UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DA MATÉRIA ORGÂNICA
DE SOLOS SOB APLICAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Cleber Hilário dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências (Química Analítica).

Orientador: Dr^a. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Embrapa Instrumentação Agropecuária – São Carlos

São Carlos
2008

Santos, Cleber Hilário dos
Análises espectroscópicas da matéria orgânica de solos sob aplicação de águas residuárias.
/ Cleber Hilário dos Santos. São Carlos, IQSC, 2008.
147p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2008.

Orientador: Dr. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

1. Águas residuárias. 2. Matéria orgânica. 3. Ácido húmico. I. Título

DEDICO

Aos meus queridos e amados pais, Rute e Antonio, pelas palavras de carinho, constante presença, incentivo nos momentos difíceis, pelo exemplo de vida, honestidade e caráter.

À minha estimada e querida irmã Valéria pelo incentivo, atenção e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para superar as etapas mais difíceis e pela oportunidade de estar no mundo.

À Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori pela orientação, incentivo, amizade, confiança e atenção durante a realização deste trabalho.

A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Dr. Adolpho José Melfi e à Dra. Célia Regina Montes, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) – USP/Piracicaba, pelas amostras de solos concedidas e atencioso acompanhamento durante todo o trabalho.

Ao Dr. Ladislau Martin Neto, Dr. Wilson Tadeu Lopes da Silva, Dr. Marcelo Luiz Simões, pelo apoio e sugestões em todas as etapas deste trabalho.

Ao Renê por sua valiosa e prestativa ajuda no laboratório de química.

À Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende e Maria Diva Landgraf do laboratório de Química Ambiental do IQSC/USP pela valiosa colaboração nas medidas de carbono.

À Sylvana do CAQUI – IQSC/USP pelas medidas de análise elementar.

Ao Valentim pela prestativa ajuda nos trabalhos.

Às bibliotecárias do IQSC/USP pela atenção e pronto atendimento.

Ao James e Seu Roque da área experimental da Sabesp/Lins pelo apoio em campo durante a coleta das amostras de solo.

À Sílvia e Andréia da sessão de pós-graduação pela simpatia, atenção e pelo excelente atendimento.

Às minhas amigas especiais Kelly, Ursula, Fernanda, Patrini e ao meu amigo Robson Marcel pela amizade, paciência, convivência e constante auxílio durante a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Às minhas grandes amigas Heloisa, Geyse Casale, Daniele Vich, Evelyn, Vanessa Zulueta, Wanda e Lúcia Wolf meus sinceros agradecimentos pelo incentivo, amizade, paciência, convivência e apoio nos momentos difíceis de realização deste trabalho.

Aos Colegas e amigos da Embrapa Instrumentação Agropecuária: Adriana, Aline, Lucimar, Lílian, Lívia, Larissa, Poliana, Eduarda, Rosilene, Matheus, Bruno, Rafael Albieri, William, Martha, Alexandra, Jean Terencio, Helder, Rafael Cespedes, Ana Flávia, André Venâncio, Gabriel Tabosa, Edilene Ferreira, Fabíola, Ingrid, Daniele, Vivian Saory, Daniele Neves, Patrícia Brunelli e Ingrid Brock, pela excelente convivência e amizade.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infra-estrutura e pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado.

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

A todos os funcionários da Embrapa Instrumentação Agropecuária pela ajuda prestada.

Aos meus pais pelo exemplo, honestidade, apoio, força e amor.

A minha irmã Valéria pela ajuda constante, incentivo, paciência e carinho.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 EFLUENTE DE ESGOTO TRATADO: SEU USO E DESAFIOS PARA APLICAÇÃO NA AGRICULTURA	5
3.2 DISPOSIÇÃO DE EFLUENTE DE ESGOTO TRATADO NO SOLO E SEU POTENCIAL DE USO AGRÍCOLA	7
3.3 MUDANÇAS NAS CARACTERÍSTICAS DO SOLO DEVIDO À IRRIGAÇÃO COM EFLUENTE DE ESGOTO TRATADO	9
3.4 A MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	10
3.4.1 A IMPORTÂNCIA DA MATÉRIA ORGÂNICA PARA O SOLO	12
3.4.2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: CONCEITOS E MODELOS	13
3.5 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA	21
3.5.1 MÉTODOS QUÍMICOS	21
3.5.1.1 TEOR DE CINZAS	21
3.5.1.2 ANÁLISE ELEMENTAR (CHNS)	21
3.5.1.3 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)	23
3.5.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	23
3.5.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	24
3.5.2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	28
3.5.2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL	32
3.5.2.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	38
3.5.2.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER (FIL)	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 ÁREA EXPERIMENTAL	45
4.2 CLASSIFICAÇÃO DO SOLO	46
4.3 TRATAMENTOS	48
4.4 AMOSTRAGEM DO SOLO	49
4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO PARA A EXTRAÇÃO	49
4.6 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO QUÍMICO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	49
4.7 PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS	53
4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS	54
4.9 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	55
4.9.1 MÉTODOS QUÍMICOS	55
4.9.1.1 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL	55
4.9.1.2 ANÁLISE ELEMENTAR (CHNS)	55
4.10 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	56

4.10.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	56
4.10.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	57
4.10.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL	57
4.10.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	59
4.10.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE INDUZIDA POR LASER	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO QUÍMICO DOS ÁCIDOS HÚMICOS	62
5.2 MÉTODOS QUÍMICOS	64
5.2.1 TEOR DE CINZAS	64
5.2.2 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL	65
5.2.3 ANÁLISE ELEMENTAR	68
5.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	73
5.3.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	73
5.3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	77
5.3.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL	82
5.3.3.1 ESPECTROS DE EMISSÃO	83
5.3.3.2 ESPECTROS DE VARREDURA SINCRONIZADA	90
5.3.3.3 ESPECTROS TRIDIMENSIONAIS DE FLUORESCÊNCIA – MATRIZ EXCITAÇÃO-EMISSÃO (MEE)	95
5.3.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	118
5.3.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER	123
6. CONCLUSÕES	130
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Modelo de estrutura de ácido húmico proposta por Schulten e Schnitzer (1993).	16
Figura 3.2: Modelo tridimensional de ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer (1997), evidenciando os átomos de carbono (em azul), hidrogênio (em branco), nitrogênio (em preto) e oxigênio (em vermelho). As letras A, B e C indicam os espaços vazios presentes na estrutura das substâncias húmicas.	17
Figura 3.3: Modelo esquemático de estrutura das substâncias húmicas proposto por Simpson et al. (2002). As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as azuis os polipeptídeos, as pretas os polissacarídeos, as verdes as cadeias alifáticas e as marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.	20
Figura 3.4: Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético; forma da linha de absorção de energia do campo de microondas; primeira derivada da linha de absorção.	26
Figura 3.5: Esquema da estabilização do radical livre semiquinona (Senesi e Schnitzer, 1977).	27
Figura 3.6: Espectro típico de RPE de AH mostrando o sinal do radical livre do tipo semiquinona.	27
Figura 3.7: Vibrações típicas dos átomos. Os sinais + e – significam vibrações perpendiculares ao plano do papel (Stuart, 1996).	29
Figura 3.8: Diagrama de transição eletrônica de fluorescência molecular.	33
Figura 3.9: Espectro de excitação-emissão obtido para uma solução de AH comercial (Sodré, 2005).	37
Figura 3.10: Espectro de ^{13}C RMN típico de AH mostrando os grupos funcionais associados às bandas correspondentes (SKjemstad; Janik; Taylor, 1998).	42
Figura 3.11: (A) Pastilhas de solo utilizadas para a obtenção do espectro de FIL. (B) Laser incidindo sobre a pastilha de solo.	43
Figura 3.12: Esquema do sistema para medida de FIL para solos inteiros.	44
Figura 4.1: Estação de tratamento de esgoto de origem predominantemente doméstico do município de Lins (SP) mediante o emprego de lagoas de estabilização (lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa).	45
Figura 4.2: Área experimental cultivada com capim-Bermuda Tifton 85.	47
Figura 4.3: Croqui da área experimental com Capim-Bermuda Tifton-85, mostrando o sistema de irrigação, a casa de bombas, os blocos e as parcelas.	48
Figura 4.4: Esquema simplificado da extração e purificação das substâncias húmicas do solo.	52
Figura 5.1: Dados dos teores de carbono para as amostras de solo inteiro determinadas pelo método de COT.	67
Figura 5.2: Valores da razão C/N obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo.	72

Figura 5.3: Concentração de radicais livres do tipo semiquinona em spins (g de C) ⁻¹ para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo.	76
Figura 5.4: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 0-10 cm.	78
Figura 5.5: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 10-20 cm.	78
Figura 5.6: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 20-40 cm.	79
Figura 5.7: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 40-60 cm.	79
Figura 5.8: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 60-80 cm.	80
Figura 5.9: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 80-100 cm.	80
Figura 5.10: Espectros de emissão de fluorescência das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, com comprimento de onda de excitação (λ_{ex} = 240 nm), nas camadas: (a) 0-10 cm; (b) 10-20 cm; (c) 20-40 cm; (d) 40-60 cm; (e) 60-80 cm; (f) 80-100 cm.	84
Figura 5.11: Valores do índice de humificação (A_4/A_1) obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela metodologia de Zsolnay (1999).	86
Figura 5.12: Espectros de emissão de fluorescência das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, com comprimento de onda de excitação (λ_{ex} = 465 nm), nas camadas: (a) 0-10 cm; (b) 10-20 cm; (c) 20-40 cm; (d) 40-60 cm; (e) 60-80 cm; (f) 80-100 cm.	88
Figura 5.13: Valores do índice de humificação A_{465} obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela metodologia de Milori (2002).	89
Figura 5.14: Espectros de varredura sincronizada de fluorescência das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, com comprimento de onda de emissão e excitação ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 55$ nm), nas camadas: (a) 0-10 cm; (b) 10-20 cm; (c) 20-40 cm; (d) 40-60 cm; (e) 60-80 cm; (f) 80-100 cm.	91
Figura 5.15: Valores do índice de humificação (I_{468}/I_{374}) obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela metodologia de Kalbitz (1999).	92
Figura 5.16: Correlação entre a metodologia de Milori et al. (2002) e Zsolnay et al. (1999).	94
Figura 5.17: Correlação entre a metodologia de Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999).	94
Figura 5.18: Correlação entre a metodologia de Kalbitz et al. (1999) e Zsolnay et al. (1999).	95

Figura 5.19: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).	96
Figura 5.20: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).	96
Figura 5.21: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).	97
Figura 5.22: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).	97
Figura 5.23: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).	98
Figura 5.24: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).	98
Figura 5.25: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 0-10 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.	99
Figura 5.26: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 10-20 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.	99
Figura 5.27: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 20-40 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.	100
Figura 5.28: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 40-60 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.	100
Figura 5.29: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 60-80 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.	101
Figura 5.30: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 80-100 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.	101
Figura 5.31: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.	102
Figura 5.32: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.	102

Figura 5.33: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.	103
Figura 5.34: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.	103
Figura 5.35: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.	104
Figura 5.36: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.	104
Figura 5.37: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.	105
Figura 5.38: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.	105
Figura 5.39: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.	106
Figura 5.40: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.	106
Figura 5.41: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.	107
Figura 5.42: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.	107
Figura 5.43: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.	108
Figura 5.44: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.	108
Figura 5.45: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.	109
Figura 5.46: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.	109
Figura 5.47: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.	110

Figura 5.48: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.	110
Figura 5.49: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.	111
Figura 5.50: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.	111
Figura 5.51: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.	112
Figura 5.52: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.	112
Figura 5.53: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.	113
Figura 5.54: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.	113
Figura 5.55: Valores do índice R_{3D} obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela MEE.	117
Figura 5.56: Espectros de ^{13}C RMN das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 0-10 cm.	118
Figura 5.57: Espectros de ^{13}C RMN das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 10-20 cm.	119
Figura 5.58: Porcentagem da aromaticidade (a) e alifaticidade (b) das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo.	122
Figura 5.59: Espectro de fluorescência induzida por laser obtido para todas as amostras de solo inteiro de Argissolo Vermelho no perfil da amostragem.	125
Figura 5.60: Valores de H_{FIL} obtidos para todas as amostras de solo inteiro de Argissolo Vermelho no perfil da amostragem.	126
Figura 5.61: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1).	128
Figura 5.62: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Milori et al. (2002) (A_{465}).	128
Figura 5.63: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Kalbitz et al. (1999) (I_{468}/I_{374}).	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Valores dos rendimentos da extração e fracionamento químico dos AH do solo sob os diferentes tratamentos.	63
Tabela 5.2: Teor de cinzas das amostras de AH extraídas dos solos submetidos sob diferentes tratamentos.	64
Tabela 5.3: Dados de Carbono total das amostras de solo inteiro obtidos pelo método de COT.	66
Tabela 5.4: Teor (em massa) de C, H, N, S e O das amostras de ácidos húmicos determinados pelo método de análise elementar.	69
Tabela 5.5: Valores das razões atômicas C/N, O/C e H/C das amostras de ácidos húmicos obtidos através da determinação da composição elementar.	70
Tabela 5.6: Valores da concentração de radicais livres do tipo semiquinona das amostras de AH, extraídos dos solos sob os diferentes tratamentos.	74
Tabela 5.7: Dados referentes ao índice R_{3D} obtido por matrizes de fluorescência de excitação-emissão das amostras de AH.	115
Tabela 5.8: Porcentagem de aromaticidade e alifaticidade das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS das amostras de AH.	121
Tabela 5.9: Intensidades relativas (porcentagem da área total) das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS de amostras sólidas de AH.	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Área do Espectro de Emissão de FIL
AF	Ácido Fúlvico
AH	Ácido Húmico
COT	Carbono Orgânico Total
CP	Polarização Cruzada
CT	Carbono Total
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E0	Irrigação com Efluente e 0% da Dose Recomendada de FNM
E100	Irrigação com Efluente e 100% da Dose Recomendada de FNM
E33	Irrigação com Efluente e 33% da Dose Recomendada de FNM
E66	Irrigação com Efluente e 66% da Dose Recomendada de FNM
EEM	Excitation-Emission Matrix
EET	Efluente de Esgoto Tratado
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FIL	Fluorescência Induzida por Laser
FNM	Fertilização Nitrogenada Mineral
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
IV	Infravermelho
MAS	Rotação Segundo o Ângulo Mágico
MEE	Matrizes de Fluorescência de Excitação-Emissão
MO	Matéria Orgânica
MOS	Matéria Orgânica do Solo
NT	Nitrogênio Total
RLS	Radicais Livres Semiquinonas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SH	Substância Húmica
SI	Sem Irrigação
TFSA	Fração de Terra Fina Seca ao Ar
TOC	Total Organic Carbon
VA	Amplitude Variável
W100	Irrigação com Água de Consumo e 100% da Dose Recomendada de FNM

RESUMO

Em todo o mundo existe uma crescente competição pelo uso de água entre diversos setores da sociedade. O consumo de água na agricultura é grande em relação a outros tipos de uso, podendo afetar a disponibilidade deste recurso para a população urbana se este não for bem administrado. No Brasil, a agricultura consome cerca de 61% da água doce total. Entre as diferentes alternativas utilizadas pelas sociedades contemporâneas para solucionar ou minimizar este problema, visando à utilização racional e eficiente desse precioso recurso natural, o reuso de águas residuárias (efluentes) é uma opção viável econômica e ambientalmente correta. O objetivo desse trabalho foi estudar as alterações na matéria orgânica de um Argissolo Vermelho Distrófico Latossólico cultivado com capim-Bermuda Tifton 85 submetidos à adição de efluentes gerados na estação de tratamento de esgoto. As amostras utilizadas foram coletadas no município de Lins/SP em experimento já em andamento. O delineamento experimental empregado foi o de blocos completos casualizados com seis tratamentos e três repetições. Os seis tratamentos estudados foram: (1) **SI** - sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM) - (branco); (2) **E100** - irrigação com efluente e 100% ($520 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da dose recomendada de FNM para o capim Tifton - 85; (3) **E66** - irrigação com efluente e 66% ($343,2 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM; (4) **E33** - irrigação com efluente e 33% ($171,6 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM; (5) **E0** - irrigação com efluente e 0% ($0 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM; (6) **W100** - irrigação com água de consumo e 100% ($520 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM. Dessas amostras foram extraídos os ácidos húmicos (AH) para observar os efeitos da adição do efluente de esgoto tratado (EET) utilizando ressonância magnética nuclear de ^{13}C (^{13}C RMN), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), fluorescência de luz uv-visível, ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e análise elementar (C, H, N, S). Para análise do solo inteiro utilizou-se a fluorescência induzida por laser (FIL) e os teores de carbono foram determinados pelo carbono orgânico total (COT). Através dos resultados obtidos pela análise elementar, FTIR e ^{13}C RMN não foi possível obter informações a respeito das alterações na composição dos AH após a adição do EET, pois estas técnicas não foram sensíveis às mudanças da MO. Tanto os experimentos de FTIR como o de ^{13}C RMN forneceu espectros com bandas características de grupos alifáticos, comprovando seu alto grau de alifaticidade. Os resultados da espectroscopia de fluorescência em solução demonstraram que a irrigação com EET aumenta tanto a concentração de estruturas complexas quanto o grau de humificação dos AH. Os resultados de FIL para solos inteiros, entretanto, não mostraram alteração significativa com a irrigação com EET (exceto o tratamento E33), indicando que as alterações das substâncias húmicas no solo analisado ocorreram preferencialmente nos AH e afetando muito pouco a humina, que representa mais de 80% das SH do solo. Os resultados obtidos por RPE demonstraram que os tratamentos irrigados com EET apresentaram um aumento na concentração de radicais livres do tipo semiquinona, com o aumento da adubação, exceto o tratamento E33. Sendo assim, em relação a MOS, a irrigação com EET por um período de quatro anos não causa mudanças significativas, e neste aspecto pode ser indicada como alternativa de irrigação não impactando significativamente a matéria orgânica e proporcionando benefícios econômicos, ambientais e sociais.

