do que para o Zn. Também é possível observar que a extração com HNO_3 foi mais eficiente do que com HCl , sendo o primeiro mais eficiente para extração de material associado à matriz mineral por apresentar características mais oxidantes.

Comparando com os resultados obtidos pela extração sequencial do BCR, é possível confirmar que Cr e Pb estão fortemente associados à fração mineral do fertilizante orgânico, como observado com as altas concentrações associadas a óxidos de Fe e Mn e ao material residual, sendo elementos pouco móveis no ambiente e pouco bioacessíveis (Figura 20). Já o cobre, apesar de majoritariamente associado à matéria orgânica, não é móvel no ambiente, como observado para os resultados de extração em fase única.

O Fe, apesar de ter apresentado baixos resultados na forma de eficiência de extração, demonstrou valores que chegam à ordem de 60 mg kg^{-1} para extração em meio de NH_4OH . Foi possível observar que com a redução do tamanho de partícula há menor mobilidade deste elemento, bem como há aumento desta propriedade quanto mais básico o meio, indicando que espécies de Fe associadas à material húmico são mais móveis. Esta característica será mais bem discutida nos estudos de especiação posteriores.

Na Tabela 17 estão apresentadas as características analíticas para os procedimentos de extração sequencial do BCR e de etapa única.

Tabela 17: Características analíticas do método para ICP-MS para as diferentes calibrações adotadas visando determinações dos elementos nos extratos relativos a ambos os procedimentos empregados

Elemento	Meio extrator	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	todos	1 – 50	1 – 30	1 – 100	1 – 100	1 – 20	1 – 50
R^2	H ₃ CCOOH	0,996	1,000	0,998	1,000	1,000	0,998
	NH ₂ OH.HCl	0,995	0,999	0,997	0,999	1,000	1,000
	AcONa	1,000	0,999	0,999	1,000	0,999	0,993
	HNO ₃	1,000	1,000	0,998	0,999	1,000	0,998
	HCl	0,994	0,999	0,997	0,999	1,000	1,000
	H ₂ O	1,000	1,000	0,998	0,999	1,000	0,998
	NH ₄ OH	1,000	1,000	0,998	0,999	1,000	0,998
LD (ng L ⁻¹)	H ₃ CCOOH	0,05	0,13	0,12	0,04	0,03	0,53
	NH ₂ OH.HCl	0,01	0,04	0,12	0,04	0,05	0,10
	AcONa	0,06	0,06	0,23	0,07	0,12	1,06
	HNO ₃	0,14	0,53	1,11	0,18	0,32	0,32
	HCl	0,03	0,10	0,95	0,04	0,11	2,91
	H ₂ O	0,22	0,20	0,33	0,10	0,10	0,81
	NH ₄ OH	0,12	0,22	2,84	0,16	0,10	0,86

Nesse estudo, além da determinação dos elementos, foi de interesse também avaliar a influência do pH na extração de ácido orgânico, por exemplo, ácido húmico. Desta forma, para os extratores HCl, H₂O e NH₄OH avaliou-se a possível presença de ácido húmico por meio da espectrofotometria de absorção molecular.

Os resultados das varreduras por espectrometria de absorção molecular entre 200 e 800 nm, indicam que há maior extração de substâncias húmicas com o aumento de pH, comparando os resultados obtidos para os meios extratores (HCl, H₂O e NH₄OH), com os espectros de absorção de duas concentrações diferentes de

ácido húmico comercial, preparados em água (Figura 20). Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que a solubilidade de substâncias húmicas é maior em meio básico (STEVENSON, 1994; SHIRSHOVA et al., 2006).

Figura 20: Espectros de absorção molecular obtidos para: A - extratos de fertilizante orgânico em diferentes meios (HCL, H₂O E NH₄OH) e B - soluções de ácido húmico comercial em diferentes concentrações

O espectro UV-Vis de ácidos húmicos e fúlvicos varia com a origem da substância e serve como um indicativo de diferentes graus de humificação. O meio de análise pode influenciar o espectro, visto que há alterações no grau de

dissociação dos grupos carboxílicos e fenólicos (TSUTSUKI e KUWATSUKA, 1979). A absorvidade molar de ácidos húmicos tende a aumentar com o tamanho da molécula, porcentagem de C, grau de condensação e razão de carbonos em estruturas aromáticas por estruturas alifáticas (BLOOM e LEENHEER, 1989). Espectros semelhantes foram obtidos por outros autores, com o mesmo padrão monótono de decréscimo da absorvência com o aumento do comprimento de onda, e um ombro por volta de 280 – 300 nm (SCIUBBA et al., 2015).

A razão E_4/E_6 (razão entre as absorvências obtidas para os comprimentos de 465 e 665 nm, respectivamente) é muito utilizada para indicar o grau de humificação, sendo menor com aumento do peso molecular e grau de condensação das moléculas. Assim, valores frequentemente encontrados para esta razão estão abaixo de 5 para ácidos húmicos, enquanto que para ácidos fúlvicos geralmente estão por volta de 6,0 a 8,5 (STEVENSON, 1994). Esta razão também varia com a concentração do ácido húmico, sendo então apenas um dos parâmetros utilizados para avaliar a extração de substâncias húmicas.

Os espectros de absorção foram obtidos para todos os extratores utilizados na etapa única (HNO_3 , HCl , CH_3COOH , H_2O e NH_4OH) e resultados para a razão E_4/E_6 estão apresentados na Tabela 18. Os resultados mostram que quanto mais básico o meio, maiores os valores obtidos, indicando que há uma extração mais eficiente de ácidos húmicos quanto maior o pH, corroborando dados da literatura. Logo, esta razão pode não apenas ser utilizada para estimativa do teor de humificação de uma amostra, mas também para avaliar a eficiência de extração de ácidos húmicos por determinado meio extrator.