ABSTRACT

Around the world there is a growing competition for the use of water among several sectors of society. Water consumption in agriculture is large when compared to other types of use and can affect the availability of water for the urban population unless it is well administered. In Brazil, agriculture consumes about 61% of the total freshwater. Among the different ways tried by contemporary societies to solve or minimize this problem, aiming to use rationally and efficiently this precious natural resource, reuse of wastewater (effluents) is an economically viable and environmentally correct option. The aim of this work was to study the changes in organic matter in a Typic Hapludults cultivated with Tifton 85 Bermudagrass submitted to addition of effluent generated by sewage treatment. The utilized samples were collected at Lins / SP, being part of a previously started experiment. The experimental design employed was the randomized complete blocks, with six treatments and three replications. The analyzed six treatments were: (1) WI – without irrigation and without nitrogen as mineral fertilizer (NMF) - (white), (2)E100 - irrigation with effluent and 100% ($520 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) of the recommended dose of NMF for the Bermudagrass Tifton - 85, (3) E66 - irrigation with effluent and 66% ($343.2 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) of the NMF, (4)E33 - irrigation with effluent and 33% ($171.6 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) of the NMF,(5) E0 - irrigation with effluent and 0% ($0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) of the NMF,(6) W100 - irrigation with water for consumption and 100% ($520 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) of the NMF. Humic acids (HA) were extracted from these samples in order to observe the effects of adding treated sewage effluent (TSE) using nuclear magnetic resonance of ^{13}C (^{13}C NMR) spectroscopy, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, UV-visible and fluorescence spectroscopy, electronic paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and elementary analysis (C, H, N, S). In order to analyze the whole soil, laser induced fluorescence (LIF) was utilized, and the carbon levels were determined through total organic carbon (TOC). Through the results obtained by elementary analysis, FTIR and ^{13}C NMR, it was not possible to obtain information about changes in the composition of HA after adding the TSE, because these techniques were not sensitive to changes in OM. Both ^{13}C NMR and FTIR provided spectra with bands typical of aliphatic groups, showing their high degree of aliphaticity. The fluorescence spectroscopy results for samples in solution demonstrated that the irrigation with TSE increases both the concentration of complex structures and the humification degree of HA. The results of LIF for the whole soil, however, showed no significant change with irrigation with TSE (except for the treatment E33), indicating that changes of humic substances in the analyzed soil occurred mainly in HA, and affecting very little on humin, which represents more than 80% of the soil HS. The results obtained by EPR demonstrated that the treatments irrigated with TSE showed an increase in the concentration of semiquinone-type free radicals, with increasing fertilization, except for the treatment E33. Therefore, regarding SOM, irrigation with TSE along a four years period did not cause significant changes, and, under this viewpoint, it can be indicated as an alternative irrigation not significantly impacting the organic matter and providing economic, environmental and social benefits.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A demanda cada vez maior de recursos hídricos decorrentes do contínuo crescimento populacional, associada à distribuição desigual deste recurso natural, à poluição de águas e às secas sazonais que afetam determinadas regiões do globo, são fatores que têm estimulado pesquisas sobre novas formas de recuperação e suprimento de água. Entre as diferentes alternativas utilizadas pelas sociedades contemporâneas para solucionar ou minimizar este problema, visando à utilização racional e eficiente desse precioso recurso natural, o reuso de águas residuárias é uma opção viável econômica e ambientalmente.

A água constitui-se no recurso natural mais importante para o desenvolvimento da agricultura no mundo, uma vez que as novas tecnologias para aumento de produtividade das áreas agrícolas são dependentes da sua disponibilidade. Tal importância reflete-se nos altos índices de produtividade de áreas irrigadas, em que apenas 18% do total de áreas agrícolas correspondem a aproximadamente 40% da produção agrícola mundial (Brown et al., 2000).

Em todo o mundo, devido a sua escassez, existe uma crescente competição pelo uso de água entre diversos setores da sociedade. O consumo de água na agricultura é grande em relação a outros tipos de uso, podendo afetar a disponibilidade deste recurso para a população urbana se este não for bem administrado. No Brasil, a agricultura consome cerca de 61% da água doce total (Christofidis, 2001). Portanto, é desejável uma realocação dos recursos hídricos usados na agricultura para outros setores.

Desde que realizada de forma controlada, a irrigação com efluente de esgoto

tratado (EET) é altamente atrativa, pois além de possibilitar a liberação de recursos hídricos de melhor qualidade para outras atividades humanas, serve como uma forma de polimento dos efluentes provenientes do tratamento de esgoto por meio do “filtro biológico” constituído pelo sistema solo-planta.

O uso de EET também pode ser considerado como recurso econômico de grande valor, pois contêm nutrientes e sua utilização pode levar à diminuição de fertilizantes minerais adicionados aos agrossistemas, reduzindo os custos variáveis de produção, aumentando a competitividade do produtor e contribuindo ainda para a preservação do meio ambiente.

Um ponto importante que favorece a utilização de EET na irrigação de culturas é o fato do solo, juntamente com as plantas, atuar como “filtro vivo”, absorvendo e retendo nutrientes e poluentes. Portanto, os efluentes que causam impacto negativo ao ambiente, quando lançados diretamente nos corpos d’água, podem ser utilizados como fonte d’água e, segundo suas características químicas, como fonte de nutrientes, principalmente nitrogênio, para o sistema solo-planta (Feigin et al., 1978; Fonseca, 2001).

Os sistemas de tratamento de esgotos mediante o emprego de lagoas de estabilização geram resíduos como o lodo de esgoto e o efluente de esgoto tratado. O EET, subproduto líquido do tratamento de esgoto, consiste num tipo de água residuária, cujo destino final normalmente tem sido os cursos d’ água causando poluição ambiental. O uso do EET em diferentes atividades humanas tem sido uma alternativa sustentável frente ao quadro de escassez, pois contribui para a preservação da água doce podendo substituir total ou parcialmente a água de boa qualidade nos processos industriais, no abastecimento público, uso doméstico e em algumas atividades agrícolas, como por exemplo, a irrigação.

Vários países, localizados tanto em regiões áridas como úmidas têm mostrado a viabilidade da utilização, de forma sustentável, dos EETs na irrigação. O Estado de São Paulo gera considerando somente as estações de tratamento operadas pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp), um volume de 3.097 L s^{-1} de EET nas estações de tratamento que usam a técnica de lagoas de estabilização. Dada a importância do crescimento do agronegócio no país e a busca pelo desenvolvimento sustentável, há enorme potencial para o uso de EET na irrigação. Entretanto, no Brasil, o uso de efluentes na agricultura ainda é incipiente e as mudanças que podem ocorrer, sejam estas positivas e/ou negativas, são pouco conhecidas (Fonseca, 2001).

Apesar dos benefícios concretos com o aproveitamento do efluente na agricultura, a presença de alguns constituintes, como metais pesados e o sódio (Na), são indesejáveis. A preocupação com os metais pesados deve-se principalmente na utilização de efluentes industriais ou com o uso de efluentes domésticos por longo período de tempo. O teor de sódio em solos agrícolas pode aumentar com a adição de efluente alterando certas características físicas do solo, devido à dispersão de argilas e características químicas, influenciando direta ou indiretamente o desenvolvimento das plantas (Feigin et al., 1991).

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

Avaliar e caracterizar através de métodos químicos e espectroscópicos as alterações da matéria orgânica (MO) e seus principais constituintes húmicos, em solos submetidos e não submetidos à aplicação de EET gerados na estação de tratamento de esgoto (ETE) com diferentes dosagens de fertilização nitrogenada mineral (FNM).

CAPÍTULO 3 – REVISÃO DE LITERATURA

A disposição dos resíduos gerados pelas estações de tratamento de esgotos tem se constituído em um dos maiores problemas enfrentados pelas empresas de saneamento básico. Além de envolver, em geral, custos elevados, os quais oneram sobremaneira o processo de tratamento, provoca normalmente grandes impactos ambientais. Assim sendo, este tema tem despertado a atenção de pesquisadores, políticos, técnicos e gestores ambientais.

Pesquisas realizadas em diferentes partes do mundo têm mostrado não somente a viabilidade da aplicação destes resíduos na agricultura seja substituindo a irrigação convencional, ou adicionando nutrientes ao sistema solo-planta, como também os cuidados que devem ser tomados para evitar que sua aplicação possa trazer danos ambientais, tanto pela contaminação dos solos e aquíferos, quanto pela degradação das propriedades físicas e químicas dos solos.

3.1 EFLUENTE DE ESGOTO TRATADO: SEU USO E DESAFIOS PARA APLICAÇÃO NA AGRICULTURA

Os EETs são águas residuárias ricas em matéria orgânica e nutrientes, com altas demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e química de oxigênio (DQO), podendo ocasionar sérios impactos ambientais quando lançados nos corpos d'água, como, por exemplo, a proliferação de algas em larga escala, denominada de eutrofização (Dorich et al., 1984). Entretanto, estas mesmas características podem, com manejo adequado, trazer benefícios quando aplicados a sistemas de produção agrícola.

O uso do EET na agricultura pode reduzir a descarga nos corpos d'água, substituindo a água potencialmente de qualidade por água residuária. O estudo dessa substituição vem se tornando importante, visto que com o crescimento urbano-populacional a quantidade de água disponível, seja para abastecimento público ou para uso em atividades agrícolas têm decrescido continuamente ao longo dos anos, sendo fundamental a conscientização da população quanto à necessidade do reuso e a importância (Firme, 2007).

Diversos trabalhos têm mostrado a eficiência dos efluentes em substituir totalmente à água de irrigação e parcialmente a fertilização nitrogenada mineral, aumentando a produção das culturas (Feigin et al., 1978; Smith et al., 1982; Fonseca, 2001; Pollice et al., 2004). Portanto, a aplicação do EET na agricultura é uma alternativa ecologicamente viável de destinação destes efluentes no meio ambiente (Toze, 2006).

O uso de efluentes como fonte d'água e nutrientes às plantas, apesar de ser uma alternativa atrativa e popular (Bouwer & Idelovitch, 1987; Feigin et al., 1991; Pescod, 1992) não é uma prática isenta de riscos e tem se constituído em um desafio à Ciência do Solo (Bond, 1998), pela complexidade do entendimento do comportamento dos constituintes do efluente no solo, bem como os perigos de sodicidade e poluição com N-NO_3^- (Cameron et al., 1997).

É importante considerar na irrigação de culturas agrícolas com efluentes de esgoto, que estas águas residuárias apresentam mais impurezas que águas de fontes naturais, podendo ser prejudiciais dependendo das características que apresentam e das práticas de manejo adotadas para seu uso (Vasquez-Montiel et al., 1996). Sérios problemas ambientais podem ocorrer como aumento de elementos

tóxicos em plantas e solos, lixiviação de nitrato e riscos a saúde humana devido a microrganismos patogênicos (Vasquez-Montiel et al., 1996; Hespanhol, 2002).

Entretanto, diretrizes podem ser adotadas de forma combinada ou isoladamente no uso de águas residuárias na agricultura, tais como: restrições a culturas, tratamento de águas residuárias, controle da exposição humana, promoção da higiene e controle da aplicação da água residuária (Pescod, 1992).

3.2 DISPOSIÇÃO DE EFLUENTE DE ESGOTO TRATADO NO SOLO E SEU POTENCIAL DE USO AGRÍCOLA

Devido a uma série de fatores de ordem ambiental, social e legal, tem havido uma maior pressão populacional para que a colocação de efluentes ricos em nutrientes/poluentes seja realizada no solo e não nos cursos d'água (Bond, 1998). Desse modo, o solo tem se constituído como um meio alternativo para disposição de resíduos (Cameron et al., 1997), bem como de efluente de esgoto (Bond, 1998).

A possibilidade de dispor os efluentes no solo baseia-se no princípio de que o solo e as plantas atuam como um sistema depurador (“filtro vivo”), absorvendo e retendo nutrientes/poluentes e organismos patogênicos (Bouwer & Chaney, 1974). Este sistema solo-planta exerce o papel de um reator renovável, no qual os esgotos passam a ser fonte de energia e não um problema ambiental (Paganini, 1997). Assim, as plantas, notadamente as gramíneas, absorvendo os nutrientes, acumulando-os em sua parte aérea e incorporando-os na sua massa seca, reduzem os teores de nutrientes adicionados às águas subterrâneas (Feigin et al., 1978; Vaisman et al., 1981). Após o corte dessas plantas, os nutrientes são exportados do local, mantendo-se a capacidade de renovação de águas residuárias do sistema solo-planta (Jordan et al., 1997).

Portanto o uso dos EET como fonte alternativa de nutrientes e de água, se manejado eficientemente, pode trazer benefícios ambientais e econômicos (Darwish et al., 1999; Sumner, 2000) para diversas situações de solo, clima e culturas (Feigin et al., 1991; Cameron et al., 1997; Bond, 1998).

A aplicação no solo e a reutilização de águas residuárias tratadas tem sido uma importante alternativa para o problema de disposição dos efluentes no ambiente. A aplicação dos efluentes tratados no solo completa uma seqüência de processos para reduzir a concentração de microrganismos e de vários compostos orgânicos e inorgânicos a níveis aceitáveis para a renovação da água (Vaisman et al., 1981; Feigin et al., 1991).

Dentre os principais sistemas de tratamento de águas residuárias no solo (irrigação, infiltração/percolação e escoamento à superfície), a irrigação de culturas tem sido o método mais acessível (Feigin et al., 1991) e eficiente (Darwish et al., 1999), particularmente, nos países em desenvolvimento onde não há uma política para o tratamento das águas residuárias (Friedel et al., 2000).

Vários países, localizados tanto em regiões áridas como úmidas, tais como Israel, Arábia Saudita e Austrália, têm mostrado a viabilidade da utilização, de forma sustentável, dos EETs na irrigação (Pescod, 1992). No Brasil, essa prática ainda é recente, necessitando de mais informações técnico-científicas e de estudos de longo prazo (Fonseca, 2001). Entretanto, estudos já realizados no país indicam que a utilização de EET na agricultura mostra-se viável (Montes et al., 2006; Mota et al., 2006; Santos, 2004; Fonseca et al., 2007; Gloaguen et al., 2007; Herpin et al., 2007).

3.3 MUDANÇAS NAS CARACTERÍSTICAS DO SOLO DEVIDO À IRRIGAÇÃO COM EFLUENTE DE ESGOTO TRATADO

A disposição de EET no solo altera suas características químicas, físicas e biológicas (Bouwer & Chaney; 1974; Feigin et al., 1991; Friedel et al., 2000).

A prática de irrigação com EET não é isenta de riscos e tem potencial de transmissão de doenças, pois patógenos presentes neste subproduto podem sobreviver no sistema solo-planta. A transmissão de doenças é controlada por fatores agronômicos como, método de irrigação empregado, crescimento da planta, práticas de culturas e de colheita (Wescot, 1997). Os maiores riscos de contaminação por patógenos estão associados, normalmente, a utilização de efluentes de esgotos não tratados na irrigação de lavouras, ocasionando riscos aos consumidores, bem como aos trabalhadores rurais (Santamaria & Toranzos, 2003).

Os efluentes podem alterar a taxa de decomposição da matéria orgânica do solo (MOS), ocasionando diminuição nos teores de carbono (C) e nitrogênio (N) (Falkiner & Smith, 1997). Pelo fato da taxa de mineralização ser altamente dependente do potencial de água no solo (Stanford & Epstein, 1974; Myers et al., 1982) o fator umidade constante (mediante irrigação) associado às altas temperaturas, promove uma rápida mineralização do material orgânico adicionado ao solo (Artiola & Pepper, 1992). Assim a irrigação com efluente tem o potencial de modificar os processos de ciclagem do N e também do C, pelo fato de aumentar a água no solo para teores que estimulam a atividade de decomposição da MO (Polglase et al., 1995; Falkiner & Smith, 1997).

Por outro lado, a adição de EET no solo consiste no aporte de C e N nas diferentes formas (mineral e orgânica). Carbono e nitrogênio orgânicos do EET são admitidos como sendo, principalmente, algas mortas com uma rápida velocidade de

decomposição. Portanto, a disposição de EET no solo implica na adição de N-orgânico e C-orgânico, os quais são adicionados como carboidratos na fração da matéria orgânica fresca (Snow et al., 1999). Têm sido comum na literatura referências ao aumento nos teores de carbono total (CT), nitrogênio total (NT) e na atividade microbiana do solo mediante a disposição de águas residuárias, mais pronunciadamente em solos que vem recebendo efluentes por longo período (Quin & Woods, 1978; Friedel et al., 2000).

A disposição dos EET no solo pode ocasionar aumento, diminuição, ou até mesmo, não alterar os teores dos metais pesados disponíveis no solo. Na maior parte dos trabalhos que evidenciaram aumento nos teores de metais pesados no solo mediante irrigação com efluente, as observações referem-se a experimentos de longos períodos de aplicação de EET (Quin & Syers, 1978; Cameron et al., 1997; Siebe 1995; Bond, 1998, Friedel et al. 2000; Yadav et al., 2002; Wang et al., 2003). As características do efluente, alta força iônica bem como altos teores em matéria orgânica dissolvida são susceptíveis de alterar o comportamento dos metais, tornando móveis metais usualmente adsorvidos nas superfícies do complexo argilo-húmico.

3.4 A MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A quantidade e natureza dos componentes orgânicos do solo são resultantes de vários fatores, como por exemplo: as propriedades do solo, o clima e o tipo de manejo, a origem dos resíduos vegetais e animais, entre outros.

O aumento do efeito estufa e a diminuição da camada de ozônio têm levado à reflexão sobre a qualidade, quantidade, comportamento e distribuição do carbono nos diferentes ecossistemas e à avaliação do impacto sobre a mudança potencial no

clima global e sua contribuição no tocante à agricultura. Uma importante conclusão desses estudos poderá ser a definição de procedimentos que resultem no alívio dos efeitos nas mudanças climáticas globais, que têm uma relação direta com a agricultura e, mais especificamente, com a MO presente no solo.

Apesar de se encontrar em reduzida quantidade, a MO tem influência em quase todas as propriedades do solo, atuando de maneira marcante no crescimento dos vegetais. Sua presença caracteriza os solos de boa fertilidade, aos quais proporciona uma estruturação favorável à vida das plantas. É, praticamente, a principal fonte de nitrogênio para as plantas sendo, ainda, fornecedora de elementos como o enxofre e o fósforo, bem como de vários micronutrientes. Por isso, incrementa-se a quantidade de MO ao solo pela prática de adições regulares de resíduos orgânicos para lhe conferir maior produtividade agrícola.

A MOS consiste de uma mistura de produtos animais e vegetais em vários estágios de decomposição, resultantes da degradação química, biológica, e da atividade sintética dos microrganismos. A MO inclui todos os constituintes orgânicos do solo, inclusive tecidos de plantas e animais não decompostos, seus produtos de decomposição parcial e a biomassa do solo (Stevenson, 1994; Schnitzer, 1982). Essa é uma definição muito ampla, incluindo materiais pouco alterados até aqueles que sofreram profundas alterações.

A MOS é constituída basicamente de substâncias húmicas (SH) e substâncias não húmicas.

As substâncias não húmicas (carboidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos de baixa massa molecular, entre outras) pertencem a grupos bem conhecidos e possuem características físicas e químicas bem definidas. Geralmente

correspondem aos compostos mais facilmente degradados por microrganismos, tendo normalmente tempo mais curto de vida no ambiente.

As SH, por sua vez, são macromoléculas ou estruturas supramoleculares, com massa molecular e estruturas variáveis. Possuem características físicas e químicas não bem definidas e que podem ser divididos em ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas, com base nas suas características de solubilidade (Stevenson, 1994).

3.4.1 A IMPORTÂNCIA DA MATÉRIA ORGÂNICA PARA O SOLO

Cientistas, há tempos, têm reconhecido a importância da MO, como fator de controle das propriedades físicas e químicas do solo. Dentre essas propriedades destacam-se efeitos na melhoria e estabilidade de agregados de partículas do solo, aumento da capacidade de retenção de água, aumento da capacidade de troca de cátions (CTC), na aeração e na diversidade e atividade microbiana (Stevenson, 1994).

Em climas tropicais e subtropicais, a MO é crucial para a produtividade do solo e sua quantidade depende de quão intenso é o seu manejo. Nesses tipos de clima a taxa de decomposição da MO é bastante elevada, cerca de cinco vezes mais rápido quando comparada à de regiões temperadas.

A MO, é atualmente, vista como o fator mais importante no desenvolvimento e manejo do solo, afetando sua qualidade e, conseqüentemente, a sustentabilidade agrícola.

A MOS é, portanto, o componente-chave de qualquer ecossistema terrestre, e qualquer variação na abundância e composição desta perfaz importantes efeitos na dinâmica que ocorre entre os sistemas de armazenamento de carbono. Na busca de

melhores condições para o cultivo do solo, a reposição da MO é um passo de extrema importância. Assim, várias técnicas têm sido aplicadas com tal intuito.

3.4.2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: CONCEITOS E MODELOS

As SHs estão presentes em todos os solos e águas naturais que contém MO. Nos solos a MO pode apresentar-se em quantidades muito variadas, desde 0,5% (solos desérticos) e 95% (solos turfosos) (Luchese; Fávero; Lenzi, 2002). No Brasil, a maior parte dos solos apresentam teores de MO entre 1 e 3%.

O grande interesse por estudar as SH se deve ao fato de que elas estão diretamente relacionadas com a fertilidade do solo, sendo muito importante para o aumento da produção de alimentos.

As SH são os componentes mais recalcitrantes da MOS e são constituídas de uma mistura heterogênea de compostos orgânicos naturais com elevada massa molar, em que cada fração (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas) deve ser considerada como sendo constituída de uma série de moléculas de tamanhos diferentes. A maioria delas não possui a mesma configuração estrutural ou grupos reativos na mesma posição.

Estas são formadas a partir do processo de humificação, o qual altera estruturas químicas da MO pela degradação de resíduos orgânicos via lixiviação, trituração e catabolismo, sendo controlado por variáveis como temperatura, regime de água do solo, pH e nutrientes livres. Durante o processo de humificação ocorre um aumento nos grupos C-carboxílicos, C-aromáticos e C-alquil, principalmente fenólicos e a diminuição de grupos O-alquil (Zech et al., 1997).

A humificação é o processo de degradação de compostos lábeis e acúmulo de material quimicamente recalcitrante, ou seja, as substâncias orgânicas formadas

se associam à fração mineral e permanecem no meio. Segundo (Zech et al.,1997) a humificação é a transformação de reservas macromorfologicamente identificáveis em compostos húmicos amorfos. Assim, as principais transformações que ocorrem durante o processo de humificação é a modificação das estruturas da lignina, perda de compostos fenólicos e polissacarídeos e enriquecimento em estruturas aromáticas não lignínicas recalcitrantes.

Segundo a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e a literatura internacional, as SH podem ser classificadas com base na sua solubilidade em meio aquoso e se dividem em:

- ácidos húmicos: fração solúvel em extrato alcalino, que precipita após acidificação;
- ácidos fúlvicos: fração que permanece em solução quando o extrato alcalino é acidificado;
- humina: fração insolúvel em qualquer intervalo de pH.

A divisão das SH em AH, AF e humina é uma classificação operacional levando-se em conta apenas às características de solubilidade em meio aquoso e não as propriedades inerentes a essas substâncias.

A variedade de materiais de origem e o grande número de caminhos reacionais possíveis para a formação do húmus é a razão para as dificuldades na sugestão de uma estrutura precisa para os AH e AF. As SH variam em composição, dependendo de sua origem, do método de extração e de outros parâmetros.

Existem divergências na literatura quanto há um modelo de estrutura comum aos AHs, sendo, portanto objeto de inúmeras investigações.

No final do século XIX já se compreendiam as SH como uma mistura complexa de substâncias orgânicas com natureza principalmente coloidal e com

propriedades fracamente ácidas. Também já havia informações a respeito da sua interação com outros componentes do solo.

As SH são macromoléculas orgânicas amorfas, escuras formadas por diversos grupos funcionais, tais como: carboxílicos, ésteres, éteres, fenólicos, hidroxílicos, enólicos, quinonas e nitrogênio presente como nitrilas e estruturas heterocíclicas. A massa molar aparente varia de centenas a milhares de unidades de massa atômica (Schnitzer e Khan, 1978; Stevenson, 1994; Schulten e Schnitzer, 1997).

Apesar de se conhecer os grupos funcionais e a composição elementar que compões as SH, ainda hoje não existe um modelo estrutural definitivo. Muitas estruturas foram propostas, cada uma delas foi caracterizada por grupos funcionais similares e a presença de componentes aromáticos e alifáticos.

Baseados em uma variedade de técnicas analíticas, tais como: espectroscopia, degradação oxidativa, pirólise e microscopia eletrônica, Schulten e Schnitzer (1993) sugeriram uma estrutura para os AH na Figura 3.1.

Figura 3.1: Modelo de estrutura de ácido húmico proposta por Schulten e Schnitzer (1993).

No modelo estrutural da Figura 3.1 os AH apresentam grandes porções alifáticas, as funções oxigenadas estão presentes como grupos carboxílicos, hidroxílicos, fenólicos, éter e éster e as funções nitrogenadas presentes como nitrilas e estruturas heterocíclicas.

Baseado em experimentos de pirólise acopladas a um espectrômetro de massas, Schulten e Shnitzer (1997) propuseram um modelo tridimensional pelo qual o AH é representado como uma macromolécula na Figura 3.2.

Figura 3.2: Modelo tridimensional de ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer (1997), evidenciando os átomos de carbono (em azul), hidrogênio (em branco), nitrogênio (em preto) e oxigênio (em vermelho). As letras A, B e C indicam os espaços vazios presentes na estrutura das substâncias húmicas.

Eles puderam constatar que o modelo estrutural da Figura 3.2, apresentava uma série de espaços vazios de diferentes tamanhos no interior da macromolécula. Estes espaços vazios poderiam alojar outros compostos orgânicos, hidrofóbicos ou hidrofílicos, tais como materiais proteináceos e carboidratos, pesticidas, lipídios, agrotóxicos e outros poluentes. Poderiam, também, estar presentes compostos inorgânicos como argilas e oxi-hidróxidos.

A reatividade das SH é devida, principalmente, a quatro características estruturais (Sposito, 1989; Rezende, 1999):

- Carga Macromolecular: possui caráter aniônico, cujos efeitos refletem na conformação molecular e na reatividade dos grupos funcionais.
- Hidrofilicidade: reflete-se na tendência que têm as SH de formarem ligações de hidrogênio com as moléculas de água do meio, solvatando, dessa forma, grupos funcionais como COOH e OH.
- Labilidade estrutural: devido à capacidade de formarem associações intermoleculares e de mudanças conformacionais em resposta as mudanças de pH, condições redox, ligações químicas e concentração iônica.
- Polifuncionalidade: presença de vários grupos funcionais, com reatividades diferentes, representativos de uma mistura heterogênea de polímeros que interagem entre si.

Todas as propriedades citadas a respeito das SH são semelhantes a propriedades de outros biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos. Contudo, no caso das SH essas propriedades refletem o comportamento de uma mistura heterogênea de moléculas interagindo entre si, ao invés do comportamento de um único tipo de macromolécula, estruturalmente bem definida.

Wershaw (1986, 1993) postulou uma descrição alternativa para a estrutura macromolecular, o modelo supramolecular, no qual é proposto que as SH em solução formem agregados húmicos que são estabilizados por ligações fracas, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Além disso, é proposto que as SH são provenientes de produtos de degradação enzimática de plantas e complexos de ligninas-carboidratos.

O conceito de "supramolecularidade" foi recentemente proposto para os AHs. Esse modelo foi embasado por Conte e Piccolo (1999), dando origem à teoria supramolecular, na qual as SH são formadas por moléculas pequenas e

heterogêneas de várias origens, auto-organizadas em conformações supramoleculares, o que explicaria o grande tamanho molecular aparente das SH.

De acordo com esse modelo, os AF são associações de pequenas moléculas hidrofílicas que permaneceriam dispersas pela repulsão das cargas negativas originadas da dissociação da grande quantidade de grupos ácidos presentes na sua estrutura. Os AH são constituídos por associações de estruturas predominantemente hidrofóbicas, por outro lado, por apresentarem uma menor quantidade de grupos funcionais ácidos, poderiam aproximar-se o suficiente para formar agregados de elevada massa molar (Hayes e Clapp, 2001; Wershaw, 1993).

O modelo supramolecular foi reforçado por Simpson et al. (2002), que demonstraram que as SH extraídas dos solos são formadas por uma mistura de substâncias agregadas de baixa massa molar, e propuseram um modelo estrutural na Figura 3.3 para ilustrar como as principais estruturas identificadas nas SH poderiam formar um agregado na presença de cátions metálicos de ocorrência natural nos ecossistemas terrestres.

Figura 3.3: Modelo esquemático de estrutura das substâncias húmicas proposto por Simpson et al. (2002). As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as azuis os polipeptídeos, as pretas os polissacarídeos, as verdes as cadeias alifáticas e as marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.

Recentemente Diallo et al. (2003), utilizando métodos computacionais e dados experimentais, excluíram os modelos que sugerem que as SH sejam macromoléculas com elevada massa molar ou uma mistura de compostos orgânicos complexos e heterogêneos e observaram que as estruturas existentes possuem as características necessárias para sustentar o modelo supramolecular.

O maior obstáculo encontrado na definição de um modelo estrutural para as SHs englobando estrutura, composição, tamanho e reatividade química é a heterogeneidade, sendo que há uma variação destas nos ecossistemas naturais aquáticos e terrestres.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA

Métodos químicos e espectroscópicos tem sido, amplamente empregado no estudo da MOS, especialmente das SHs, tanto para a identificação e caracterização dos diferentes compostos húmicos, na avaliação da alteração desses compostos, e no entendimento dos processos relacionados após a aplicação de EET nos solos e compará-los com os solos sem irrigação e irrigados com água de consumo.

3.5.1 MÉTODOS QUÍMICOS

3.5.1.1 TEOR DE CINZAS

O teor de cinzas corresponde à quantidade de matéria inorgânica, especialmente metais e sílica, presentes no AHs. Esse valor reflete na eficiência do processo de extração e purificação. Altos valores de cinzas podem interferir nas análises de ressonância magnética nuclear e ressonância paramagnética eletrônica e comprometer a interpretação da análise elementar.

3.5.1.2 ANÁLISE ELEMENTAR (CHNS)

A análise elementar é o método mais utilizado para a determinação da composição elementar das SHs, se baseia na detecção de quatro componentes (nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre) de uma mistura, eluída e separada por uma coluna cromatográfica, possibilitando a detecção, na seqüência de N₂, CO₂, H₂O e SO₂. O teor de oxigênio foi obtido por diferença a 100%. Com os resultados da análise elementar não é possível se chegar à fórmula molecular dos AH ou AF, mas pode-se se ter uma idéia da composição geral da molécula.

A composição das SH é afetada por diversos fatores, como material de

origem, pH, uso do solo e vegetação. Os solos neutros apresentam uma faixa estreita de valores para carbono, hidrogênio e nitrogênio, enquanto solos ácidos apresentam uma faixa mais larga. Os AH são mais concentrados em carbono, hidrogênio e nitrogênio, enquanto que os AF são mais ricos em enxofre e oxigênio (Senesi; Loffredo, 1999).

Segundo a literatura (Schnitzer e Khan, 1978; Stevenson, 1994), os conteúdos dos principais constituintes nas amostras de AH sob diferentes sistemas de manejo, tem valores médios de 53,8-58,7% para o carbono, 3,2-6,2% para o hidrogênio, 32,8-38,3% para o oxigênio, 0,8-4,3% para o nitrogênio e 0,1-1,5% para o enxofre.

Informações isoladas sobre a composição elementar das SH não são muito conclusivas, e as razões atômicas H/C, O/C e C/N têm sido preferencialmente utilizadas para estabelecer o grau de condensação e fornecer informações da presença de grupos funcionais presentes nas estruturas dos AHs.

A razão atômica H/C é freqüentemente associada a grau de condensação ou de aromaticidade da MO, e este, por sua vez, ao grau de humificação, sendo que maiores valores de H/C indicam maior quantidade de grupos alifáticos, típicos de materiais menos humificados. O aumento desta razão para valores acima de um, implica em uma diminuição da aromaticidade nas amostras (Bravard e Righi, 1991).

A razão atômica O/C permite estimar a abundância de grupos funcionais que contém oxigênio e, portanto é um indicador do grau de oxidação.

A razão atômica C/N indica o grau de incorporação de nitrogênio na estrutura húmica e sobre o estado de humificação da MO. Essa razão deve ser constante para sedimentos e solos entre 10-12 (Kiehl, 1979; Stevenson, 1994). Uma alta razão C/N significa baixa incorporação de nitrogênio e baixo grau de humificação.

3.5.1.3 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)

O carbono total é determinado pela oxidação do carbono orgânico e inorgânico a CO_2 , devido ao aumento de temperatura a 900°C .

A determinação do carbono inorgânico é realizada através da acidificação (ácido fosfórico) e, posterior aquecimento a 200°C . O carbono orgânico das amostras é calculado por diferença do carbono total e inorgânico.

3.5.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Segundo Mangrich (2001) o conhecimento das estruturas húmicas das SH é essencial para entender a sustentabilidade dos diferentes sistemas agrícolas, a lixiviação de espécies químicas e o ciclo global de carbono, causando danos ao meio ambiente como o empobrecimento do solo e a poluição das águas.

As técnicas espectroscópicas têm sido bastante utilizadas para a caracterização da MOS. Técnicas como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), fluorescência de luz uv-visível e fluorescência induzida por laser (FIL) fornecem informações sobre os grupos funcionais que constituem a MO e possibilitam a avaliação do grau de humificação, embora, em sistemas tropicais, esses estudos ainda são reduzidos (Martin-Neto et al., 1991; Bayer et al., 1997; Milori et al., 2002; Gonzáles-Perez et al., 2004).

Essas técnicas possuem vantagens como à utilização de pequenas quantidades de amostras e a sua fácil execução (Stevenson, 1994), sendo que cada uma delas oferece determinadas informações.

A espectroscopia de RMN ^{13}C permite a caracterização estrutural e a determinação do grau de alifaticidade e aromaticidade das SH.

A espectroscopia de RPE oferece informações sobre a natureza e concentração dos radicais livres presentes nas SH. Permite ainda identificar, sem a destruição das amostras, átomos ou grupos ligados e as formas e estabilidade das ligações entre as SH e os íons metálicos paramagnéticos.

A espectroscopia de FTIR permite a identificação de grupos funcionais, como hidroxílicos, carboxílicos, alifáticos, aminas, carboxilatos, polissacarídeos, entre outros.

A espectroscopia de fluorescência de luz uv-visível tem sido amplamente utilizada na determinação do grau de humificação de AHs.

A espectroscopia de FIL aplicada a solos é uma nova metodologia, que tem se mostrado eficiente para avaliar o grau de humificação da MO de solos inteiros.

3.5.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

A espectroscopia de RPE é uma técnica capaz de detectar espécies com elétrons desemparelhados. Quando moléculas, íons ou átomos, que possuem elétrons desemparelhados, são submetidos a um campo magnético e absorvem radiação na frequência de microondas ($10^{12} - 10^9$ Hz), ocorre o fenômeno de ressonância paramagnética eletrônica. Isso permite a detecção dessas espécies e a determinação da sua concentração.

O fenômeno de RPE só é possível de ser observado quando a amostra a ser investigada contém átomos e moléculas com ao menos um elétron desemparelhado. Nesse aspecto, os íons de metais de transição (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} , Cr^{3+} , entre outros) e os radicais livres, são possíveis de detecção (Donoso, 1997).

Com a RPE é possível analisar-se não destrutivamente amostras sólidas,

líquidas e gasosas. É uma técnica extremamente sensível e sob condições favoráveis o limite de detecção para centros magnéticos encontra-se no intervalo de 10^{11} a 10^{12} spins g^{-1} , o que equivale à parte por bilhão. A resolução, porém, é perdida quando os centros paramagnéticos estão próximos o suficiente para que ocorra significativa interação dipolar entre eles.

O momento magnético ($\vec{\mu}$) de um elétron livre pode ser expresso em termos de seu spin ($\vec{S}$) como:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{S} = g \beta \vec{S}$$

onde γ é a razão giromagnética, β é o magnéton de Bohr e g é o fator giromagnético para o elétron.

Na presença de um campo magnético H_0 , a interação deste elétron com o campo magnético será dada pela hamiltoniana:

$$H = \vec{\mu} \cdot \vec{H}_0 = g \beta \vec{S} \cdot \vec{H}_0$$

Esta hamiltoniana descreve o efeito Zeeman, cuja solução fornece as possíveis energias para o sistema:

$$E = \pm \frac{1}{2} g \beta H_0$$

A transição entre os dois níveis ocorrerá quando uma energia $\Delta E = g \beta H_0$ for fornecida ao sistema. Quando a condição de ressonância é satisfeita, o momento magnético sofre uma transição de uma posição paralela ao campo magnético H_0 para uma posição antiparalela a este. A energia ΔE normalmente é fornecida ao sistema através da exposição a um campo de microondas de frequência fixa perpendicular ao campo H_0 , que é variado até que ocorra a transição (Figura 3.4).

Figura 3.4: Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético; forma da linha de absorção de energia do campo de microondas; primeira derivada da linha de absorção.

Os processos de transformação da MO no ambiente são conectadas com várias reações envolvendo radicais livres (Jeziersqui et al., 1998). Estes radicais livres podem ser detectados em SHs pela espectroscopia de RPE como um sinal estreito e intenso com g entre 2,0030 e 2,0043.

O sinal de radicais livres das substâncias húmicas é produzido por grupos semiquinona formados pela dehidrogenação oxidativa de compostos fenólicos e estão em equilíbrio com as formas quinona e hidroquinona (Figura 3.5). As SH contêm radicais livres muito estáveis que são relacionados com reações de polimerização – despolimerização, grau de aromaticidade e humificação da MO (Riffaldi e Schnitzer, 1972) e podem interagir com pesticidas e poluentes orgânicos tóxicos (Schnitzer e Khan, 1978, Senesi et al., 1987).

Figura 3.5: Esquema da estabilização do radical livre semiquinona (Senesi e Schnitzer, 1977).

Figura 3.6: Espectro típico de RPE de AH mostrando o sinal do radical livre do tipo semiquinona.

Uma das principais informações a respeito das SH é a medida do grau de humificação. Este dado nos informa se a MO sofreu processo de mineralização (perda em forma de CO_2 e H_2O) ou se passou a fazer parte das SH do solo.

Os espectros de RPE das SH, associados aos radicais livres, consistem geralmente de uma linha simétrica desprovida de qualquer desdobramento hiperfino,

o que indica a presença de radicais com estruturas complexas. O número de spins de radicais livres do tipo semiquinona é proporcional ao grau de humificação da MO (Martin Neto et al., 1994).

3.5.2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A chamada radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético entre a região visível e as microondas. A região de maior interesse espectroscópico está situada entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (Stevenson, 1994).