Tabela 18: Razões E_4/E_6 para extratos de fertilizante orgânico em diferentes meios e também para soluções de ácido húmico (HA) em diferentes concentrações

HNO ₃	HCl	AcOH	H ₂ O	NH ₄ OH	HA 10 mg L ⁻¹	HA 100 mg L ⁻¹
1,5	1,5	1,5	1,4	3,7	2,9	6,8

Trabalhos anteriores correlacionam maiores teores de humificação, seja em solos ou compostagem, com menor mobilidade e disponibilidade de micronutrientes e contaminantes (GREENWAY e SONG, 2002; INGELMO et al., 2012; NOGUEIROL et al., 2013; XU et al., 2014), sendo os resultados obtidos com a amostra de fertilizante orgânico em concordância com a literatura.

Assim, com os estudos de mobilidade por fracionamento usando diferentes soluções extratoras foi possível observar que todos os elementos estudados foram menos móveis na fração de tamanho de partícula menor que 300 μm , ou seja, estão mais fortemente associados à matriz quando na presença de material mais humificado ou de caráter mais inorgânico.

Com base nos estudos anteriores pode-se observar que o Cr é um elemento que demonstrou baixa mobilidade, enquanto que Mn e Zn demonstraram alta mobilidade, sendo encontrados principalmente nas frações trocáveis e de óxidos da amostra de fertilizante. O Cu também demonstrou baixa mobilidade, provavelmente por estar associado à matéria orgânica, indicando que este tipo de material contribui para sua fixação no solo (INGELMO et al., 2012; CHOTPANTARAT et al., 2015). Fe e Pb estavam bastante associados à fração de óxidos e à fração residual, demonstrando baixa mobilidade nos meios estudados. Apesar de as porcentagens de extração terem sido baixas, indicando baixa mobilidade dos elementos, em termos das concentrações absolutas vale a investigação para a especiação desses elementos.

4.4. Análise de especiação

4.4.1. Análise de Especiação de Cr e Fe por XANES

As análises por XANES da amostra sem fracionamento e da fração < 300 μm foram realizadas com o objetivo de observar se haveriam diferentes espécies de Fe e Cr em cada uma das frações devido às suas diferentes composições e características. Os espectros obtidos para o fertilizante e sua fração com tamanho de partícula menor que 300 μm foram comparados a espectros adquiridos para padrões de várias espécies de Cr ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, Cr_2O_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), e de Fe (Fe_2O_3 , FeO , FeSO_4).

Como observado nas Figuras 21 e 22 os elementos avaliados estavam presentes em apenas um estado de oxidação (Cr^{III} e Fe^{III}), sendo os mesmos tanto para o fertilizante sem fracionamento quanto para a fração < 300 μm .

Figura 21: Espectros de XANES das amostras de fertilizante não fracionado e fração menor que 300 μm , correlacionado ao Cr^{III}

Figura 22: Espectros de XANES das amostras de fertilizante não fracionado e fração menor que 300 μm , correlacionado ao Fe^{III}

Assim, não houve influência da presença da proporção tanto dos materiais orgânicos humificados quanto do material inorgânico na distribuição das espécies destes elementos nos diferentes tamanhos de partículas avaliados.

Apesar destes elementos não apresentarem diferentes estados de oxidação em cada fração, a associação de micronutrientes e contaminantes com compostos orgânicos ou inorgânicos da matriz pode afetar a sua mobilidade ou disponibilidade, o que foi avaliado com as extrações em diferentes meios.

4.4.2. *Análise de Especificação por HPLC-ICP-MS*

Na amostra de fertilizante orgânico sem fracionamento foram realizadas extrações em etapa única dos ácidos húmicos e fúlvicos, e procedeu-se um estudo de especificação para identificar possíveis interações desses ácidos com os elementos de interesse (Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn). Os extratos obtidos foram injetados numa coluna cromatográfica de exclusão por tamanho para separação das espécies

moleculares e posterior determinação elementar por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (SEC-ICP-MS).

4.4.2.1. Calibração da coluna de exclusão por tamanho e caracterização dos ácidos húmicos e fúlvicos

A calibração da coluna de exclusão por tamanho foi realizada para estimar os pesos moleculares dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos da amostra de fertilizante orgânico e suas frações de tamanho de partícula, bem como de outras possíveis substâncias presentes nos extratos.

Na calibração, representada na Figura 23, pode ser observado que a linearidade obtida é satisfatória, com um coeficiente de determinação de 0,933. A SEC está entre as técnicas mais utilizadas para estimar pesos moleculares, juntamente com SDS-PAGE e espectrometria de massas, sendo uma opção menos laboriosa que a primeira e com menores custos que a segunda (SNYDER et al., 2011). Dentre as vantagens da SEC estão a alta recuperação cromatográfica, uma vez que não há interação química de solutos com a fase estacionária, e o uso de gradiente de fase móvel isocrático, que é muito mais conveniente (SNYDER et al., 2011). O volume morto encontrado, representado pela eluição de Blue Dextran foi de 6,7 minutos. Compostos que apresentarem tempos de retenção próximos a este são considerados como fora do intervalo de trabalho da coluna e apresentam peso molecular acima de 70 kDa.

Figura 23: Curva de calibração para SEC, correlacionando pesos moleculares e seus respectivos tempos de retenção, obtida para substâncias de diferentes pesos moleculares.

Os cromatogramas obtidos para os ácidos húmicos e fúlvicos isolados pelo procedimento recomendado pela IHSS, utilizando extrações em meio básico e ácido (Seção 3.3.4.3), juntamente com o cromatograma obtido pela injeção de padrão de lignina, estão apresentados na Figura 24. A lignina também foi uma substância avaliada por sua capacidade de complexação com metais e por estar presente nas possíveis matérias primas do fertilizante orgânico, participando do processo de formação dos ácidos húmicos e fúlvicos.

Figura 24: Cromatogramas (detecção a 254 nm) obtidos para os ácidos húmicos (HA) e fúlvicos (FA) extraídos da amostra de fertilizante com o procedimento da IHSS, e de padrão de lignina.

Todas as soluções foram preparadas na concentração de 4 mg mL⁻¹. O gráfico foi construído utilizando as medidas de absorbância normalizada, uma vez que os três compostos estudados apresentaram diferentes valores de absorbância para o comprimento de onda de 254 nm, selecionado para as medidas no detector do cromatógrafo.