O espectro de IV é característico da molécula como um todo, porém certos grupos funcionais dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independentemente da estrutura do resto da molécula. É justamente devido à presença dessas bandas características de grupos que é possível obter informações sobre a estrutura das moléculas, através da consulta de tabelas e do simples exame do espectro (Silverstein, 1994).

Mesmo moléculas simples podem produzir espectros extremamente complexos. O químico utiliza-se deste fato vantajosamente comparando o espectro de um composto desconhecido com o de uma amostra conhecida.

A intensidade das bandas pode ser expressa como sendo absorbância (A) ou em porcentagem de transmitância (T%). A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorbância é o logaritmo, na base 10, do recíproco da transmitância, isto é: $A = \log_{10} (1/T)$ (Silverstein, 1994).

Absorção na região do infravermelho é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas de uma molécula.

Essencialmente, existem duas vibrações fundamentais: deformação, onde as posições dos átomos mudam em relação ao eixo de ligação original, e, estiramento, onde os átomos permanecem no mesmo eixo da ligação, porém a distância entre os átomos aumenta e diminui. Quando luz infravermelha de mesma frequência de vibração de deformação ou de estiramento incide na amostra a energia é absorvida e a amplitude de vibração é aumentada. Devido à energia de absorção na frequência de ressonância, o detector do espectrômetro de infravermelho grava um pico de absorção naquele comprimento de onda (Stevenson, 1994). Vibrações típicas de um grupo de átomos são ilustradas na Figura 3.7.

Figura 3.7: Vibrações típicas dos átomos. Os sinais + e - significam vibrações perpendiculares ao plano do papel (Stuart, 1996).

A aplicação desta técnica permite identificar tanto estruturas moleculares (componentes alifáticos e aromáticos, peptídicos), como grupos funcionais reativos (COOH, OH, C=O, NH₂).

A espectroscopia de infravermelho tem sido extensivamente usada na pesquisa de SHs, pois de acordo com (Stevenson, 1994) fornece considerável entendimento sobre a natureza, a reatividade e o arranjo estrutural de grupos funcionais contendo oxigênio, a ocorrência de carboidratos e proteínas, e o grau de pureza da amostra quanto a contaminantes inorgânicos como metais, sais e argilas. Os espectros de infravermelho podem revelar as interações entre grupos orgânicos, como os carboxílicos e metais pesados, visto que a coordenação dos grupos funcionais orgânicos com metais provoca deslocamento na frequência de absorção das ligações do íon carboxilato, o que permite a identificação da natureza (iônica ou covalente) da ligação organometálica (Vinkler; Lakatos; Meisel, 1976; Hernandez; Moreno; Costa, 1993).

Os espectros na região do infravermelho dos AH são relativamente simples, possuindo poucas bandas de absorção, geralmente alargadas. A complexidade do ambiente químico que envolve os grupamentos funcionais dos AH resulta em uma série de sobreposições de bandas de absorção. A espectroscopia nessa região apresenta limitações para a caracterização estrutural, mas pode ser muito útil no indicativo da presença e do comportamento dos grupamentos funcionais (Canellas, 1999).

Segundo Benites et al. (1999), a introdução da técnica da transformada de Fourier na determinação dos espectros de infravermelho proporcionou avanços como maior velocidade na leitura dos espectros, permitindo a obtenção de um somatório de muitos espectros, proporcionando uma melhoria na definição dos

sinais e exatidão na análise; redução do custo do equipamento, tornando-se um método simples e barato comparado a outras técnicas espectroscópicas, além da pequena quantidade de amostra requerida na análise.

A execução de várias varreduras para diminuição dos ruídos é facilitada devido a utilização de um computador na obtenção da transformada de fourier. Uma transformada de fourier converte o domínio de tempo na forma de domínio de frequência (Skoog; Holler; Neuman, 2002).

Em complementação aos dados obtidos por RMN, as análises de FTIR têm sido utilizadas para identificar grupos funcionais como: grupos carboxila, hidroxila, amina e outros (Schnitzer e khan, 1972; Stevenson, 1994).

As possíveis atribuições das principais bandas de absorção usualmente observadas nos espectros de FTIR estão mostradas a seguir (Schnitzer e khan, 1972; Stevenson, 1994):

- 3400 – 3300 cm^{-1} : estiramento de O-H e N-H;
- 2940 – 2840 cm^{-1} : estiramento simétrico e assimétrico de C-H alifático;
- 1725 – 1720 cm^{-1} : estiramento de C=O de ácidos carboxílicos;
- 1660 – 1630 cm^{-1} : estiramento de C=O de amidas e quinonas e de cetonas conjugadas com ligação de hidrogênio;
- 1650 – 1580 cm^{-1} : estiramento simétrico de C=O de íons carboxilato;
- 1630 – 1600 cm^{-1} : estiramento de C=C aromático;
- 1590 – 1520 cm^{-1} : deformação de N-H de amidas e estiramento C=N;
- 1450 cm^{-1} : deformação C-H dos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$;
- 1400 – 1380 cm^{-1} : estiramento de C-O fenólico, deformação de O-H carboxílico, deformação de C-H alifático e estiramento assimétrico de C=O de carboxilatos;

- 1280 – 1200 cm^{-1} : estiramento C-O de éteres, ésteres e fenóis e deformação de O-H carboxílico;
- 1170 – 1000 cm^{-1} : estiramento de C-O de estruturas polissacarídicas;
- 1050 – 950 cm^{-1} : estiramento de C-O de estruturas polissacarídicas e estiramento Si-O (impurezas do tipo silicato);
- 950 – 670 cm^{-1} : deformação no plano e fora do plano de C-H aromático;
- 800 – 700 cm^{-1} : caulinita, glauconita, montmorilonita, quartzo.

3.5.2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL

A luminescência é o fenômeno de emissão de radiação eletromagnética previamente absorvida, usualmente no visível ou no infravermelho próximo. Nesse processo, existem duas etapas: excitação do sistema eletrônico e a subsequente emissão de fótons. A transição é originada num nível eletrônico excitado e depois da emissão de um fóton, retorna novamente ao nível eletrônico fundamental.

O fenômeno de luminescência tem sido classificado de acordo com a duração do tempo de decaimento para o estado fundamental. Desta classificação temos a fluorescência e a fosforescência. Na fluorescência, o tempo de relaxação é de 10^{-8} segundos, já na fosforescência podem durar vários segundos.

Na espectroscopia de fluorescência os elétrons na molécula de interesse são excitados e transferidos de orbitais moleculares do estado fundamental para orbitais moleculares ligantes e antiligantes do estado excitado. Transições desse tipo envolvem a promoção de elétrons não ligantes (n) ou ligantes (π) para orbitais antiligantes (π^*). Normalmente uma molécula excitada eletronicamente volta ao seu estado excitado mais baixo por uma série de relaxações vibracionais rápidas e

conversões internas que não produzem emissão de radiação. Esses processos são altamente prováveis em sistemas moleculares contendo átomos com pares de elétrons desemparelhados como nitrogênio e oxigênio ou sistemas aromáticos e ou alifáticos insaturados capaz de um elevado grau de ressonância, como, deslocalização de elétrons, como é o caso das SH (Senesi et al., 1991).

Figura 3.8: Diagrama de transição eletrônica de fluorescência molecular.

A fluorescência dos compostos orgânicos envolve transições singlete-singlete onde não há mudanças de spin, entretanto, na fosforescência é necessário um estado intermediário tripleto, devido a reversão do spin entre o estado fundamental e o excitado, que retarda a emissão, devido as regras de seleção de spin (Figura 3.8).

A alta sensibilidade e seletividade são as principais vantagens desta técnica, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados.

A utilização desta técnica como uma técnica sensível e relativamente simples para estudar a estrutura e os grupos funcionais de AHs e demais SHs deve-se à presença de várias estruturas fluorescentes, denominada de "fluoróforos" (que são

grupos cromóforos que apresentam fluorescência em comprimento de onda específico) na macromolécula húmica, incluindo desde estruturas aromáticas condensadas a cadeias alifáticas insaturadas. Além disso, as propriedades fluorescentes dos AHs dependem de diversos parâmetros, tais como sua origem, sua concentração e massa molecular, temperatura, pH e potencial redox do meio, bem como suas interações com íons metálicos e compostos orgânicos (Senesi, 1990).

Nas SHs, os principais fluoróforos presentes, são sistemas com alto grau de conjugação, como, por exemplo, anéis aromáticos e grupos do tipo quinona.

A bem conhecida heterogeneidade das SH fornece espectros de fluorescência que podem ser utilizados para diferenciar e classificar a MO de acordo com sua gênese, origem e natureza. Por outro lado, esta mesma complexidade representa um obstáculo na identificação de componentes estruturais individuais responsáveis pela fluorescência (Senesi et al., 1991).

Recentemente, algumas metodologias têm sido sugeridas na literatura no sentido de aplicar esta técnica para avaliar o grau de humificação das SHs (Zsolnay et al., 1999; Kalbitz et al., 1999; Milori et al., 2002).

Usualmente os espectros bidimensionais de fluorescência podem ser adquiridos de três modos: emissão, excitação e varredura sincronizada (Senesi, 1992).

Os espectros de emissão são obtidos medindo-se a intensidade relativa da radiação emitida como uma função do comprimento de onda mantendo-se constante o comprimento de onda de excitação.

Os espectros de excitação são obtidos medindo-se a intensidade relativa de emissão num comprimento de onda fixo, enquanto o comprimento de onda de excitação é variado.

Os espectros de varredura sincronizada são obtidos medindo a intensidade de fluorescência enquanto simultaneamente são varridos os comprimentos de onda de excitação e emissão, mantendo-se constante a diferença de comprimentos de onda entre eles, isto é: $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$. Quando essa diferença é usada, esta técnica pode aumentar a intensidade de alguns picos, aumentando a sensibilidade do método.

Os espectros de fluorescência das SHs são constituídos pela soma dos espectros dos diferentes tipos de fluoróforos presentes nelas, como consequência da complexidade molecular e heterogeneidade das mesmas (Narimoto, 2006).

Na metodologia proposta por Zsolnay et al. (1999), o índice de humificação é baseado na localização do espectro de fluorescência adquirido no modo de emissão. O espectro de emissão total foi dividido em quatro partes e o índice de humificação foi calculado através da razão entre as áreas do último quarto (570–641 nm) e primeiro quarto (356–432 nm), denominado A_4/A_1 . A idéia básica de Zsolnay e colaboradores, é que se as moléculas fluorescentes tornam-se mais condensadas, seus espectros de emissão (com excitação em 240nm) tenderão a exibir um deslocamento sobre maiores comprimentos de onda.

Na metodologia proposta por Kalbitz et al. (1999), mediu-se o espectro de varredura sincronizada. De acordo com esta metodologia, o espectro de varredura sincronizada das SHs apresenta dois picos ao redor de 360 e 400 nm e um ombro em torno de 470nm. Esses perfis mudam dependendo do grau de humificação, e isto pode ser medido através da razão entre os picos de fluorescência. A região do

espectro com comprimentos de onda mais para o vermelho (maior comprimento de onda), é associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados. A região mais para o azul (menor comprimento de onda) é associada a compostos mais simples. Assim, a razão entre a intensidade de fluorescência em 400 e 360 nm, ou 470 e 360 nm, pode ser utilizada para medir o grau de humificação das SHs dissolvidas.

A metodologia proposta por Milori et al. (2002) consiste em excitar as SH com luz azul (465 nm) e medir a emissão de fluorescência. Esta absorção é mais ressonante com estruturas cuja concentração aumenta com o grau de humificação de amostras de AH. Portanto, nesta proposta a área total sob o espectro de emissão de fluorescência com excitação em 465 nm (A_{465}) é proporcional ao grau de humificação.

Espectroscopia tridimensional de matrizes de fluorescência de excitação-emissão (MEE) ou do inglês Excitation-Emission Matrix (EEM), são geradas pela obtenção de espectros de excitação e de espectros de emissão de uma amostra. Os espectros de excitação são produzidos pela medida da intensidade de luminescência mantendo-se constante o comprimento de onda de emissão e varrendo-se o de excitação. Espectros de emissão são obtidos de forma contrária, mas através do mesmo princípio, mantendo-se a excitação constante e varrendo-se o modo de emissão (Trevisan, 2003).

Desta maneira, matrizes de excitação-emissão são geradas por duas dimensões independentes de comprimentos de onda, onde uma destas dimensões caracteriza-se pelos perfis de excitação e outra, possuindo informação referente ao espectro de emissão. A projeção destes espectros gera uma superfície

tridimensional de fluorescência total, com a presença de todas as bandas de excitação e emissão dos fluoróforos presentes (Trevisan, 2003).

A modalidade de MEE baseia-se na obtenção de um espectro tridimensional a partir de vários espectros individuais de emissão. Os diferentes laboratórios, que estudam SH por fluorescência, utilizam freqüentemente diferentes valores de comprimentos de onda de excitação e de emissão, dificultando uma comparação entre distintos estudos. Por esta razão, ainda não foi bem estabelecida uma “impressão digital” consistente das SH obtidas por fluorescência (Sierra et al., 2005). A modalidade MEE produz espectros em vários comprimentos de onda de excitação fornecendo uma visão geral de todas as estruturas existentes no interior de uma faixa espectral selecionada (Sierra et al., 2005).

A Figura 3.9 mostra um espectro MEE obtido por uma solução de ácido húmico comercial.

Figura 3.9: Espectro de excitação-emissão obtido para uma solução de AH comercial (Sodré, 2005).

A Figura 3.9 mostra um gráfico tridimensional formado por uma matriz de dados espectrais de excitação-emissão adquiridos a partir de uma solução de AH comercial. Os valores de intensidade de emissão aparecem sob a forma de curvas de nível. Neste caso, observa-se que o valor de máxima emissão foi obtido com a radiação incidente fixada, exatamente, em 330 nm. Pode-se observar ainda, no canto superior esquerdo do gráfico, uma extensa faixa de emissão proveniente das ressonâncias das radiações incidentes (Olendzki, 2006).

Esta técnica tem sido utilizada, com sucesso, na diferenciação estrutural de SH extraídas de solos, com e sem adubação com rejeitos orgânicos (lodos) (Bertoncini et al., 2005; Plaza et al., 2006), no estudo das reações de metais, como o Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} por SH extraídas de turfas, compostos e solos (Plaza et al., 2005; Provenzano et al., 2004).

3.5.2.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia de ^{13}C RMN é basicamente uma outra forma de espectroscopia de absorção, semelhante à RPE, FTIR ou Ultravioleta-Visível. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência governada pelas características estruturais da molécula (Carvalho et al., 2004).

Um experimento de RMN consiste essencialmente em posicionar a amostra entre os pólos de um campo eletromagnético e aplicar uma radiofrequência variável. A excitação do núcleo do estado fundamental para um estado de energia mais alto resulta na absorção de radiação a uma frequência própria, dando um espectro o qual consiste de uma ou mais linhas de ressonância. Um espectro de ^{13}C RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades. O

número e a intensidade dessas linhas estão relacionados com a estrutura da molécula (Carvalho et al., 2004).

A ^{13}C RMN é a principal técnica que permite identificar possíveis mudanças estruturais sobre os compostos húmicos e frações organo-minerais do solo, que refletem em alteração de suas propriedades nos solos. A utilização da técnica de ^{13}C RMN no estado sólido é cada vez maior porque possibilita o estudo de substâncias que são pouco solúveis ou mesmo insolúveis. A técnica não é destrutiva, preservando a amostra para outras análises, economizando solventes e permitindo a avaliação *in situ* da MOS (Daí, 1999).

As informações obtidas com esta técnica, para com as SHs, relacionam-se ao grau de alifaticidade e aromaticidade das amostras, identificação de compostos como ligninas, taninos, carboidratos, grupos carboxílicos e outros (Peuravuori, 2005).

Tanto a ^{13}C RMN como de ^1H têm sido aplicadas em estudos relativos a conformações e estruturas moleculares da MO com grande sucesso.

Com a técnica de ^{13}C RMN, podemos fazer um estudo direcionado para um determinado núcleo, sendo esta uma das grandes vantagens da técnica. É atualmente a técnica instrumental mais usada para caracterização da MOS, sendo possível à utilização de amostras líquidas e sólidas.

No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, tais, como, baixa sensibilidade devido à pequena abundância natural da maioria dos núcleos, entre eles o ^{13}C (~1,1%), chamado de núcleo raro, e os tempos de relaxação muito longos que exigem experimentos com longa duração.

No caso de medidas de estado sólido para a obtenção de espectros de alta resolução, devem ser resolvidos os três problemas a seguir (Carvalho, et al., 2004):

- 1 – alargamento devido à anisotropia do desvio químico;
- 2 – baixa sensibilidade devida aos longos tempos de relaxação spin-rede dos núcleos raros (^{13}C);
- 3 – alargamento devido às interações dipolares heteronucleares (^{13}C , ^1H).

Estas três interações anisotrópicas estão presentes também nos líquidos, mas, felizmente, são eliminadas pelo rápido movimento isotrópico browniano das moléculas.

Nas últimas décadas com o desenvolvimento de técnicas novas e sofisticadas, tais como: desacoplamento de alta potência, técnica de rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP), houve um grande avanço e melhoria destas limitações da ^{13}C RMN de estado sólido.

A grande maioria dos trabalhos envolvendo SH tem sido desenvolvida com amostras no estado sólido (utilizando-se polarização cruzada e rotação no ângulo mágico: CP/MAS ^{13}C RMN), devido ao menor tempo requerido para a obtenção dos espectros.

A técnica de desacoplamento de alta potência permite eliminar o alargamento das linhas no espectro de ^{13}C provocado principalmente pelas interações dipolares entre os núcleos de ^{13}C e ^1H . O campo local que surge sobre os núcleos raros de ^{13}C é devido à presença de núcleos abundantes, como exemplo, prótons. O desacoplamento é feito via redução do momento magnético dos núcleos de ^1H que são abundantes, pela aplicação de um campo de radiofrequência que mantém o momento de dipolo magnético do mesmo em alta rotação (Carvalho et al., 2004).

A técnica de rotação segundo o ângulo mágico é usada para eliminar os vestígios da interação dipolar ^{13}C - ^1H e os efeitos da anisotropia sobre o deslocamento químico através da rotação da amostra segundo um determinado

ângulo, denominado ângulo mágico ($54^{\circ}44'$) em relação ao campo magnético aplicado.

A técnica de polarização cruzada permite aumentar a sensibilidade dos núcleos raros e reduzir os longos tempos de relaxação spin-rede, mediante a transferência da magnetização de spins de núcleos abundantes como ^1H para os spins de núcleos raros como ^{13}C , contribuindo também ao aumento da resolução pelo incremento de magnetização total (Jelinski e Melchior, 2000).

A utilização destas três técnicas combinadas simultaneamente conduz a obtenção de espectros de alta resolução em sólidos.

Os principais grupos funcionais detectados por ^{13}C RMN no estado sólido em AH são (Figura 3.10) (SKjemstad; Janik; Taylor, 1998):

- 0 – 45 ppm: grupos alifáticos;
- 45 – 60 ppm: metoxil e N-alifáticos;
- 60 – 110 ppm: O-alifáticos;
- 110 – 140 ppm: aromáticos;
- 140 – 160 ppm: fenólicos;
- 160 – 185 ppm: carboxílicos;
- 185 – 230 ppm: carbonílicos.

Figura 3.10: Espectro de ^{13}C RMN típico de AH mostrando os grupos funcionais associados às bandas correspondentes (SKjemstad; Janik; Taylor, 1998).

3.5.2.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

As técnicas acima citadas exigem a extração e fracionamento químico das SH do solo, tornando a análise de solos um processo trabalhoso. Além disso, os produtos deste tratamento (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) podem sofrer modificações em relação a sua forma *in situ* (Feller; Beare, 1997). Em contrapartida, a FIL aplicada a solos é uma nova metodologia, que tem se mostrado eficiente na análise da MO de solos inteiros, fornecendo resultados de uma maneira ágil, limpa, e em condições próximas das naturais (Milori et al., 2003, 2006).

Baseado nesse fato é possível propor a FIL aplicada para amostras de solos como parâmetro para estudar os processos de humificação da MO.

Recentemente Milori et al. (2006) demonstraram que a FIL pode ser usada como um método rápido e não destrutivo para analisar a MO de solos inteiros e para estudar a MO associada com minerais na matriz do solo.

A técnica e a instrumentação são similares a correspondente espectroscopia de fluorescência convencional, já utilizada para analisar frações da MO de solos purificados. A maior diferença é na fonte de irradiação. Em FIL as amostras de solos são irradiadas com 300 mW de luz monocromática em 458 nm, produzido por um laser argônio. O uso de uma fonte de energia alta melhora a sensibilidade, permitindo a aplicação da técnica em amostras de solos inteiros.

A FIL baseia-se na análise de pastilhas de solos (Figura 3.11), amostras de solos prensadas em molde de aço (1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura).

Figura 3.11: (A) Pastilhas de solo utilizadas para a obtenção do espectro de FIL. (B) Laser incidindo sobre a pastilha de solo.

A proposta de cálculo para obtenção do índice de humificação pela metodologia de FIL é a razão entre o valor da área (ACF) sobre espectro de emissão de fluorescência (com excitação em 458 nm) e o valor de carbono orgânico total (COT) presente na amostra de solo inteiro (Milori et al., 2004, 2006), ou seja:

$$H_{FIL} = \frac{ACF}{COT} \quad (3.1)$$

feito para normalizar a relação entre a intensidade de emissão e a concentração de fluoróforos presentes na MO da amostra. A adoção da área sobre a curva de fluorescência (ACF) como parâmetro para estimativa da humificação se baseia na metodologia para análise de fluorescência de AH em solução proposta por Milori et al. (2002), ou seja, o índice de humificação A_{465} .

O sistema para medir a FIL (Figura 3.12) é composto por um laser de argônio sintonizado na linha de 458 nm com uma potência de 300 mW (1), um prisma para separação da emissão do laser da fluorescência do gás, espelho para a condução da excitação até as amostras de solos (3, 4 e 5), uma lente para coletar a fluorescência (6), um modulador óptico (optical chopper) (7), um filtro para suprimir a excitação no sistema de detecção (8), um monocromador da marca CVI (1200 g mm⁻¹ e "blaze" em 500 nm) (9), uma fotomultiplicadora da marca Hamamatsu com pico de resposta espectral em 530 nm (10), um amplificador lock-in (11), um microcomputador dotado de uma placa de aquisição e software de controle e aquisição de dados (12). A resolução espectral do sistema foi avaliada em 4 nm.

Figura 3.12: Esquema do sistema para medida de FIL para solos inteiros.

CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento foi instalado e conduzido no município de Lins, no Estado de São Paulo, com longitude 49°50'W, latitude 22°21'S e altitude média de 440 m, situado ao lado direito da estação de tratamento de esgoto (Figura 4.1) operada pela Sabesp, na Unidade de Negócios do Baixo Tietê e Grande no município de Lins.

Figura 4.1: Estação de tratamento de esgoto de origem predominantemente doméstico do município de Lins (SP) mediante o emprego de lagoas de estabilização (lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa).

O clima do local foi classificado como Cwa, caracterizado como mesotérmico de inverno seco, segundo a classificação climática de Koppen. A temperatura média tem sido de 22°C no mês mais quente e de 18°C no mais frio e a precipitação anual tem variado de 1.100 a 1.300 mm.

O município de Lins possui aproximadamente 70.000 habitantes, 99,5% da população é atendida pelo sistema de coleta e 100% deste esgoto recebe tratamento de esgoto pela Sabesp, por meio de lagoas de estabilização, resultando em uma vazão média de 12.000 m³ de esgoto por dia.

A ETE é do tipo australiano sendo constituída por um conjunto de três de lagoas anaeróbias em paralelo (tratamento primário), seguido por um conjunto de três lagoas facultativas fotossintéticas (tratamento secundário), onde são produzidos cerca de 140 L s⁻¹ de efluente secundário de esgoto tratado.

O campo experimental de Lins apresenta uma área de 6 ha e está instalado em um terreno com relevo levemente inclinado em direção ao eixo de uma drenagem. Conta com uma boa infra-estrutura de pesquisa - (estação meteorológica automática, poços para monitoramento do lençol freático ao longo da vertente, calhas de coleta e medida do escoamento superficial, sistema de irrigação por gotejamento na parte montante da vertente e de irrigação por aspersão convencional na parte jusante, baterias de lisímetros de tensão e tensiômetros, colocadas desde a superfície até a profundidade de 200 cm ao longo da vertente, sistema de desinfecção do efluente por meio de cloração e por meio de radiação ultravioleta, estufa para os ensaios de hidroponia) - que foi disponibilizado para o desenvolvimento de parte das pesquisas propostas neste projeto.

4.2 CLASSIFICAÇÃO DO SOLO

O solo da área experimental (Figura 4.2) é um Argissolo Vermelho Distrófico Latossólico, de textura, média argilosa (Embrapa, 1999), cultivado com capim-Bermuda Tifton 85. Esse capim é um cultivar desenvolvido na “Coastal Plain Experiment Station”, da Universidade da Geórgia. É considerado o melhor híbrido

obtido no programa de melhoramento desta Universidade dentre os híbridos de capins bermuda (Vilela & Alvim, 1998). É uma planta aceita por eqüinos, bovinos, caprinos e ovinos (Rodrigues, et al. 1998).

Figura 4.2: Área experimental cultivada com capim-Bermuda Tifton 85.

Antes da instalação do experimento, a área não era cultivada e encontrava-se em pousio. O plantio do capim foi realizado em janeiro de 2002, quatro meses após a aplicação de $2,0 \text{ t ha}^{-1}$ de calcário dolomítico não sendo realizada qualquer fertilização, bem como correção da acidez do solo até a instalação do experimento, que teve início no mês de janeiro de 2003 (Fonseca, 2005).

Todas as parcelas receberam anualmente as mesmas quantidades de fertilizante mineral potássico (na forma de cloreto de potássio) e fosfatado (na forma de superfosfato simples). Somente as doses na forma de nitrato de amônio variaram de 0 a $520 \text{ kg há}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, conforme o tratamento. Todos os fertilizantes minerais foram distribuídos manualmente, imediatamente após os cortes do capim, conforme (Premazi et al., 2003).

Os tratos culturais foram realizados de modo a permitir o adequado desenvolvimento e crescimento das plantas.

4.3 TRATAMENTOS

Os estudos foram realizados em experimento já em andamento. O delineamento experimental empregado foi o de blocos completos casualizados com seis tratamentos e três repetições (Figura 4.3). (1) **SI** - sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM) - (branco); (2) **E100** - irrigação com efluente e 100% ($520 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da dose recomendada de FNM para o capim Tifton - 85; (3) **E66** - irrigação com efluente e 66% ($343,2 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM; (4) **E33** - irrigação com efluente e 33% ($171,6 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM; (5) **E0** - irrigação com efluente e 0% ($0 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM; (6) **W100** – irrigação com água de consumo e 100% ($520 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da FNM. As parcelas apresentam tamanho de $10 \times 10 \text{ m}$, perfazendo uma área total de 100 m^2 . Desprezando-se $1,0 \text{ m}$ de cada lado (bordadura) e os 16 m^2 centrais da parcela, obtém-se uma área útil de 48 m^2 por unidade experimental. Foi deixado um espaço de 10 m entre parcelas.

Figura 4.3: Croqui da área experimental com Capim-Bermuda Tifton-85, mostrando o sistema de irrigação, a casa de bombas, os blocos e as parcelas.

4.4 AMOSTRAGEM DO SOLO

As amostras de solos foram coletadas na primeira quinzena de maio de 2006.

O solo foi coletado por meio de trado holandês desde a superfície até, em geral, 100 cm de profundidade. Foram coletadas em pontos aleatórios nas parcelas experimentais amostras compostas de solo das camadas superficiais (0-10 e 10-20 cm) e subsuperficiais (20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 cm). Foram coletadas doze e seis subamostras para formar uma amostra composta para cada uma das camadas superficiais e subsuperficiais, respectivamente.

4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO PARA A EXTRAÇÃO

Depois de coletadas, as amostras compostas de solos foram levadas para o laboratório onde foi realizada uma limpeza manual cuidadosa para retirar as raízes e restos de outros elementos contaminantes. A seguir as amostras foram secas à temperatura ambiente e passadas em peneira de malha de 212 μm para a obtenção da fração de terra fina seca ao ar (TFSA).

4.6 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO QUÍMICO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As SH são usualmente fracionadas com base em características de solubilidades, sendo os AH a fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido. O percentual de material húmico extraído varia consideravelmente de um tipo de matriz para outro, e, em geral, é maior quando se aumenta o pH do extrator e a temperatura de extração (Stevenson, 1994).

Segundo (Stevenson, 1994), o método de extração ideal seria aquele que permitisse o isolamento dos AH inalterados, livres de contaminantes e

representativos de toda a amplitude de massas moleculares, e que fosse aplicável a qualquer tipo de matriz. Entretanto, tal método ainda não fora desenvolvido e, provavelmente, nunca o será, dada a complexidade da matriz.

Dentre os vários solventes empregados nos processos de extração dos AH em matrizes sólidas, a solução de hidróxido de sódio (NaOH) é o mais utilizado e é o sugerido pela IHSS. Sua principal vantagem é extrair uma maior quantidade de material do que qualquer outro extrator disponível. No entanto, esse extrator tem recebido diversas críticas (Stevenson, 1994), como o fato de dissolver a sílica e tecidos orgânicos frescos que contaminariam o extrato, e promover alterações químicas, como auto-oxidação de alguns componentes orgânicos e condensação entre aminoácidos e carbonilas de aldeídos aromáticos, decorrentes da absorção de oxigênio na atmosfera.

Todas as amostras de solos foram submetidas a um processo de extração e fracionamento químico das SH por diferença de solubilidade, seguindo a metodologia recomendada pela IHSS, (Swift, 1996), que utiliza solução de NaOH diluída para dissolver AH e ácido clorídrico (HCl) diluído para sua precipitação.

Inicialmente realizou-se uma extração com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em proporção de 1 g solo: 10 mL de solução. A solução foi agitada manualmente durante 1 hora e, após deixar a solução em repouso, separou-se o sobrenadante do resíduo por sifonação. O sobrenadante separado é o extrato 1 de ácido fúlvico (**AF Extrato 1**), que seria utilizado para a extração de ácido fúlvico, foi descartado após uma neutralização.

O AF foi descartado, devido à pequena quantidade que seria obtida no final do processo de extração e purificação. Esta pequena quantidade seria insuficiente para a preparação das amostras a serem utilizadas nas técnicas propostas nesse projeto.

Em seguida foi realizada uma extração com NaOH 0,1 mol L⁻¹, resultando no final uma relação solo-solução 1:10. A solução sofreu agitação intermitente durante 4 horas. A seguir, a suspensão ficou em repouso por 16 horas e o sobrenadante foi isolado através de uma centrifugação (10.000 rpm – 15 minutos) e reservado para posterior acidificação. O material insolúvel, denominado humina, foi separado para purificação.

Esta purificação foi feita através da lavagem do material insolúvel com água deionizada (Milli-Q), até que o material fosse neutralizado (pH = 7,0). Em seguida, o material foi seco em estufa (35°C) durante aproximadamente tr dias.

O sobrenadante isolado foi acidificado com HCl 6 mol L⁻¹, com agitação simultânea até atingir pH 1-2 e mantido novamente em repouso por 16 horas. Na seqüência, a solução foi centrifugada (10.000 rpm – 15 minutos) para separar o AH (precipitado) e as frações de AF (sobrenadante – **AF Extrato 2**). O sobrenadante foi neutralizado e descartado.

A fração de AH foi redissolvida através da adição de um pequeno volume conhecido de KOH 0,1 mol L⁻¹. A seguir, adicionou-se cloreto de potássio (KCl) na forma sólida, para atingir uma concentração de 0,3 mol L⁻¹ [K⁺]. Após, centrifugou-se a solução sob alta velocidade (12.000 rpm – 15 minutos) para que os sólidos suspensos fossem removidos.

O AH foi então reprecipitado, adicionando-se HCl 6 mol L⁻¹ com agitação simultânea até que fosse atingido pH 1,0–1,5, e após, a suspensão foi mantida em repouso por 16 horas. Centrifugou-se a solução (10.000 rpm – 15 minutos) e o sobrenadante foi então descartado.

O precipitado (AH) foi dissolvido e suspenso em solução HCl 0,1 mol L⁻¹ + HF 0,3 mol L⁻¹ num recipiente plástico e agitado durante 16 horas a temperatura ambiente.

A seguir, a solução foi centrifugada (10.000 rpm – 15 minutos) e após descartar o sobrenadante, o precipitado foi transferido, com o auxílio de água deionizada (Milli-Q) para uma membrana de diálise (Spectra/Por 6000 – 8000 D) de 25 cm de comprimento e 5 cm de largura, preparada segundo a metodologia de Mc Phie (1971). Procedeu-se a diálise contra água deionizada até que a água da diálise apresentasse teste negativo de cloreto (Cl⁻) com nitrato de prata (AgNO₃). Para isso, tal procedimento foi mantido durante aproximadamente seis dias, fazendo-se a troca da água deionizada duas vezes por dia.

Figura 4.4: Esquema simplificado da extração e purificação das substâncias húmicas do solo.

4.7 PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS

O AH extraído dos solos de acordo com o procedimento utilizado contém freqüentemente íons metálicos que podem interferir em sua caracterização. Alguns AH, dependendo de suas origens, podem apresentar um teor de cinzas de até 30%. Um método satisfatório de redução nesta quantidade pode ser obtido por repetidas etapas de dissolução – precipitação – centrifugação e utilização da diálise, utilizando-se membranas específicas.

Um método muito efetivo para remoção das argilas é a centrifugação a alta velocidade, após redissolver o AH em solução levemente alcalina. Considera-se, geralmente, o teor de cinzas adequado de até, no máximo, 3%. Esse valor depende muito do tipo de estudo que se deseja realizar.

A purificação dos AH é feita geralmente com solução mista de HCl e HF, que promove a quebra das ligações Si-O entre a argila e a matéria orgânica, solubilizando dessa forma os argilo-minerais. Sanches-Monedero et al. (2002) verificaram que o tratamento com HCl-HF reduz de forma significativa o teor de cinzas dos AH sem grandes alterações na sua estrutura e na sua composição química.

A diálise é um método muito utilizado para purificação de substâncias (substâncias húmicas, proteínas), sendo usada uma membrana hidrofóbica de celulose regenerada com microfiltros. Esta membrana é útil porque não adsorve os solutos e não fixa cargas.

As amostras de AH foram purificadas através de diálise utilizando membranas Spectra/Por 6000 – 8000 D, durante seis dias, em água deionizada.

Antes de serem utilizadas na purificação dos AH, as membranas de diálise foram devidamente tratadas para remoção de glicerina, traços de compostos

sulfurosos e metais pesados, seguindo o procedimento estabelecido por McPhie para remoção dessas impurezas:

1. Removeu-se a quantidade de tubos de diálise (aproximadamente 25 cm cada) necessária para o experimento e deixou-se ferver por 1 hora em 1 litro de etanol 50%, sempre manuseando os tubos com luvas cirúrgicas limpas.
2. Repetiu-se a operação seqüencialmente por períodos de 1 hora em outro volume igual de etanol 50%, em trocas de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA dissódico $0,001 \text{ mol L}^{-1}$.
3. Estocou-se a 4°C (geladeira) em água deionizada. Os tubos que secaram durante a estocagem foram descartados.
4. Antes do uso, os tubos foram rigorosamente enxaguados com água deionizada.

As amostras de AH, após a purificação foram liofilizadas em liofilizador Savant Speed Vac e estocadas para realização das análises espectroscópicas e químicas.

4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

Terminada a diálise, o AH foi liofilizado e procedeu-se então a análise do teor de cinzas. Tal procedimento consistiu na queima de aproximadamente 10 mg de AH livre de umidade por calcinação em cadinho de platina, a 600°C em mufla, durante 2 horas, sendo o teor de cinzas calculado por diferença entre massa final e inicial de cada amostra.

Valores altos de cinzas podem comprometer a interpretação da análise elementar e interfere na análise de ressonância magnética nuclear e ressonância paramagnética eletrônica. As medidas do teor de cinzas das amostras de AH foram realizadas antes das análises elementares.

O teor de cinzas foi calculado segundo a equação 4.1:

$$C = 100 \frac{m}{m_0} \quad (4.1)$$

em que: C = teor de cinzas (em %);

m = massa (em miligramas) da amostra calcinada;

m₀ = massa (em miligramas) da amostra não calcinada.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

4.9.1 MÉTODOS QUÍMICOS

4.9.1.1 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL

A determinação da porcentagem de carbono orgânico total foi realizada em triplicata para as amostras de solo inteiro. As medidas foram realizadas no equipamento Total Organic Carbon Analyzer, modelo TOC-V, marca Shimadzu, acoplado ao Solid Sample Module, SSM-500A, da marca Shimadzu, pertencente ao laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos (USP) – SP.

4.9.1.2 ANÁLISE ELEMENTAR (CHNS)

As análises químicas da composição elementar (C, H, N, S) para as amostras de AH foram realizadas em duplicata usando o equipamento CE – Instruments EA 1110, pertencente ao CAQUI (Centro de Análises Químicas), pertencente ao Instituto de Química de São Carlos (USP) – SP. O teor de Oxigênio foi obtido por diferença [%O = 100% - (C+H+N+S) - % teor de cinzas] (4.2).

Esse tipo de análise tem sido muito empregado na identificação de alterações na composição dos AH extraídos dos solos.

Os parâmetros H/C, O/C e C/N foram determinados pelas razões atômicas, ou seja, dividindo-se previamente as porcentagens em massa dos elementos por suas respectivas massas atômicas.

4.10 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

4.10.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

As análises de RPE foram feitas segundo metodologia descrita por (Martín-Neto et al., 1991). Os parâmetros experimentais foram: potência de microondas utilizada foi de 0,2 mW, amplitude de modulação de 1G_{pp} (Gauss pico a pico), frequência de modulação de 100 KHz e 16 varreduras para cada amostra.