É possível observar que, para as condições de separação utilizadas neste estudo, ácidos húmicos e fúlvicos apresentaram regiões de sobreposição de seus cromatogramas, entre 22,5 e 30 minutos. Apesar disso, é possível identificar os picos que representam cada um destes compostos sem a necessidade de tratamentos químicos ou matemáticos, como a análise de deconvolução utilizada por Laborda et al. (2008) que obtiveram uma resolução pior para a separação das duas substâncias. Desta forma, pode-se supor que os elementos possivelmente ligados a essas substâncias (ácidos húmicos ou lignina) e que forem identificados nesta

região de tempo de retenção do cromatograma não seriam devidamente identificados como associados a um ou outro destes compostos.

É importante destacar que o processo de extração de ácidos húmicos e fúlvicos da amostra de fertilizante orgânico recomendado pela IHSS não pode ser utilizado para trazer informações sobre especiação elementar. O uso de condições drásticas de pH pode promover a interconversão de espécies, formação de hidróxidos insolúveis e ainda afetar a capacidade de complexação das substâncias húmicas, o que pode levar a resultados precipitados (SZPUNAR, 2000; TEMPLETON et al., 2000).

Com os cromatogramas obtidos, foi possível estimar o peso molecular das substâncias húmicas extraídas da amostra de fertilizante orgânico, sendo eles de **34 kDa** para os ácidos húmicos e de **17 kDa** para os ácidos fúlvicos, com tempos de retenção característicos de **16 minutos** e **31 minutos**, respectivamente (Figura 24). Vale ressaltar que ácidos húmicos e fúlvicos não apresentam um peso molecular definido, e sim, um intervalo de pesos moleculares (STEVENSON, 1994). Técnicas como *freezing-point depression* (medida do abaixamento do ponto de congelamento de determinado solvente na presença de um soluto) e medida de pressão osmótica permitem o cálculo de uma média de peso molecular pela estimativa de moléculas em solução, enquanto que espalhamento de luz e sedimentação em ultracentrífuga geram resultados de média de peso molecular em função dos pesos moleculares dos componentes do material coloidal. Cada uma das técnicas pode gerar um resultado diferente, e ainda devem ser levadas em considerações as condições experimentais, como pH, força iônica e concentração, já que o estado de agregação das moléculas afeta o resultado obtido (STEVENSON, 1994).

Os cromatogramas que mostram os perfis moleculares (Figura 25) indicam a presença, principalmente, de ácidos húmicos ou lignina nos extratos de fertilizante orgânico, com sinais mais intensos conforme há o aumento do pH do meio extrator. Também é possível observar que os sinais são mais intensos para a fração de tamanho de partícula $> 300 \mu\text{m}$, indicando que em um meio menos humificado e com mais características orgânicas a extração ocorre em maior extensão que em um meio mais humificado e mais inorgânico. Também é possível observar picos de compostos que foram eluídos no tempo morto, indicando que há a presença de substâncias com peso molecular maior do que 70 kDa sendo extraídos. Os picos referentes aos ácidos fúlvicos não foram identificados, embora esta classe de compostos exista na amostra de fertilizante orgânico, como observado na Seção 4.3.2. Assim, pode-se pensar em duas possibilidades, sendo a primeira a menor absorvidade molar dos ácidos fúlvicos frente aos ácidos húmicos para o comprimento de onda de 254 nm, como já discutido anteriormente, ou ainda a baixa eficiência de extração, indicando que estes compostos podem estar fortemente associados à matriz.

Figura 25: Cromatogramas (detecção a 254 nm) obtidos para os diferentes extratos, nas diferentes frações de tamanho de partícula

4.4.2.2. Determinação elementar por SEC-ICP-MS

Os extratos em meio de ácido nítrico, água e hidróxido de amônio para as frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 µm foram injetados na alça de amostragem com volume de 100 µL do cromatógrafo. No mesmo instante em que foi dado o início à corrida cromatográfica também foi acionada a detecção por ICP-MS. Assim, foram obtidos os sinais molecular e elementar simultaneamente, com um tempo de atraso de 45 segundos entre os sinais, referente ao comprimento da conexão entre o HPLC e o ICP-MS.

Nos cromatogramas obtidos com a detecção por ICP-MS não foi observado sinal de Cr em nenhuma das condições experimentais, em nenhuma das frações de

tamanho de partícula. Assim, há fortes indícios que este elemento está fortemente associado à matriz na forma de Cr^{III} , como observado pela análise por XANES (Seção 4.4.1).

O Zn também não foi observado em nenhum cromatograma, embora tenha apresentado porcentagens de extração de até 24% com HNO_3 em etapa única para a fração $< 300 \mu\text{m}$. Assim, pode-se dizer que este elemento foi extraído em grande parte como espécies iônicas. A associação de Zn à fração orgânica da matriz, como observado no procedimento do BCR, não permite que este elemento seja móvel e/ou extraível.

Para o Cu é possível observar que este elemento está associado apenas a ácidos húmicos ou lignina, como pode ser observado nas Figuras 26 e 27, de acordo com o tempo de retenção dos picos observados. Reforçando os resultados obtidos nas extrações de etapa única, quanto maior o pH mais eficientemente este elemento é extraído, o que foi confirmado com os resultados de especiação. Embora os picos sejam bem definidos, não foi possível realizar a quantificação, pois as áreas encontradas estavam abaixo do LQ (Tabela 19).

Figura 26: Cromatogramas de SEC-ICP-MS para o Cu, extraído da fração de fertilizante orgânico maiores que 300 μm , em meio de HNO_3 , H_2O e NH_4OH .

Figura 27: Cromatogramas de SEC-ICP-MS para o Cu, extraído da fração de fertilizante orgânico menores que 300 μm , em meio de HNO_3 , H_2O e NH_4OH .

Para o Fe e para o Pb não foram observados picos nos extratos em meio de HNO_3 e H_2O , indicando que o pouco que estes elementos são extraídos neste meio está na forma iônica e não puderam ser diferenciados da linha-base do cromatograma. O Fe, presente como íon trivalente como observado pela análise por XANES, está associado à matriz majoritariamente em compostos refratários, óxidos e compostos orgânicos, como concluídos das extrações sequenciais do método

BCR, assim como o Pb. Para os extratos em meio de NH_4OH (Figuras 28 para o Fe e 29 para o Pb) é possível observar que estes elementos estão associados tanto a compostos de peso molecular maior do que 70 kDa, sendo este o único pico observado na fração menor que 300 μm , e a ácidos húmicos ou lignina, na fração de tamanho de partícula maior do que 300 μm .

Figura 28: Cromatogramas SEC-ICP-MS para o Fe em extração em meio de NH_4OH , nas frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 μm .

Figura 29: Cromatogramas SEC-ICP-MS para o Pb em extração em meio de NH₄OH, nas frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 µm.

O Mn, no procedimento de extrações por etapa única, foi mais bem extraído quanto menor o pH do meio. Na análise de especiação (Figura 30), este elemento foi observado apenas em meio de HNO₃ em pico de intensidade muito baixa, sugerindo que há espécies de Mn associadas a ácidos fúlvicos. Porém, em meio de HNO₃, a extração deste elemento foi de 46% para a fração com tamanho de partícula maior que 300 µm e de 18% para a fração com tamanho de partícula maior que 300 µm, sugerindo que grande parte deste elemento esteja na forma iônica e não interage com a coluna, sendo apenas diluído durante a passagem da fase móvel e se confundindo com a linha-base do cromatograma.

Figura 30: Cromatogramas SEC-ICP-MS para o Mn em extração em meio de HNO₃, nas frações de tamanho de partícula maior e menor que 300 µm.

Embora tenham sido identificados picos para vários elementos durante a análise de especiação, não foi possível realizar a quantificação em nenhum dos casos, visto que todas as áreas de pico ficaram abaixo dos limites de detecção. As outras figuras de mérito para o método estão descritas na Tabela 19. As curvas analíticas de calibração foram construídas utilizando volumes fixos de soluções multielementares, aspirados de maneira intercalada diretamente para o ICP-MS, realizando as medidas em modo transiente. As concentrações foram calculadas a partir da área integrada dos picos dos analitos dividida pela área integrada dos picos do padrão interno. Os limites de detecção foram calculados considerando massas de 1 g de amostra em 40 mL de solução, e o intervalo linear em função da massa de analito introduzida na alça de amostragem com volume de 100 µL.

Tabela 19: Características analíticas do método para a análise de especiação por HPLC-ICP-MS

Elemento	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R²	LD (mg L^{-1})
Cr	20-200	0,9988	43
Cu	30-200	0,9869	106
Fe	20-200	0,9955	104
Mn	30-200	0,9979	110
Pb	20-200	0,9972	51
Zn	20-200	0,9978	589

Assim, é possível dizer que com o método proposto foi possível identificar os elementos que estavam associados à ácidos húmicos e fúlvicos. Também foi possível identificar que Fe, Pb e Cu foram encontrados mais associados à ácidos húmicos e compostos com peso molecular maior do que 70 kDa, enquanto que Mn foi identificado associado a ácidos fúlvicos. Pb e Zn não foram identificados associados à compostos orgânicos em nenhum meio de extração. Apesar de terem sido observados os picos, não possível realizar a quantificação, o que leva à conclusão que a maior parte das espécies móveis destes elementos estão na forma de íons livres, e não associados à matéria orgânica.

5. Conclusões

Os estudos permitiram que fossem obtidas informações sobre a composição de fertilizante orgânico, substrato e condicionadores de solos ainda não exploradas para insumos orgânicos brasileiros. De maneira geral, a pesquisa contribuiu para o desenvolvimento de métodos que permitiram a determinação elementar total de nutrientes e potenciais contaminantes, bem como obter informações sobre o comportamento da amostra e das espécies químicas dos elementos, tendo sido discutidos métodos de preparo de amostra e análise química.

O uso da Análise de Componentes Principais foi muito importante para facilitar a identificação do melhor método para digestão das amostras, uma vez que o número de variáveis geradas foi muito grande. Na avaliação de diferentes métodos de digestão das amostras, concluiu-se que a mistura de 3 mL HNO_3 + 2 mL H_2O + 1 mL HBF_4 foi a mais recomendada. Cabe ressaltar que o ácido tetrafluorobórico não é frequentemente utilizado para o preparo de amostras, porém, neste trabalho foi demonstrado o seu potencial, além de ter gerado os melhores resultados apresenta menor toxicidade que o ácido fluorídrico e dispensa o uso de H_3BO_3 .

O fertilizante orgânico foi caracterizado em relação à distribuição dos elementos em diferentes tamanhos de partícula, sendo os micronutrientes e contaminantes estudados (Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) encontrados em maiores concentrações quanto menor o tamanho de partícula. Também foi observada menor razão C/N para as menores frações, indicando que estes elementos estão presentes em maiores concentrações quanto mais humificada ou mais mineral é a fração. Sendo assim, concluiu-se que o fracionamento por tamanho de partícula, relacionando teor de humificação e composição elementar, permitiu uma avaliação

mais detalhada, possibilitando melhor entendimento da interação dos fertilizantes com solos e fertilizantes minerais em futuros estudos.

Os elementos também apresentaram tendência de menor mobilidade e bioacessibilidade quanto menor o tamanho de partícula, sendo mais fortemente ligados à matriz quando havia maior proporção de material inorgânico ou de material orgânico mais humificado, como observado com o procedimento do BCR. As extrações em etapa única com diferentes pHs indicaram que os elementos estão pouco móveis, visto que apenas Mn e Zn foram quantitativamente lixiviados.