As amostras de AH sólidas e liofilizadas foram colocadas em tubos de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno, com massa de AH em torno de 20 mg.

A concentração de radicais livres do tipo semiquinona (spin g⁻¹) foi obtida pela área dos sinais do radical livre através da integral dupla do espectro de RPE e utilizando a aproximação $I \times \Delta H^2$ (Poole & Farach, 1972), onde I corresponde à intensidade do sinal e ΔH a largura de linhas tomadas pico a pico. Após, comparou-se a um padrão denominado "Strong Pitch" com concentração de spins conhecidas (3×10^{15} spins cm⁻¹) fornecido pela Bruker. Também foi utilizado o rubi contendo 0,5% de Cr⁺³ como padrão secundário para detectar possíveis alterações no valor Q da cavidade ressonante. As quantidades de radicais livres do tipo semiquinona

foram normalizadas pela massa de cada amostra. Os resultados mostrados são a média de duas medidas realizadas nas mesmas condições.

As análises de RPE foram realizadas usando o espectrômetro EPR de onda contínua da Bruker, modelo EMX de cavidade ressonante retangular, operando em banda X (≈ 9 GHz), pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos – SP.

4.10.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

AS medidas foram feitas segundo metodologia bem estabelecida na literatura (Stevenson, 1994), utilizando-se pastilhas de 1 mg de AH para cada 100 mg de brometo de potássio (KBr). Efetuaram-se para cada análise, 32 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} . No momento da leitura dos espectros de FTIR procedeu-se à correção automática da linha base em 4.000, 2.000 e 400 cm^{-1} , igualando-se a zero.

As análises foram realizadas em um espectrômetro da Perkin-Elmer modelo Spectrum 1000, pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos – SP.

4.10.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL

Os AH foram dissolvidos em uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,05 mol L^{-1} com concentração de 20 mg L^{-1} e o pH igual a 8 (Milori et al., 2002). Essa concentração foi utilizada para minimizar o efeito de reabsorção de fluorescência e reduzir interação entre moléculas. Após o preparo das soluções, os

espectros de emissão de fluorescência, excitação e varredura sincronizada foram medidos utilizando-se o espectrômetro de luminescência Perkin Elmer modelo LS-50B. A abertura das fendas de entrada e de saída foi 10 nm e a velocidade de varredura foi de 500 nm/min.

Os espectros de fluorescência foram obtidos nos modos de emissão, excitação-emissão (3D) e varredura sincronizada, segundo as metodologias proposta por Zsolnay et al. (1999), Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999).

Na metodologia proposta por Zsolnay et al. (1999), mediu-se o espectro de emissão com excitação em 240 nm, intervalo de varredura entre 300 e 700 nm e filtro de 290 nm. A área sobre o maior quarto de emissão entre 570 e 641 nm (A_4), dividida pela área sobre o menor quarto entre 356 e 432 nm (A_1), denominado A_4/A_1 , foi utilizada como índice de humificação.

Na metodologia proposta por Milori et al. (2002), mediu-se o espectro de emissão com excitação em 465 nm, intervalo de varredura entre 480 e 700 nm e filtro de 290 nm. A determinação do índice de humificação foi baseada na absorção em 465 nm (A_{465}).

Na metodologia proposta por Kalbitz et al. (1999), foram obtidos espectros de varredura sincronizada entre 220 e 650 nm simultaneamente com excitação e emissão com filtro de 290 nm, tomando como diferença constante de comprimento de onda 55 nm ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). O índice de humificação (I_{468}/I_{374}) foi determinado a partir da razão entre as intensidades de fluorescência em 400 e 360 nm ou 470 e 360 nm.

Os espectros de excitação-emissão (3D) foram adquiridos no intervalo de varredura entre 240 a 700 nm para emissão e 220 a 510 nm para excitação. Foram

obtidos sem filtro, com um incremento de excitação de 10 nm totalizando 30 varreduras.

O índice R_{3D} obtido através da MEE foi baseado no cálculo da razão entre a intensidade máxima de fluorescência relativa situada no centro das curvas de nível (470 nm) e a intensidade de fluorescência relativa (IFR) da última curva de nível (320 nm), dos pares de comprimentos de onda excitação-emissão (PCEE) do máximo do pico principal da região característica para avaliação do grau de humificação.

4.10.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ^{13}C RMN em estado sólido foram obtidos utilizando a seqüência de C^{13} RMN, CP com amplitude variável (VA) e MAS, empregando uma sonda de sólido da Doty. A frequência de ressonância foi 100,58 MHz (^{13}C), a banda espectral utilizada para a CP foi de 50 kHz, tempo de contato de 1 ms, tempo de relaxação de espera de 500 ms, tempo de aquisição de 0,0128 ms. A varredura foi de 0-230 ppm. As amostras de AH purificado foram medidas em rotores cilíndricos de zircônia com diâmetro de 5 mm carregados com aproximadamente 100 mg da amostra, com MAS de 6,4 KHz. A rampa no canal de ^1H foi de 110 a 60% (em KHz) da condição de Hartman-Hahn (Novotny, 2002). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao tetrametilsilano e foi utilizado hexametilbenzeno (HMB) como referência externa. A aquisição de cada espectro de AH em CP/MAS ocorreu em um período de 2 horas.

Os espectros foram divididos em 7 regiões: 0 – 45 ppm (alifáticos não substituídos), 45 – 60 ppm (metoxil e N-alifáticos), 60 – 110 ppm (O-alifáticos), 110 – 140 ppm (aromáticos), 140 – 160 ppm (fenólicos), 160 – 185 ppm (carboxílicos) e

185 – 230 ppm (carbonílicos), integrando-se as áreas e calculando-se a intensidade de cada região em relação à área total do espectro.

As porcentagens de aromaticidade e alifaticidade foram calculadas a partir das áreas dos espectros, segundo Stevenson (1994):

$$\text{Aromaticidade (\%)} = \frac{\text{área dos sinais de C aromáticos 110-160 ppm}}{\text{área dos sinais de C 0-160 ppm}} \times 100 \quad (4.3)$$

$$\text{Alifaticidade (\%)} = \frac{\text{área dos sinais de C alifáticos 0-110 ppm}}{\text{área dos sinais de C 0-160 ppm}} \times 100\% \quad (4.4)$$

Os espectros de ^{13}C RMN de estado sólido foram obtidos em um espectrômetro Varian (Unity 400), que opera em 400 MHz para o ^1H , pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos – SP.

4.10.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

Para a realização das medidas de FIL, as amostras de solos foram secas ao ar, moídas e peneiradas em malha de 212 μm . Antes de serem submetidas à análise, as amostras foram colocadas em um porta amostra com janela de quartzo.

A montagem experimental do sistema de FIL é a mesma utilizada por Milori et al. (2006) e está mostrada na (Figura 3.11). A excitação da fluorescência é realizada através de um laser de argônio (Coherent – modelo Innova 90C), sintonizado na linha de 458 nm com uma potência de saída de 300 mW.

Conforme ilustra a Figura 3.11, na saída do laser existe um prisma para remover a fluorescência de fundo do gás. A fluorescência das amostras é coletada por uma lente convergente e focalizada sobre a fenda do monocromador da marca

CVI (1200 g mm⁻¹ e "blaze" em 500 nm). A detecção é feita através de uma fotomultiplicadora Hamamatsu com pico de resposta espectral de 530 nm e em seguida o sinal elétrico é amplificado por Lock-in e enviado para o sistema de aquisição de dados, controlado por um computador. A resolução espectral deste sistema para fluorescência de solos é em torno de 4 nm. Neste sistema a emissão de fluorescência espalhada é medida fornecendo informações sobre as estruturas presentes na superfície da amostra.

Foram realizadas duas medidas por amostra, sendo obtido um total de dois espectros de FIL para cada amostra de solo.

Após a obtenção desses dados, foi calculado o grau de humificação das amostras de solo inteiro, denominada H_{FIL}. A proposta de cálculo deste índice de humificação é a razão entre o valor da área (ACF) sob o espectro de emissão de fluorescência (com excitação em 458 nm) e o valor da concentração de carbono orgânico total (COT) presente na amostra de solo inteiro Milori et al. (2006).

$$H_{FIL} = \frac{ACF}{COT} \quad (4.5)$$

A razão entre ACF e COT visa normalizar a relação entre a intensidade de emissão e a concentração de fluoróforos presentes na MO da amostra. A adoção da área sobre a curva de fluorescência (ACF) como parâmetro para estimativa da humificação se baseia na metodologia para análise de fluorescência de AH em solução proposta por Milori et al. (2002), ou seja, o índice de humificação A₄₆₅.

As análises foram realizadas no Instrumento de FIL pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos – SP.

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO QUÍMICO DOS ÁCIDOS HÚMICOS

Os valores dos rendimentos obtidos na extração e fracionamento químico dos AH do solo sob os diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 5.1.

Através desta tabela, observou-se um baixo rendimento nas extrações e purificação dos AH independente do tipo de tratamento a que foram submetidas às amostras. Deve-se ressaltar que a quantidade de AH obtido em todos os tratamentos (exceto nas profundidades de 60-80 cm e 80-100 cm) foram suficientes para a realização das caracterizações através das técnicas de análise de FTIR, fluorescência, RMN e RPE.

O processo de extração do AH tem um rendimento expressivo até aproximadamente 60 cm de profundidade. Os rendimentos nas profundidades de 60-80 e 80-100 cm, em todos os tratamentos, foram muito baixos, tornando inviáveis as repetições das extrações das mesmas.

Tabela 5.1: Valores dos rendimentos da extração e fracionamento químico dos AH do solo sob os diferentes tratamentos.

Tratamentos	Profundidade (cm)	Massa inicial de solo (g)	Massa final de AH (g)	Rendimento das extrações (%)
SI	0 – 10	150,04 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01
	10 – 20	150,03 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,01
	20 – 40	150,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	40 – 60	150,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	60 – 80	150,11 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
	80 – 100	150,07 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
W100	0 – 10	200,12 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,15 ± 0,01
	10 – 20	200,69 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,12 ± 0,01
	20 – 40	200,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	40 – 60	200,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	60 – 80	200,19 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	80 – 100	200,35 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
E0	0 – 10	200,63 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	10 – 20	200,68 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01
	20 – 40	200,66 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01
	40 – 60	200,63 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	60 – 80	200,66 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	80 – 100	200,67 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
E33	0 – 10	200,03 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,01
	10 – 20	200,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	20 – 40	200,02 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01
	40 – 60	200,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	60 – 80	200,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
	80 – 100	200,08 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
E66	0 – 10	200,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	10 – 20	200,06 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	20 – 40	200,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01
	40 – 60	200,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	60 – 80	200,20 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	80 – 100	200,49 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
E100	0 – 10	200,10 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,13 ± 0,01
	10 – 20	200,10 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	20 – 40	200,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	40 – 60	200,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
	60 – 80	200,12 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	80 – 100	200,13 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01

5.2 MÉTODOS QUÍMICOS

5.2.1 TEOR DE CINZAS

Os valores obtidos para os teores de cinzas das amostras de AH do solo sob os diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 5.2:

Tabela 5.2: Teor de cinzas das amostras de AH extraídas dos solos submetidos sob diferentes tratamentos.

Tratamentos ⁽¹⁾	Profundidade (cm)	Massa Inicial de AH (mg)	Massa final de AH (mg)	Cinzas (%)
SI	0 – 10	9,40 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,13 ± 0,01
	10 – 20	9,20 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,17 ± 0,01
	20 – 40	9,50 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,11 ± 0,01
	40 – 60	9,20 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,17 ± 0,01
E0	0 – 10	9,90 ± 0,10	0,30 ± 0,10	3,03 ± 0,01
	10 – 20	9,00 ± 0,10	0,30 ± 0,10	3,33 ± 0,01
	20 – 40	10,10 ± 0,10	0,30 ± 0,10	2,97 ± 0,01
	40 – 60	9,70 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,06 ± 0,01
E33	0 – 10	9,30 ± 0,10	0,30 ± 0,10	3,22 ± 0,01
	10 – 20	9,70 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,06 ± 0,01
	20 – 40	10,20 ± 0,10	0,30 ± 0,10	2,94 ± 0,01
	40 – 60	10,40 ± 0,10	0,30 ± 0,10	2,88 ± 0,01
E66	0 – 10	10,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10	0,99 ± 0,01
	10 – 20	9,40 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,13 ± 0,01
	20 – 40	9,90 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,02 ± 0,01
	40 – 60	10,20 ± 0,10	0,30 ± 0,10	2,93 ± 0,01
E100	0 – 10	9,30 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,10 ± 0,01
	10 – 20	9,10 ± 0,10	0,30 ± 0,10	3,29 ± 0,01
	20 – 40	9,30 ± 0,10	0,40 ± 0,10	4,30 ± 0,01
	40 – 60	9,60 ± 0,10	0,20 ± 0,10	2,08 ± 0,01
W100	0 – 10	10,30 ± 0,10	0,30 ± 0,10	2,91 ± 0,01
	10 – 20	10,20 ± 0,10	0,30 ± 0,10	2,94 ± 0,01
	20 – 40	10,50 ± 0,10	0,40 ± 0,10	3,81 ± 0,01
	40 – 60	10,30 ± 0,10	0,40 ± 0,10	3,88 ± 0,01

⁽¹⁾SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Observando-se a Tabela 5.2, os teores de cinzas das amostras de AH nas profundidades entre 0-10 e 10–20 cm ficaram abaixo de 5%, o que foi considerado

satisfatório para as análises subseqüentes. Os baixos teores de cinzas encontrados, se devem, ao fato das amostras terem sido tratadas com HF/HCl no processo de purificação durante o processo de extração. Não foi possível a realização dos testes de cinzas das demais profundidades, devido ao pequeno rendimento das extrações, o que ocasionaria falta de amostras para as demais análises espectroscópicas.

5.2.2 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL

Os valores obtidos de carbono total (COT) são mostrados na Tabela 5.3 e na Figura 5.1. O resultado final foi obtido a partir da média aritmética de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 5.3: Dados de Carbono total das amostras de solo inteiro obtidos pelo método de COT.

Tratamentos ⁽¹⁾	Profundidade (cm)	Teor de Carbono %
SI	0 – 10	0,84 ± 0,03
	10 – 20	0,85 ± 0,02
	20 – 40	0,75 ± 0,01
	40 – 60	0,65 ± 0,02
	60 – 80	0,45 ± 0,01
	80 – 100	0,37 ± 0,02
W100	0 – 10	0,83 ± 0,02
	10 – 20	0,72 ± 0,02
	20 – 40	0,65 ± 0,01
	40 – 60	0,62 ± 0,01
	60 – 80	0,50 ± 0,01
	80 – 100	0,40 ± 0,01
E0	0 – 10	0,82 ± 0,02
	10 – 20	0,69 ± 0,02
	20 – 40	0,65 ± 0,02
	40 – 60	0,58 ± 0,02
	60 – 80	0,51 ± 0,01
	80 – 100	0,41 ± 0,01
E33	0 – 10	0,79 ± 0,01
	10 – 20	0,62 ± 0,01
	20 – 40	0,62 ± 0,02
	40 – 60	0,53 ± 0,02
	60 – 80	0,40 ± 0,01
	80 – 100	0,32 ± 0,01
E66	0 – 10	0,81 ± 0,02
	10 – 20	0,68 ± 0,02
	20 – 40	0,63 ± 0,01
	40 – 60	0,64 ± 0,01
	60 – 80	0,48 ± 0,01
	80 – 100	0,38 ± 0,01
E100	0 – 10	0,83 ± 0,02
	10 – 20	0,69 ± 0,01
	20 – 40	0,65 ± 0,01
	40 – 60	0,63 ± 0,04
	60 – 80	0,47 ± 0,01
	80 – 100	0,36 ± 0,01

⁽¹⁾SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Como pode ser observado na Tabela 5.3 e na Figura 5.1, houve uma redução na quantidade de COT com a profundidade do solo. No experimento com EET, não

houve variações significativas nos teores de carbono dos solos irrigados em relação ao solo sem irrigação, observando apenas um ligeiro decréscimo nos teores de carbono das camadas superficiais do solo.

Os efluentes podem alterar a taxa de decomposição da MO do solo, ocasionando diminuição nos teores de carbono, devido, o fato da taxa de mineralização ser altamente dependente do potencial de água no solo.

Assim, a irrigação com efluente, tem o potencial de modificar os processos de ciclagem do N e também do C, pelo fato de aumentar a água no solo para teores que estimulam a atividade de decomposição da matéria orgânica (Polglase et al., 1995; Falkiner & Smith, 1997).

Figura 5.1: Dados dos teores de carbono para as amostras de solo inteiro determinadas pelo método de COT.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

5.2.3 ANÁLISE ELEMENTAR

Os valores obtidos de porcentagem em massa de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O), e as razões atômicas C/N, O/C e H/C das amostras de AH, estão mostrados nas Tabelas 5.4 e 5.5.

Os parâmetros H/C, O/C e C/N foram determinados pelas razões atômicas, ou seja, dividindo-se previamente as porcentagens em massa dos elementos por suas respectivas massas atômicas.

A análise elementar é um método relevante para analisar amostras heterogêneas como os AH, fornecendo resultados satisfatórios com baixo desvio padrão. Para amostras de solos que são materiais bastante heterogêneos esse método se mostra insatisfatório, devido ao fato de se trabalhar com pequenas quantidades de amostra, influenciando na sua representatividade.

As análises elementares proporcionam informações sobre a distribuição dos principais elementos (C, H, N, S e O) nas SH. O conteúdo destes varia dependendo das condições que afetam a formação das SH dos solos: condições climáticas, tipo de solo, origem e composição de organismos do solo e resíduos vegetais (Stevenson, 1994; Schnitzer e Khan, 1978).

Tabela 5.4: Teor (em massa) de C, H, N, S e O das amostras de ácidos húmicos determinados pelo método de análise elementar.