Na análise de especiação por HPLC-ICP-MS, foram isolados os ácidos húmicos e fúlvicos presentes na matriz de fertilizante orgânico por procedimento da IHSS. Extrações da amostra em diferentes pHs foram realizadas para observar a interação dos metais com as substâncias húmicas. Ferro, chumbo e cobre foram encontrados mais associados à ácidos húmicos e compostos com peso molecular maior do que 70 kDa, enquanto que Mn foi identificado associado a ácidos fúlvicos.

6. Referências

ABBRUZZINI, T. F. et al. Influence of digestion methods on the recovery of iron, zinc, nickel, chromium, cadmium and lead contents in 11 organic residues. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 1, p. 166-176, 2014. ISSN 0100-0683.

AGAZZI, A.; PIROLA, C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. **Microchemical journal**, v. 67, n. 1, p. 337-341, 2000. ISSN 0026-265X.

AIKEN, G. et al. **Humic substances in soil, sediment and natural waters**: John Wiley and Sons: New York 1985.

AMIR, S. et al. Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. **Chemosphere**, v. 59, n. 6, p. 801-810, 2005. ISSN 0045-6535.

ANDARA, A. R.; ESTEBAN, J. L. Transition of particle size fractions in anaerobic digestion of the solid fraction of piggery manure. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 3, p. 229-235, 2002. ISSN 0961-9534.

ARAÚJO, G. C. et al. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 2121-2132, 2002. ISSN 0584-8547.

BACON, J. R.; DAVIDSON, C. M. Is there a future for sequential chemical extraction? **Analyst**, v. 133, n. 1, p. 25-46, 2008.

BARIN, J. S. et al. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J. e ROCHA, F. R. P. (Ed.). **Métodos de Preparo de amostra para análise elementar**. São Paulo: SBQ, 2016. cap. 9, p.279-312.

BARTL, B.; HARTL, W.; HORAK, O. Long-term application of biowaste compost versus mineral fertilization: Effects on the nutrient and heavy metal contents of soil and plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 165, n. 2, p. 161-165, 2002. ISSN 1522-2624.

BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource technology**, v. 100, n. 22, p. 5444-5453, 2009. ISSN 0960-8524.

BIZZI, C. A. et al. Effect of simultaneous cooling on microwave-assisted wet digestion of biological samples with diluted nitric acid and O₂ pressure. **Analytica chimica acta**, v. 837, p. 16-22, 2014. ISSN 0003-2670.

BLOOM, P.; LEENHEER, J. Vibrational, electronic, and high-energy spectroscopic methods for characterizing humic substances. **Humic substances II. John Wiley**, p. 409-446, 1989.

BLUEMLEIN, K. et al. Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC-ICP-MS and LC-ES-MS/ICP-MS with XANES/EXAFS in analysis of *Thunbergia alata*. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 390, n. 7, p. 1739-1751, 2008. ISSN 1618-2642.

BOLEA, E. et al. Multielement characterization of metal-humic substances complexation by size exclusion chromatography, asymmetrical flow field-flow fractionation, ultrafiltration and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: A comparative approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, n. 2, p. 236-246, 2006. ISSN 0021-9673.

BRADL, H. **Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation**. Academic Press, 2005. ISBN 008045500X.

BRADL, H. B. Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 277, n. 1, p. 1-18, Sep 2004. ISSN 0021-9797.

BUNKER, G. **Introduction to XAFS: a practical guide to X-ray absorption fine structure spectroscopy**. Cambridge University Press, 2010. ISBN 1139485091.

CAI, Y. et al. Assessment of arsenic mobility in the soils of some golf courses in South Florida. **Science of the total environment**, v. 291, n. 1, p. 123-134, 2002. ISSN 0048-9697.

CAMPITELLI, P.; CEPPI, S. Chemical, physical and biological compost and vermicompost characterization: A chemometric study. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 90, n. 1, p. 64-71, 2008. ISSN 0169-7439.

CHIN, Y.-P.; GSCHWEND, P. M. The abundance, distribution, and configuration of porewater organic colloids in recent sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 55, n. 5, p. 1309-1317, 1991. ISSN 0016-7037.

CHOTPANTARAT, S. et al. Effects of humic acid amendment on the mobility of heavy metals (Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, and Zn) in gold mine tailings in Thailand. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 8, n. 9, p. 7589-7600, 2015. ISSN 1866-7511.

CUELLO, S. et al. Complementary HPLC-ICP-MS and synchrotron X-ray absorption spectroscopy for speciation analysis of chromium in tobacco samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 9, p. 1818-1829, 2016.

DE LA CALLE, I. et al. Ultrasound-assisted single extraction tests for rapid assessment of metal extractability from soils by total reflection X-ray fluorescence. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 202-209, Sep 2013. ISSN 0304-3894.

DIAS, B. D. O. et al. Infravermelho na caracterização de ácidos húmicos de latossolo sob efeito de uso contínuo de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 885-894, 2009. ISSN 0100-0683.

DOUBLET, J. et al. Distribution of C and N mineralization of a sludge compost within particle-size fractions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1254-1262, 2010. ISSN 0960-8524.

FANG, K. et al. Effect of environmental factors on the complexation of iron and humic acid. **Journal of Environmental Sciences**, v. 27, p. 188-196, 2015. ISSN 1001-0742.

FAO. Fertilizer Use to Surpass 200 Million Tonnes in 2018. 2015. Disponível em: < <http://www.fao.org/news/story/en/item/277488/icode/> >. Acesso em: 22 de fevereiro de 2016

FARENHORST, A.; BRYAN, R. Particle size distribution of sediment transported by shallow flow. **Catena**, v. 25, n. 1-4, p. 47-62, 1995. ISSN 0341-8162.

FARRELL, M.; JONES, D. Critical evaluation of municipal solid waste composting and potential compost markets. **Bioresource technology**, v. 100, n. 19, p. 4301-4310, 2009. ISSN 0960-8524.

FIALHO, L. L. et al. Characterization of organic matter from composting of different residues by physicochemical and spectroscopic methods. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 1927-1934, 2010. ISSN 0960-8524.

FIOROTO, A. M. **Estudo de métodos para avaliar biodisponibilidade de Fe, Cu e Zn em presença de mesocarpo de babaçu**. 2013. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GÓMEZ-MUÑOZ, B. et al. Carbon mineralization and distribution of nutrients within different particle-size fractions of commercially produced olive mill pomace. **Bioresource technology**, v. 102, n. 21, p. 9997-10005, 2011. ISSN 0960-8524.

GONG, C. et al. Characterization of the particle size fraction associated heavy metals in tropical arable soils from Hainan Island, China. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 139, p. 109-114, 2014. ISSN 0375-6742.

GREENWAY, G. M.; SONG, Q. J. Heavy metal speciation in the composting process. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 4, n. 2, p. 300-305, 2002.

HARGREAVES, J.; ADL, M.; WARMAN, P. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 123, n. 1, p. 1-14, 2008. ISSN 0167-8809.

HERNÁNDEZ, T. et al. Towards a more sustainable fertilization: Combined use of compost and inorganic fertilization for tomato cultivation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 196, p. 178-184, 2014. ISSN 0167-8809.

HINDMARSH, J. T.; MCCURDY, R. F.; SAVORY, J. Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 23, n. 4, p. 315-347, 1986. ISSN 1040-8363.

INGELMO, F. et al. Influence of organic matter transformations on the bioavailability of heavy metals in a sludge based compost. **Journal of environmental management**, v. 95, p. S104-S109, 2012. ISSN 0301-4797.

INGHAM, E. Columns-Soil View-Making A High Quality Compost Tea Part II. **BioCycle-Journal of Composting and Recycling**, v. 40, n. 4, p. 94-94, 1999. ISSN 0276-5055.

JANOŠ, P.; KŘÍŽENECKÁ, S.; MADRONOVÁ, L. Acid–base titration curves of solid humic acids. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, n. 1, p. 242-247, 2008. ISSN 1381-5148.

JIMÉNEZ, M. S.; GÓMEZ, M. T.; CASTILLO, J. R. Multi-element analysis of compost by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1141-1148, 2007. ISSN 0039-9140.

JOKUBAUSKAITE, I. et al. High-performance liquid chromatography (HPLC)-size exclusion chromatography (SEC) for qualitative detection of humic substances and dissolved organic matter in mineral soils and peats in Lithuania. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 95, n. 6, p. 508-519, 2015. ISSN 0306-7319.

KATZ, S.; SALEM, H. The Biological and Environmental Chemistry of Chromium, VCH, New York, 1994. 1995.

KELMER, G. A. R. **Propostas de métodos para determinações de As, Cd, Cr (III), Cr (VI), Hg, Ni, Pb e Se em fertilizantes minerais por AAS e ICP OES**. 2016. (Tese de Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KINGSTON, H. M.; HASWELL, S. J. **Microwave enhanced chemistry: fundamentals, sample preparation and applications**. Washington, DC: American Chemical Society, 1997.

KO, H. J. et al. Evaluation of maturity parameters and heavy metal contents in composts made from animal manure. **Waste Management**, v. 28, n. 5, p. 813-820, 2008. ISSN 0956-053X.

KOKOT, S. et al. MICROWAVE DIGESTION - AN ANALYSIS OF PROCEDURES. **Analytica Chimica Acta**, v. 259, n. 2, p. 267-279, Apr 1992. ISSN 0003-2670.

KRUG, F. J. et al. Solubilização e decomposição de sólidos inorgânicos. In: KRUG, F. J. e ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostra para análise elementar**. São Paulo: SBQ, 2016. cap. 7, p.225-252.

KULIKOWSKA, D. et al. Humic substances from sewage sludge compost as washing agent effectively remove Cu and Cd from soil. **Chemosphere**, v. 136, p. 42-49, 2015. ISSN 0045-6535.

KUPPER, T. et al. Heavy metals in source-separated compost and digestates. **Waste Management**, v. 34, n. 5, p. 867-874, 2014. ISSN 0956-053X.

LABORDA, F. et al. A speciation methodology to study the contributions of humic-like and fulvic-like acids to the mobilization of metals from compost using size exclusion chromatography–ultraviolet absorption–inductively coupled plasma mass spectrometry and deconvolution analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 1, p. 1-8, 2008. ISSN 0003-2670.

LABORDA, F. et al. Study of the size-based environmental availability of metals associated to natural organic matter by stable isotope exchange and quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry coupled to asymmetrical flow field flow fractionation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 27, p. 4199-4205, 2011. ISSN 0021-9673.

LAPIDO-LOUREIRO, F. E.; MELAMED, R.; NETO, J. F. **Fertilizantes – agroindústria e sustentabilidade**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

LEITE, D. P. **Estudo de métodos para a determinação de As, Cd, Pb, Cr e Se em fertilizantes base orgânica por AAS e ICP OES**. 2015. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LE MOS, R. D.; SANTOS, R. D. **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996.

LJUNG, K. et al. Metal and arsenic distribution in soil particle sizes relevant to soil ingestion by children. **Applied Geochemistry**, v. 21, n. 9, p. 1613-1624, 2006. ISSN 0883-2927.

LOUBNA, E. F. et al. Efficiency of co-composting process to remove genotoxicity from sewage sludge contaminated with hexavalent chromium. **Ecological Engineering**, v. 82, p. 355-360, 2015. ISSN 0925-8574.

LU, D. et al. Speciation of Cu and Zn during composting of pig manure amended with rock phosphate. **Waste management**, v. 34, n. 8, p. 1529-1536, 2014. ISSN 0956-053X.

LUM, T.-S.; LEUNG, K. S.-Y. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 5, p. 1078-1088, 2016.

BRASIL. **Decreto 4954/2004** 2004. Disponível em: < <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTemáticaPortal&codigoTemática=1265013/> >. Acessado em 16 de Junho de 2017.

MAPA. **Instrução normativa SDA 27/2006** 2006. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-27-de-05-06-2006-alterada-pela-in-sda-07-de-12-4-16-republicada-em-2-5-16.pdf/> >. Acessado em 16 de Junho de 2017.

MARCATO, C. E. et al. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2340-2348, 2008. ISSN 0960-8524.