Tratamentos ⁽¹⁾	Profundidade (cm)	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)
SI	0 – 10	48,7±0,9	5,2±0,4	5,2±0,1	1,1±0,7	38±2
	10 – 20	48,5±0,1	5,4±0,1	5,3±0,1	1,2±0,6	37,5±0,6
	20 – 40	48,6±0,3	5,4±0,3	5,9±0,2	1±1	37±2
	40 – 60	48,4±0,4	5,4±0,1	5,0±0,2	0,6±0,8	38,5±0,2
	60 – 80	46,0±0,2	4,9±0,4	5,5±0,6	2±1	-
	80 – 100	45,6±0,1	4,7±0,6	5,5±1,0	0	-
W100	0 – 10	48,2±0,1	5,5±0,1	5,0±0,1	1±2	37±2
	10 – 20	48,3±0,1	4,7±1,1	5,1±0,1	2,2±0,1	37±1
	20 – 40	47,9±0,4	5,9±0,5	5,3±0,1	2,1±0,9	35,0±0,9
	40 – 60	47,7±0,2	5,8±0,1	5,8±0,1	2,5±0,1	34,3±0,3
	60 – 80	47,3±0,1	5,8±0,1	5,8±0,1	2,4±0,3	-
	80 – 100	46,3±0,6	5,4±0,4	5,6±0,1	2,8±0,3	-
E0	0 – 10	49,5±0,2	6,8±0,1	5,2±0,1	0	35,5±0,4
	10 – 20	49,3±0,2	6,0±0,8	5,0±0,1	2,4±0,3	33,9±0,8
	20 – 40	47,7±0,9	5,9±0,7	5,1±0,5	1±2	36,9±0,2
	40 – 60	47,8±0,7	5,8±0,5	5,0±0,6	2,1±0,6	37±1
	60 – 80	46,9±0,1	5±2	4,9±0,1	1±2	-
	80 – 100	42,9±0,1	5±1	4,5±0,1	2,4±0,1	-
E33	0 – 10	47,5±0,1	5,3±0,7	5,2±0,1	2,0±0,2	36,8±0,8
	10 – 20	48,0±0,2	5,7±0,2	5,2±0,2	2,4±0,3	37±1
	20 – 40	46,4±0,1	4,7±0,2	5,5±0,1	1,4±0,7	39,0±0,3
	40 – 60	47,1±0,3	5,5±0,2	5,8±0,3	1,5±0,9	37,2±0,5
	60 – 80	46,5±0,9	5±1	5,0±0,7	1,5±0,8	-
	80 – 100	45,3±0,3	5,0±0,4	4,7±0,4	2±1	-
E66	0 – 10	49,4±0,2	5,7±0,2	5,1±0,1	2,4±0,3	36,4±0,2
	10 – 20	48,2±0,7	5,7±0,1	5,2±0,1	2,5±0,9	36±2
	20 – 40	48,3±0,1	6,1±0,5	5,6±0,1	2,3±0,8	35,7±0,4
	40 – 60	47,4±0,1	5,6±0,2	5,7±0,1	2,5±0,6	35,9±0,3
	60 – 80	47,0±0,5	5,3±0,6	5,1±0,5	2,5±0,1	-
	80 – 100	46,2±0,1	5,2±0,3	4,7±0,1	1±2	-
E100	0 – 10	49,0±0,1	5,9±0,5	4,9±0,1	1,8±0,3	36,3±0,1
	10 – 20	49,4±0,6	5,6±0,2	5,0±0,1	1,7±0,7	35±1
	20 – 40	48,4±0,1	6,1±0,3	5,3±0,2	1,5±0,3	34,4±0,8
	40 – 60	47,8±0,3	5,9±0,5	5,3±0,1	1±2	37,6±0,9
	60 – 80	47,1±0,1	5,8±0,4	5,2±0,1	1±2	-
	80 – 100	42,7±0,2	5,4±0,4	4,5±0,1	0	-

⁽¹⁾SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Tabela 5.5: Valores das razões atômicas C/N, O/C e H/C das amostras de ácidos húmicos obtidos através da determinação da composição elementar.

Tratamentos ⁽¹⁾	Profundidade (cm)	C/N	O/C	H/C
SI	0 - 10	10,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
	10 - 20	10,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
	20 - 40	9,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
	40 - 60	11,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
	60 - 80	9,8 ± 0,6	-	1,3 ± 0,1
	80 - 100	9,6 ± 0,9	-	1,2 ± 0,1
W100	0 - 10	11,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	10 - 20	11,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	20 - 40	10,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	40 - 60	9,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	60 - 80	9,5 ± 0,1	-	1,5 ± 0,1
	80 - 100	9,8 ± 0,1	-	1,4 ± 0,1
E0	0 - 10	11,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
	10 - 20	11,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	20 - 40	11,0 ± 0,4	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	40 - 60	11,1 ± 0,6	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	60 - 80	11,2 ± 0,1	-	1,4 ± 0,2
	80 - 100	11,1 ± 0,2	-	1,3 ± 0,2
E33	0 - 10	10,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1
	10 - 20	10,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	20 - 40	9,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	40 - 60	9,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	60 - 80	11,0 ± 0,6	-	1,2 ± 0,1
	80 - 100	11,4 ± 0,4	-	1,3 ± 0,1
E66	0 - 10	11,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	10 - 20	10,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	20 - 40	10,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	40 - 60	9,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	60 - 80	10,7 ± 0,4	-	1,4 ± 0,1
	80 - 100	11,6 ± 0,1	-	1,4 ± 0,1
E100	0 - 10	11,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	10 - 20	11,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	20 - 40	10,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	40 - 60	10,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1
	60 - 80	10,7 ± 0,1	-	1,5 ± 0,1
	80 - 100	11,0 ± 0,1	-	1,7 ± 0,1

⁽¹⁾SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

O conteúdo dos principais elementos constituintes encontrados nas amostras de AH sob os diferentes tratamentos variaram entre 42,7 - 49,5% para o C, 4,7 - 6,8% para o H, 4,5 - 5,8% para o N, 0 - 2,5% para o S e 33,9 - 38,5% para o O, de

acordo com a Tabela 5.4. Estes resultados estão de acordo com os resultados mostrados na literatura para AHs extraídos de solos (Schnitzer e Khan, 1978; Xiaoli et al., 2008).

A razão C/N fornece informações sobre o grau de incorporação de nitrogênio na estrutura húmica, e sobre o processo de humificação da MO. Esta razão deve ser constante para solos entre 10-12 (Kiehl, 1979; Stevenson, 1994). Uma alta razão C/N significa baixa incorporação de nitrogênio e baixo grau de humificação. Observou-se na Tabela 5.5 e Figura 5.2 que os valores obtidos para a razão C/N para todos os diferentes tratamentos encontram-se próximos dos intervalos referidos na literatura (Stevenson, 1994).

A razão H/C é freqüentemente associada ao grau de condensação ou de aromaticidade, e este, por sua vez, ao grau de humificação da MO, sendo que o aumento desta para valores acima de um implica em uma diminuição da aromaticidade nas amostras (Bravard e Righi, 1991). Observou-se na Tabela 5.5 que esta razão é maior que um em todos os tratamentos, indicando maior percentual de grupos alifáticos, típicos de materiais menos humificados (Stevenson, 1994; Xiaoli et al., 2008).

De acordo com a Figura 5.2, não foram observadas diferenças significativas na razão C/N entre os tratamentos, notando-se que o tratamento sem irrigação apresentou um valor de razão C/N um pouco menor em relação aos demais tratamentos submetidos à aplicação de águas residuárias e água de consumo.

A razão O/C indica o teor de grupos oxigenados na molécula, como grupos metoxílicos, carboxílicos, fenólicos e álcoois, e, portanto, é um indicador do grau de oxidação (Visser, 1984). Em todos os casos esta razão foi similar, com valor variando entre 0,5 e 0,6, sem indicar efeito dos diferentes tratamentos.

Figura 5.2: Valores da razão C/N obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Não foi possível a realização dos testes de cinzas das profundidades entre 60-80 e 80-100 cm, devido ao pequeno rendimento das extrações, o que ocasionaria falta de amostras para as demais análises espectroscópicas. Sendo assim nestas profundidades para todos os tratamentos empregados não foi possível calcular a porcentagem em massa de oxigênio e nem a razão atômica O/C.

5.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

5.3.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Uma das principais informações a respeito das SH é o grau de humificação, assim a identificação de um parâmetro que caracterize esse estágio de humificação tem sido objeto de muitos estudos (Novotny, 2002). Um dos dados mais importantes obtidos a partir dos espectros de RPE é a concentração de radicais livres do tipo semiquinona (RLS) (Riffaldi e Schnitzer, 1972; Martin-Neto et al., 1991) que é um dos poucos parâmetros que reflete essa propriedade intrínseca das SH.

A concentração de radicais livres orgânicos em SH é medida na forma de concentração de spins por grama de amostra ou por grama de C, e é um parâmetro utilizado na estimativa do grau de humificação (Martin-Neto et al., 1998).

O sinal do radical livre orgânico das SH, dado por RPE é atribuído a radicais livres do tipo semiquinona. Quanto maior a concentração de RLS, maior a humificação da MO (Senesi, 1990; Martin-Neto et al., 1991, 1998). Normalmente, o caráter mais humificado está relacionado com a formação de compostos mais condensados que favorecem a estabilização destes radicais (Leinweber et al., 1993).

Os valores obtidos a partir dos espectros de RPE para o número de spin g^{-1} de C x (10^{17}) de AH de RLS são apresentados na Tabela 5.6 e na Figura 5.3.

Tabela 5.6: Valores da concentração de radicais livres do tipo semiquinona das amostras de AH, extraídos dos solos sob os diferentes tratamentos.

Tratamentos ⁽¹⁾	Profundidade (cm)	n° spins g ⁻¹ de C x (10 ¹⁷)
SI	0 – 10	7,6 ± 0,2
	10 – 20	6,2 ± 0,1
	20 – 40	7,5 ± 0,2
	40 – 60	10,10 ± 0,03
W100	0 – 10	1,34 ± 0,02
	10 – 20	1,76 ± 0,07
	20 – 40	2,67 ± 0,09
	40 – 60	4,0 ± 0,2
E0	0 – 10	3,5 ± 0,2
	10 – 20	6,7 ± 0,2
	20 – 40	10,30 ± 0,02
	40 – 60	8,5 ± 0,2
E33	0 – 10	1,27 ± 0,01
	10 – 20	2,7 ± 0,1
	20 – 40	3,9 ± 0,1
	40 – 60	6,9 ± 0,4
E66	0 – 10	4,95 ± 0,09
	10 – 20	6,2 ± 0,1
	20 – 40	8,52 ± 0,02
	40 – 60	10,10 ± 0,03
E100	0 – 10	4,2 ± 0,2
	10 – 20	7,8 ± 0,2
	20 – 40	7,9 ± 0,3
	40 – 60	12,20 ± 0,07

⁽¹⁾SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Os valores encontrados na literatura para a concentração de RLS para AH de solo segundo (Martin-Neto et al., 1998; Scott et al., 1998) foram respectivamente 7,2 e $4,55 \times 10^{17}$ spin g⁻¹ de C. A partir dos dados obtidos por RPE (Tabela 5.6) foi observado que a concentração de RLS variou de 1,27 a $12,2 \times 10^{17}$ spin g⁻¹ de C para as amostras de AH analisadas. Os tratamentos E66 e E100 apresentaram maior concentração de RLS do que os demais tratamentos, e, esse fato pode estar relacionado aos AHs desses tratamentos apresentarem compostos com maior grau

de condensação aromática, maior concentração de RLS e conseqüentemente maior grau de humificação da MO.

Além disso, foi observado também que a concentração de RLS foi maior para as amostras de AH extraídas para os solos submetidos à aplicação de águas residuárias do que para o solo submetido à aplicação de água de consumo.

A partir dos resultados obtidos por RPE (Figura 5.3), observou-se um incremento na concentração de RLS em profundidade para todos os tratamentos, visto que a concentração de RLS é proporcional ao grau de humificação. Outra tendência observada é a menor concentração de RLS na camada mais superficial o que pode ser atribuído ao maior aporte de resíduos vegetais frescos na superfície.

Figura 5.3: Concentração de radicais livres do tipo semiquinona em spins (g de C)⁻¹ para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

O tratamento SI apresentou elevada concentração de RLS comparado ao tratamento W100. Os tratamentos irrigados com águas residuárias apresentaram um aumento na concentração de RLS, com o aumento da adubação, exceto o tratamento E33.

Comparando-se os tratamentos E100 e W100, a aplicação das águas residuárias leva a um aumento mais significativo da atividade microbiana e conseqüente degradação da MOS, aumentando a concentração de RLS e o grau de humificação dos AH do solo.

Não foi possível a realização das medidas de RPE para todos os tratamentos empregados nas profundidades entre 60-80 e 80-100 cm, devido ao pequeno rendimento obtido nas extrações nestas profundidades.

5.3.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Foram obtidos espectros de FTIR das amostras de AH dos seis tratamentos estudados em todas as profundidades do solo estudadas.

Esses experimentos foram realizados a fim de se obter informações a respeito da composição dos grupos funcionais dos AH extraídos das amostras de solo.

Os espectros de FTIR foram interpretados de acordo com vários autores (Nakanishi, 1962; Piccolo; Stevenson, 1982; Bloom; Leenheer, 1989; Silverstein; Bassler; Morril, 1994; Canellas et al., 2001; Polak et al., 2005). A análise dos resultados consiste fundamentalmente na correlação, pico a pico, entre o espectro observado e as bandas dos grupos funcionais caracterizados e identificados na literatura.

Os espectros na região do infravermelho (modo absorbância) para os AH extraídos dos solos para todos os tratamentos estão apresentados nas Figuras 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9.

Figura 5.4: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 0-10 cm.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Figura 5.5: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 10-20 cm.

Figura 5.6: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 20-40 cm.

Figura 5.7: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 40-60 cm.

Figura 5.8: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 60-80 cm.

Figura 5.9: Espectros de FTIR das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias, submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 80-100 cm.

Em todos os casos, os espectros são semelhantes, não sendo observadas diferenças significativas entre os espectros de AH nos diferentes tratamentos e diferentes profundidades.

De maneira geral, observou-se nos espectros de FTIR uma larga banda e intensa em 3370 cm^{-1} associada ao estiramento O-H de fenóis, álcoois, além de água, presente como impureza e também associada ao estiramento N-H; banda em 2928 cm^{-1} , devido a estiramento simétrico e assimétrico de C-H alifático de grupos metileno e metil, indicando a presença de cadeias alifáticas nos AH.

Observou-se também uma banda de absorção em 2854 cm^{-1} , também atribuída ao estiramento C-H alifático, mas característica dos grupos CH_2 .

Foi observada na região de 1718 cm^{-1} , uma banda que foi atribuída, ao estiramento C=O de grupos carboxílicos (COOH). A banda próxima a 1656 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de C=O de amidas e quinonas e de cetonas conjugadas com ligação de hidrogênio. Essa banda também pode ser atribuída ao estiramento simétrico de C=O de íons carboxilatos (COO^-), que é resultado da desprotonação de grupos carboxílicos.

Uma banda na região de 1542 cm^{-1} é associada aos estiramentos C=C de anéis aromáticos. A banda próxima a 1452 cm^{-1} também é atribuída ao estiramento C=C aromático.

Observou-se a banda próxima à região de 1236 cm^{-1} que é atribuída ao estiramento simétrico de C-O e deformação OH dos COOH . A banda próxima de 1046 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de C-O de estruturas polissacarídicas e estiramento Si-O de impurezas do tipo silicato.

Os grupos funcionais determinados pela espectroscopia de FTIR mostram que os AH são compostos por alguns grupos, tais como hidroxilas, aminas, alquilas,

carbonílicos e carboxílicos, ligados tanto a cadeias alifáticas como a anéis aromáticos.

Comparando-se os diferentes tratamentos, não foram encontradas diferenças significativas na composição dos grupos funcionais nos resultados de FTIR para os AH.

5.3.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-VISÍVEL

A espectroscopia de fluorescência tornou-se amplamente reconhecida como uma técnica relativamente simples, útil e sensível no estudo de grupos funcionais e de estrutura química de amostras do meio ambiente, tais como, o AH de solos. É uma das poucas técnicas que investiga as SH em concentrações e condições naturais, fornecendo assim, informações estruturais das moléculas que as compõe.

Os espectros de fluorescência das SH são obtidos pela soma dos espectros dos diferentes tipos de fluoróforos nelas presentes, consequência da heterogeneidade das mesmas e complexidade molecular (Narimoto, 2006).

As principais vantagens do emprego desta técnica são a alta sensibilidade e seletividade, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados. Nas SH, os principais fluoróforos presentes, grupos capazes de absorver e emitir energia na forma de luz são sistemas com alto grau de conjugação, como, por exemplo, grupos do tipo quinona e anéis aromáticos.

Os experimentos de fluorescência foram realizados a fim de se avaliar o grau de humificação das SH, baseados nas metodologias sugeridas na literatura propostas por Zsolnay et al. (1999), Kalbitz et al. (1999) e Milori et al. (2002).

5.3.3.1 Espectros de emissão

Os espectros de emissão de fluorescência das amostras de AH medidos com excitação em 240 nm e 465 nm estão mostrados nas Figuras 5.10 e 5.12.

Figura 5.10: Espectros de emissão de fluorescência das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, com comprimento de onda de excitação ($\lambda_{ex} = 240 \text{ nm}$), nas camadas: (a) 0-10 cm; (b) 10-20 cm; (c) 20-40 cm; (d) 40-60 cm; (e) 60-80 cm; (f) 80-100 cm.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 cm.

A bem conhecida heterogeneidade das SH fornece espectros de fluorescência que podem ser utilizados como critério de diagnóstico válido para se distinguirem aspectos baseados na sua natureza, origem e gênese. Por outro lado, esta mesma complexidade representa um obstáculo para a identificação de componentes estruturais individuais responsáveis pela fluorescência Senesi et al. (1991).

Os espectros de emissão com excitação em 240 nm das amostras de AHs extraídos dos solos mostrados na Figura 5.10 apresentam uma banda larga, cujo máximo de intensidade ocorre próximo a 510 nm.

A fluorescência de AH em comprimentos de onda longos, como neste caso, é associada a sistemas insaturados conjugados (hidrocarbonetos aromáticos condensados tipo tetraceno, de estrutura cíclica, de estrutura linear ou perileno), e/ou núcleos aromáticos altamente substituídos por grupos carbonila (C=O) e carboxílicos (COOH) (Lumb, 1978; Senesi, 1992; Rivero et al., 1998; Olk, Brunetti, Senesi 1999).

Amostras com menor intensidade de fluorescência representam menor grau de humificação e menor conteúdo de núcleos aromáticos altamente substituídos por grupos COOH e C=O, e/ou a sistemas insaturados conjugados (Narimoto, 2006).

A metodologia proposta por Zsolnay et al. (1999), é que, se as moléculas fluorescentes tornam-se mais condensadas, seus espectros de emissão com excitação em 240 nm e intervalo de varredura entre 300 e 700 nm, tenderão a exibir um deslocamento sobre maiores comprimentos de onda. O espectro de emissão total foi dividido em 4 partes e o grau de humificação foi calculado através da razão entre as áreas do último quarto (570-641 nm) e primeiro quarto (356-432 nm). Essa razão A_4/A_1 pode ser usada como índice de humificação. A idéia básica de Zsolnay

e colaboradores é que a humificação da MO leva à condensação de anéis aromáticos e este processo faz com que a fluorescência deste grupo se desloque para o vermelho (Haken and Wolf, 1995; Kumke et al., 1995).

Portanto, a área do último quarto corresponde à fluorescência de estruturas mais humificadas e a área do primeiro quarto seriam oriundas de estruturas mais simples.

Figura 5.11: Valores do índice de humificação (A_4/A_1) obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela metodologia de Zsolnay (1999).

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

A partir dos resultados obtidos para o índice de humificação A_4/A_1 proposto por Zsolnay et al. (1999) e pela Figura 5.11, observou-se um incremento no grau de humificação em profundidade para todos os tratamentos. Verificou-se também que o

índice de humificação é maior quanto maior for a área na região de maiores comprimentos de onda.