MARGUI, E. et al. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, n. 1-2, p. 197-204, Sep 2005. ISSN 0003-2670.

MERMET, J. M.; POUSSEL, E. ICP EMISSION SPECTROMETERS - 1995 ANALYTICAL FIGURES OF MERIT. *Applied Spectroscopy*, v. 49, n. 10, p. A12-A18, Oct 1995. ISSN 0003-7028.

MILESTONE. 2017. Disponível em: <
<http://www.milestonesrl.com/en/microwavedigestion/ultrawave/features.html#a1> >.
 Acesso em: 24 de maio de 2017

MONTASER, A. **Inductively coupled plasma mass spectrometry**. John Wiley & Sons, 1998. ISBN 0471186201.

MORAES, D. P. et al. Preparo de amostras assistido por radiação micro-ondas. In: KRUG, F. J. e ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: SBQ, 2016. cap. 10, p.315-372. ISBN 978-85-64099-18-0.

NAGAJYOTI, P.; LEE, K.; SREEKANTH, T. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010. ISSN 1610-3653.

NAOZUKA, J. et al. Elemental analysis of nuts and seeds by axially viewed ICP OES. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1667-1672, 2011. ISSN 0308-8146.

NASCIMENTO, A. N. D. **Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg, Zn em castanha de caju (Anacardium Occidentale)**. 2011. (Tese de doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NEELIMA, P.; REDDY, K. Interaction of copper and cadmium with seedling growth and biochemical responses in solanum melongena. **Nature, Environment and Pollution Technology**, v. 1, n. 3, p. 285-290, 2002. ISSN 0972-6268.

NEMATİ, K. et al. Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. **Journal of hazardous materials**, v. 182, n. 1, p. 453-459, 2010. ISSN 0304-3894.

NICOLÁS, C.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Organic amendments as strategy to increase organic matter in particle-size fractions of a semi-arid soil. **Applied soil ecology**, v. 57, p. 50-58, 2012. ISSN 0929-1393.

NÓBREGA, J. et al. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, v. 98, p. 272-276, 2012. ISSN 0039-9140.

NOGUEIROL, R. C. et al. Concentrations of Cu, Fe, Mn, and Zn in tropical soils amended with sewage sludge and composted sewage sludge. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 4, p. 2929-2938, 2013. ISSN 0167-6369.

OKORIE, A.; ENTWISTLE, J.; DEAN, J. R. The optimization of microwave digestion procedures and application to an evaluation of potentially toxic element contamination on a former industrial site. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1421-1425, 2010. ISSN 0039-9140.

OLESIK, J. W. Elemental analysis using ICP-OES and ICP/MS. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 12A-21A, 1991. ISSN 0003-2700.

PEMBA, A. G. et al. Cyclic and spirocyclic polyacetal ethers from lignin-based aromatics. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 3214-3221, 2014.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, v. 75, p. 57-134, 2002. ISSN 0065-2113.

PINHEIRO, G. L. et al. Ácidos orgânicos de baixa massa molar em solos e materiais orgânicos. **Quim. Nova**, v. 36, n. 3, p. S1, 2013.

PROVENZANO, M. R. et al. Assessment of maturity degree of composts from domestic solid wastes by fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopies.

Journal of agricultural and food chemistry, v. 49, n. 12, p. 5874-5879, 2001. ISSN 0021-8561.

QIN, J.; NWORIE, O. E.; LIN, C. Particle size effects on bioaccessible amounts of ingestible soil-borne toxic elements. **Chemosphere**, v. 159, p. 442-448, 2016. ISSN 0045-6535.

RAPOSO, J. C. et al. Determination of humic substances in sediments by focused ultrasound extraction and ultraviolet visible spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 128, p. 26-33, 2016. ISSN 0026-265X.

RAURET, G. et al. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 1, n. 1, p. 57-61, 1999.

RESENDE, L. V.; NASCENTES, C. C. A simple method for the multi-elemental analysis of organic fertilizer by slurry sampling and total reflection X-ray fluorescence. **Talanta**, v. 147, p. 485-492, 2016. ISSN 0039-9140.

RICHTER, R. C.; LINK, D.; KINGSTON, H. M. Microwave-enhanced chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 30A-37A, Jan 2001. ISSN 0003-2700.

RODELLA, A. A. Regulation of contaminant contents in fertilizers: a case study. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 5, p. 797-801, 2005. ISSN 0100-0683.

RUTKOWSKA, B. et al. Soil micronutrient availability to crops affected by long-term inorganic and organic fertilizer applications. **Plant Soil Environ**, v. 60, p. 198-203, 2014.

SAGER, M. Trace and nutrient elements in manure, dung and compost samples in Austria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1383-1390, 2007. ISSN 0038-0717.

SANTOS, D. et al. Tratamentos Preliminares. In: KRUG, F. J. e ROCHA, F. R. P. (Ed.). **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: SBQ, 2016. cap. 4, p.103-136.

SATISHA, G.; DEVARAJAN, L. Effect of amendments on windrow composting of sugar industry pressmud. **Waste management**, v. 27, n. 9, p. 1083-1091, 2007. ISSN 0956-053X.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, n. 11, p. 487-498, 1995. ISSN 0028-1042.

SCIUBBA, L. et al. Relationships between stability, maturity, water-extractable organic matter of municipal sewage sludge composts and soil functionality. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 17, p. 13393-13403, 2015. ISSN 0944-1344.

SEMLALI, R. M. et al. Estimating distributions of endogenous and exogenous Pb in soils by using Pb isotopic ratios. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 21, p. 4180-4188, 2001. ISSN 0013-936X.

SENESI, G. S. et al. Elemental Composition Analysis of Plants and Composts Used for Soil Remediation by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 42, n. 6, p. 791-798, 2014. ISSN 1863-0669.

SHARIFI, Z.; RENELLA, G. Assessment of a particle size fractionation as a technology for reducing heavy metal, salinity and impurities from compost produced by municipal solid waste. **Waste Management**, v. 38, p. 95-101, 2015. ISSN 0956-053X.

SHIRSHOVA, L. T.; GHABBOUR, E. A.; DAVIES, G. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. **Geoderma**, v. 133, n. 3, p. 204-216, 2006. ISSN 0016-7061.

SHON, H.; VIGNESWARAN, S.; SNYDER, S. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 36, n. 4, p. 327-374, 2006. ISSN 1064-3389.

SIGEL, A.; SIGEL, H. **Metal Ions in Biological Systems: Volume 34: Mercury and its Effects on Environment and Biology**. CRC Press, 1997. ISBN 0824798287.

SKOOG, D. A. **Fundamentals of analytical chemistry**. Grupo Editorial Norma, 2004. ISBN 0030355230.

SMITH, S. R. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. **Environment international**, v. 35, n. 1, p. 142-156, 2009. ISSN 0160-4120.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011. ISBN 1118210395.

SOUZA JUNIOR, I. G. D. et al. Contribuição dos constituintes da fração argila de solos subtropicais à área superficial específica e à capacidade de troca catiônica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1355-1365, 2007. ISSN 0100-0683.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. Academic press, 2003. ISBN 0080494803.

STADTMAN, E.; OLIVER, C. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. **J Biol Chem**, v. 266, n. 4, p. 2005-2008, 1991. ISSN 0021-9258.

STEVENSON, F. Humus Chemistry, J. **Wiley&Sons, NY**, 1982.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. John Wiley & Sons, 1994. ISBN 0471594741.

STEWART, C.; SULLIVAN JR, J. Hazardous Materials Toxicology-Clinical Principles of Environmental Health. **Edited by JB Sullivan, Jr., GR Krieger**, p. 986, 1992.

SUCHAROVA, J.; SUCHARA, I. Determination of 36 elements in plant reference materials with different Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry: comparison of microwave digestions assisted by three types of digestion mixtures. **Analytica chimica acta**, v. 576, n. 2, p. 163-176, 2006. ISSN 0003-2670.

SUTHERLAND, R. A. Lead in grain size fractions of road-deposited sediment. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 2, p. 229-237, 2003. ISSN 0269-7491.

SZPUNAR, J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. **Analyst**, v. 125, n. 5, p. 963-988, 2000.

TEIXEIRA, L. S. et al. Fast determination of trace elements in organic fertilizers using a cup-horn reactor for ultrasound-assisted extraction and fast sequential flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 119, p. 232-239, Feb 2014. ISSN 0039-9140.

TEMPLETON, D. M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). **Pure and applied chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000. ISSN 1365-3075.

THAYER, J. S. Global Bioalkyl hit ion of the Heavy Elements. **Metal Ions in Biological Systems: Volume 29: Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives**, v. 29, p. 1, 1993. ISSN 0824790227.

THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners**. CRC press, 2013. ISBN 1466555432.

TORRECILLAS, C. et al. Study of the organic fraction in biosolids. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 44, n. 1-4, p. 492-501, 2013. ISSN 0010-3624.

TSUTSUKI, K.; KUWATSUKA, S. Chemical studies on soil humic acids: VII. pH-Dependent nature of the ultraviolet and visible absorption spectra of humic acids. **Soil science and plant nutrition**, v. 25, n. 3, p. 373-384, 1979. ISSN 0038-0768.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000. ISSN 0960-8524.

UNCETA, N. et al. Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1097-1111, 2010. ISSN 1618-2642.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. **Biological research**, v. 33, n. 2, p. 55-64, 2000. ISSN 0716-9760.

USEPA. EPA Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. 1996a. Disponível em: < <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3050b.pdf> >. Acesso em: 09 de Agosto de 2017

USEPA. EPA Method 3052: Microwave assisted digestion of siliceous and organically based matrices. 1996b. Disponível em: < <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf> >. Acesso em: 09 de Agosto de 2017

USEPA. EPA Method 3051: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. 2007. Disponível em: < <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf> >. Acesso em: 09 de Agosto de 2017

UUSITALO, R. et al. Particulate phosphorus and sediment in surface runoff and drainflow from clayey soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 2, p. 589-595, 2001. ISSN 1537-2537.

VIEIRA, E. C. et al. Decomposição de amostras de solos assistida por radiação microondas: estratégia para evitar a formação de fluoretos insolúveis. **Bras. Ci. Solo**, v. 29, p. 547-553, 2005.

WANG, X.-S.; QIN, Y.; CHEN, Y.-K. Heavy metals in urban roadside soils, part 1: effect of particle size fractions on heavy metals partitioning. **Environmental Geology**, v. 50, n. 7, p. 1061-1066, 2006. ISSN 0943-0105.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 3527611681.

WHITE, P. J.; GREENWOOD, D. J. Properties and management of cationic elements for crop growth. **Soil Conditions and Plant Growth**, p. 160-194, 2013. ISSN 1118337298.

WORLDBANK. Agricultural land (% of land area). 2017. Disponível em: < <http://data.worldbank.org/indicator/AG.LND.AGRI.ZS?locations=BR&view=chart> >. Acesso em: 31 de Julho de 2017

XU, J. et al. Influence of particle size distribution, organic carbon, pH and chlorides on washing of mercury contaminated soil. **Chemosphere**, v. 109, p. 99-105, 2014. ISSN 0045-6535.

YAZDANPANA, N.; MAHMOODABADI, M.; CERDÀ, A. The impact of organic amendments on soil hydrology, structure and microbial respiration in semiarid lands. **Geoderma**, v. 266, p. 58-65, 2016. ISSN 0016-7061.

ZENG, F. et al. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. **Environmental pollution**, v. 159, n. 1, p. 84-91, 2011. ISSN 0269-7491.

ZHANG, M. et al. Phosphorus and heavy metal attachment and release in sandy soil aggregate fractions. **Soil Science Society of America Journal**, v. 67, n. 4, p. 1158-1167, 2003. ISSN 1435-0661.

ZUCCONI, F.; DE BERTOLDI, M. Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. In: (Ed.): Elsevier, 1986. p.30-50.