O método proposto por Milori et al. (2002) consiste em medir o espectro de emissão com excitação em 465 nm (luz azul) e intervalo de varredura entre 480 e 700 nm. Esta absorção é mais ressonante com estruturas cuja concentração aumenta com o avanço do processo de humificação da MO. Portanto, nesta proposta a área total sob o espectro de emissão de fluorescência com excitação em 465 nm (em condições experimentais idênticas: pH = 8 e concentração = 20 mg L⁻¹), é proporcional ao grau de humificação e foi denominada de índice de humificação A_{465} .

Figura 5.12: Espectros de emissão de fluorescência das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, com comprimento de onda de excitação (λ_{ex} = 465 nm), nas camadas: (a) 0-10 cm; (b) 10-20 cm; (c) 20-40 cm; (d) 40-60 cm; (e) 60-80 cm; (f) 80-100 cm.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 cm.

Os espectros de emissão com excitação em 465 nm mostrados na Figura 5.12 apresentam uma única banda larga centrada em 520 nm.

Figura 5.13: Valores do índice de humificação A_{465} obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela metodologia de Milori (2002).

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Foi observado pela Figura 5.13 e a partir dos resultados obtidos para o índice de humificação A_{465} um aumento no grau de humificação em profundidade para todos os tratamentos. Também foi verificado que quanto maior for a área total sobre o espectro, maior foi o índice de humificação A_{465} .

5.3.3.2 Espectros de varredura sincronizada

Na metodologia proposta por Kalbitz et al. (1999), mediu-se o espectro de varredura sincronizada com diferença constante entre excitação e emissão ($\Delta\lambda = 55$ nm) e intervalo de varredura entre 220 e 650 nm, permitindo a avaliação do grau de humificação dos AH extraídos dos solos. De acordo com este método, os espectros de fluorescência de varredura sincronizada dos AH apresentam dois picos em torno de 360 e 400 nm, e um ombro em torno de 470 nm. Esses perfis mudam dependendo do grau de humificação, e isto pode ser medido através da razão entre os picos de fluorescência.

A região do espectro com comprimentos de onda mais para o vermelho (maior comprimento de onda), é associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados, ou sistemas insaturados conjugados com elétron bastante delocalizado. A região mais para o azul (menor comprimento de onda) é associada a compostos mais simples. Então, a razão entre a intensidade de fluorescência em 400 e 360 nm, ou 470 e 360 nm pode ser usada para medir o grau de humificação das SH. No caso do presente estudo foi possível a identificação de dois picos médios, um em 468 nm e outro em 374 nm, e com isso usar a razão I_{468}/I_{374} como índice de humificação.

Os espectros de varredura sincronizada de fluorescência das amostras de AH medidos com diferença de comprimento de onda de emissão e excitação ($\Delta\lambda = 55$ nm) estão mostrados na Figura 5.14.

Figura 5.14: Espectros de varredura sincronizada de fluorescência das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, com comprimento de onda de emissão e excitação ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 55 \text{ nm}$), nas camadas: (a) 0-10 cm; (b) 10-20 cm; (c) 20-40 cm; (d) 40-60 cm; (e) 60-80 cm; (f) 80-100 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 cm.

Os espectros de varredura sincronizada das amostras de AH mostrados na Figura 5.14 apresentam dois picos, um intenso em 468 nm e outro em 374 nm.

Figura 5.15: Valores do índice de humificação (I_{468}/I_{374}) obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela metodologia de Kalbitz (1999).

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

A partir dos resultados obtidos para o índice de humificação I_{468}/I_{374} proposto por Kalbitz et al. (1999) e pela Figura 5.15, observou-se a mesma tendência das metodologias anteriores, um incremento no grau de humificação em profundidade para todos os tratamentos utilizados.

É importante enfatizar que os três métodos baseados na espectroscopia de fluorescência são diferentes. Enquanto Zsolnay et al. (1999) usa excitação no ultravioleta, onde vários fluoróforos das SH são excitados, a metodologia de Milori et

al. (2002) exclui grande parte deles, atuando em grupos específicos, sendo, portanto mais seletiva. A diferença entre estes grupos pode ser visualizada através do formato dos espectros de emissão com excitação em 240 nm (Figura 5.10) e 465 nm (Figura 5.12).

De maneira geral, a partir dos resultados obtidos através das três metodologias empregadas para obtenção dos índices de humificação, observando-se as Figuras 5.11, 5.13 e 5.15, a irrigação com águas residuárias não afetou os AH das camadas superficiais, mas causou um ligeiro aumento do grau de humificação em profundidade.

A análise espectroscópica dos AH extraído dos solos permitiu a obtenção dos índices de humificação através da espectroscopia de fluorescência utilizando as metodologias propostas por Zsolnay et al. (1999), Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999).

As correlações entre os índices de humificação obtido pelas diferentes metodologias de fluorescência empregadas foram significativas, e estão apresentadas nas Figuras 5.16, 5.17 e 5.18. Nas figuras a seguir, R é o coeficiente de correlação e P indica o quanto é significativa essa correlação.

Figura 5.16: Correlação entre a metodologia de Milori et al. (2002) e Zsolnay et al. (1999).

Figura 5.17: Correlação entre a metodologia de Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999).

Figura 5.18: Correlação entre a metodologia de Kalbitz et al. (1999) e Zsolnay et al. (1999).

5.3.3.3 Espectros tridimensionais de fluorescência - matriz excitação-emissão (MEE)

Os espectros de fluorescência tridimensionais no modo matriz excitação-emissão (ou curvas de nível) dos AH estão representados nas Figuras de 5.19 a 5.54. Todos foram feitos a partir da dissolução das amostras de ácido húmico em uma solução de NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ com concentração 20 mg L^{-1} , conforme descrito no item 4.10.3 (materiais e métodos). Nas Figuras de 5.19 a 5.24 são mostrados os espectros do tratamento SI em ordem crescente de profundidade. Os demais tratamentos são mostrados na seguinte seqüência: W100 da Figura 5.25 a 5.30; E0 da Figura 5.31 a 5.36; E33 da Figura 5.37 a 5.42; E66 da Figura 5.43 a 5.48 e E100 da Figura 5.49 a 5.54.

Figura 5.19: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).

Figura 5.20: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).

Figura 5.21: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).

Figura 5.22: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).

Figura 5.23: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).

Figura 5.24: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo sem aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM).

Figura 5.25: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 0-10 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.

Figura 5.26: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 10-20 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.

Figura 5.27: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 20-40 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.

Figura 5.28: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 40-60 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.

Figura 5.29: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 60-80 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.

Figura 5.30: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 80-100 cm. W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM.

Figura 5.31: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.

Figura 5.32: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.

Figura 5.33: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.

Figura 5.34: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.

Figura 5.35: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.

Figura 5.36: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E0: irrigação com efluente e 0% da FNM.

Figura 5.37: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.

Figura 5.38: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.

Figura 5.39: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.

Figura 5.40: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.

Figura 5.41: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.

Figura 5.42: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E33: irrigação com efluente e 33% da FNM.

Figura 5.43: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.

Figura 5.44: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.

Figura 5.45: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.

Figura 5.46: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.

Figura 5.47: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.

Figura 5.48: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E66: irrigação com efluente e 66% da FNM.

Figura 5.49: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 0-10 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Figura 5.50: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 10-20 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Figura 5.51: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 20-40 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Figura 5.52: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 40-60 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Figura 5.53: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 60-80 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Figura 5.54: Espectro de fluorescência total no modo matriz excitação-emissão (ou curva de nível) obtido para o AH extraído do solo submetidos à aplicação de águas residuárias, na camada de 80-100 cm. E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Os valores de intensidade de emissão de fluorescência seguem as escalas de cores colocadas no lado direito das figuras e aparecem sob a forma de curvas de nível.

Os espectros de fluorescência tridimensionais também mostraram informações interessantes. De forma geral, observou-se que a excitação em 470 nm leva a um máximo de emissão em 530 nm. Entretanto a excitação em 320 nm, também contribui para esta emissão.

A fluorescência dos AH de um mesmo tratamento aumenta com a profundidade (Figura 5.55). Embora pareça que este aumento seja uniforme, pode-se ver pela relação entre os picos (Tabela 5.7) que ocorrem leves deformações espectrais relativas às mudanças estruturais do AH.

Tabela 5.7: Dados referentes ao índice R_{3D} obtido por matrizes de fluorescência de excitação-emissão das amostras de AH.

Tratamentos ⁽¹⁾	Profundidades (cm)	R_{3D}
SI	0 – 10	$2,07 \pm 0,05$
	10 – 20	$1,94 \pm 0,05$
	20 – 40	$2,03 \pm 0,05$
	40 – 60	$2,13 \pm 0,06$
	60 – 80	$2,16 \pm 0,06$
	80 – 100	$2,18 \pm 0,06$
W100	0 – 10	$2,02 \pm 0,05$
	10 – 20	$2,20 \pm 0,06$
	20 – 40	$2,10 \pm 0,05$
	40 – 60	$2,13 \pm 0,06$
	60 – 80	$2,20 \pm 0,05$
	80 – 100	$2,64 \pm 0,06$
E0	0 – 10	$2,30 \pm 0,06$
	10 – 20	$2,29 \pm 0,06$
	20 – 40	$2,17 \pm 0,06$
	40 – 60	$2,10 \pm 0,06$
	60 – 80	$2,29 \pm 0,06$
	80 – 100	$2,36 \pm 0,06$
E33	0 – 10	$2,04 \pm 0,05$
	10 – 20	$2,10 \pm 0,05$
	20 – 40	$1,76 \pm 0,05$
	40 – 60	$2,33 \pm 0,06$
	60 – 80	$2,17 \pm 0,06$
	80 – 100	$2,22 \pm 0,06$
E66	0 – 10	$2,14 \pm 0,06$
	10 – 20	$1,93 \pm 0,05$
	20 – 40	$2,06 \pm 0,06$
	40 – 60	$1,92 \pm 0,05$
	60 – 80	$2,12 \pm 0,06$
	80 – 100	$2,10 \pm 0,05$
E100	0 – 10	$2,46 \pm 0,06$
	10 – 20	$2,49 \pm 0,06$
	20 – 40	$2,28 \pm 0,06$
	40 – 60	$2,35 \pm 0,06$
	60 – 80	$2,23 \pm 0,06$
	80 – 100	$2,64 \pm 0,07$

⁽¹⁾SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Entre os tratamentos, a irrigação com água de consumo e 100% da adubação (W100) sofre um aumento sutil da intensidade de emissão com um pequeno

aumento da contribuição das estruturas excitadas em 470 nm, quando comparada com o sistema sem irrigação (SI). Ou seja, a irrigação com água promove um aumento da concentração de estruturas fluorescentes e, segundo a Tabela 5.7, privilegia o acúmulo de estruturas mais humificadas em profundidade.

Se forem comparados os tratamentos W100 e E100, a aplicação das águas residuárias leva a um aumento significativo na intensidade de emissão de fluorescência em todas as profundidades (~30%). Pela relação entre os picos (R_{3D}), mostrada na tabela 5.7, a irrigação com águas residuárias modifica as estruturas nas camadas superficiais, promovendo um aumento de estruturas mais complexas cuja excitação é em 470 nm. Portanto, a irrigação com águas residuárias acarreta um aumento na concentração de estruturas fluorescentes em geral, e privilegia a concentração de estruturas mais complexas ou humificadas na superfície.

Uma hipótese para explicar estes comportamentos seria que a irrigação com águas residuárias leva a um aumento mais significativo da atividade microbiana e conseqüente degradação da matéria orgânica do solo, aumentando a quantidade e o grau de humificação dos AH do solo. Embora, também ocorra o deslocamento de substâncias húmicas solúveis em função da irrigação, os ácidos húmicos parecem ficar mais retidos nas camadas superficiais, provavelmente em função da formação de complexos de MO e argila originados pela presença mais abundante de metais nas águas residuárias, e este é o efeito dominante neste processo.

Pelos espectros em 2D, o aumento do grau de humificação também foi observado, mas os espectros em 3D permitiram visualizar de forma mais clara o aumento significativo na concentração de AH do solo (Figura 5.55).

Figura 5.55: Valores do índice R_{3D} obtidos para os AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo pela MEE.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Em todas as amostras de AH analisadas, verificou-se que a posição dos PCEE não apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos empregados ($\lambda_{\text{excitação máximo}} = 470 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão máximo}} = 530 \text{ nm}$).

5.3.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Experimentos de ^{13}C RMN foram realizados em laboratório, a fim de se obter informações sobre a composição de grupos funcionais dos AH extraídos dos solos sob diferentes tratamentos.

As possíveis atribuições dos sinais foram baseadas no conhecimento acumulado pela ^{13}C RMN em AH e solos nos trabalhos dos seguintes autores (Wilson, 1984, 1987; Schnitzer e Preston, 1986; Preston et al., 1994, 1996; Kögel-Knaber, 1997; Schulten e Schnitzer, 1997; Veeman, 1997; Zech et al, 1997).

Os espectros de ^{13}C RMN VACP/MAS das amostras de AH obtidos para os diferentes tratamentos são apresentados nas Figuras 5.56 e 5.57.

Figura 5.56: Espectros de ^{13}C RMN das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 0-10 cm.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Figura 5.57: Espectros de ^{13}C RMN das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo, na camada de 10-20 cm.

De um modo geral, os espectros de ^{13}C RMN VACP/MAS de todas as amostras de AH analisadas foram semelhantes. Os AH são substâncias com alta massa molecular, de estrutura complexa que apresentam bandas largas nos espectros de RMN como mostrados nas Figuras 5.56 e 5.57.

Nos espectros mostrados observam-se principalmente os máximos das seguintes bandas (Preston, 1996; Stevenson, 1994; Schnitzer e Preston, 1986; Celi et al., 1997).

Na primeira região dos espectros (0 - 45 ppm), as amostras de AH apresentam dois picos em 25 e 30 ppm, característicos de grupos metileno e metil.

A segunda região dos espectros (45 – 60 ppm) é caracterizada por um pico bem definido a 55 ppm, típicos de ésteres e éteres alifáticos (metoxílicos) e N-alifáticos.

A terceira região dos espectros (60 – 110 ppm) apresenta um pico em 71 ppm, característico de C alifáticos ligados a grupos éter e de anéis de polissacarídeos, e um pico em 104 ppm, atribuído a C ligado a dois átomos de oxigênio e a C anomérico em polissacarídeos.

Na quarta região dos espectros característica de C aromáticos (110 – 140 ppm), as amostras apresentam um pico em 128 ppm, atribuído a C aromáticos não substituídos ou alquil substituídos.

Na quinta região dos espectros (140 – 160 ppm), as amostras apresentam um pico duplo em 148 e 152 ppm, referente a C fenólicos ou O-aromáticos, podendo ter também contribuições de C aromáticos contendo nitrogênio ou grupos éter.

Na sexta região dos espectros (160 – 185 ppm), é possível observar um pico centrado em 172 ppm, atribuído a C de grupos carboxílicos.

Na sétima região dos espectros (185 – 230 ppm), aparece um pico de baixa intensidade em 196 ppm, associado ao C carbonílico de aldeídos e cetonas.

Nas Tabelas 5.8 e 5.9 mostram-se os percentuais de aromaticidade e alifaticidade, calculados a partir dos espectros de RMN e mostram-se também os percentuais dos grupos funcionais associados às bandas correspondentes: grupos alifáticos (0 – 45 ppm), N-alifáticos e metoxílicos (45 – 60 ppm), O-alifáticos (60 – 110 ppm), aromáticos (110 – 140 ppm), O-aromáticos (140 – 160 ppm), carboxílicos (160 – 185 ppm) e carbonílicos (185 – 230 ppm).

Tabela 5.8: Porcentagem de aromaticidade e alifaticidade das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS das amostras de AH.

Tratamentos ⁽¹⁾	Aromaticidade (%)	Alifaticidade (%)
SI A1	19,2	80,8
SI A2	19,4	80,6
W100 A1	19,4	80,6
W100 A2	17,6	82,4
E0 A1	20,9	79,1
E0 A2	20,7	79,3
E33 A1	19,4	80,6
E33 A2	18,2	81,8
E66 A1	19,2	80,8
E66 A2	19,9	80,1
E100 A1	20,6	79,4
E100 A2	19,4	80,6

⁽¹⁾SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

As profundidades variam de 0–20 cm, onde: A1: 0-10; A2: 10-20 cm.

Tabela 5.9: Intensidades relativas (porcentagem da área total) das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS de amostras sólidas de AH.

Tratamentos	0-45	45-60	60-110	110-140	140-160	160-185	185-230
SI A1	26,0	12,5	25,0	14,4	4,8	11,5	5,8
SI A2	24,7	10,8	24,7	14,0	5,4	12,9	7,5
W100 A1	25,8	11,6	26,5	13,2	6,2	11,1	5,6
W100 A2	27,3	10,6	23,7	12,1	5,5	12,1	8,7
E0 A1	26,8	13,2	26,2	14,9	6,0	10,9	2,0
E0 A2	23,7	12,0	26,0	14,9	5,8	12,7	4,9
E33 A1	26,9	13,0	26,3	13,3	6,1	11,3	3,1
E33 A2	28,9	11,4	24,8	12,6	5,6	12,2	4,5
E66 A1	25,5	11,5	26,6	12,9	6,3	11,2	6,0
E66 A2	25,5	13,0	25,2	14,0	5,9	12,3	4,1
E100 A1	24,7	13,1	26,5	14,4	6,2	11,0	4,1
E100 A2	24,9	11,9	24,9	14,1	5,3	12,6	6,3

Os dados de ^{13}C RMN VACP/MAS confirmam a grande heterogeneidade química dos AHs, conforme tem sido reportado na literatura (Toledo e Carvalho, 1985; Barton e Schnitzer, 1963; KNICKER, 1996). A presença destes diferentes grupos, assim como as suas intensidades são importantes quando se deseja saber quais frações da MO são mais lábeis, e quais são mais resistentes ou podem

acumular-se durante o processo de humificação em diferentes solos ou sob aplicação de diferentes culturas.

As medidas de ^{13}C RMN VACP/MAS mostraram que os AH são bastante alifáticos (alto conteúdo de O-Alquil-C e Alquil C) em relação ao conteúdo de aromáticos (Santos, 2006). Sabe-se que com o avanço da humificação, o conteúdo de grupos carboxílicos e aromáticos aumenta, enquanto que o de O-aromáticos e metoxilas diminuem (Kögel-Knaber, 1997; Preston et al., 1994).

Figura 5.58: Porcentagem da aromaticidade (a) e alifaticidade (b) das amostras de AH extraídos dos solos submetidos e não submetidos à aplicação de águas residuárias e submetidos à aplicação de água de consumo.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

De acordo com a Figura 5.58 e Tabela 5.8 foi observada uma variação de 17,6 a 20,6% no conteúdo de aromáticos e de 79,1 a 82,4% no conteúdo de alifáticos dos AH extraídos dos solos sob os diferentes tratamentos, resultado similar aos obtidos por (González-Pérez et al., 2004).

Através da Figura 5.58, observou-se variações mínimas nas porcentagens de aromáticos e alifáticos. Também não foram observadas variações significativas nos grupos funcionais dos AH através da espectroscopia de ^{13}C RMN VACP/MAS no solo após a aplicação de águas residuárias.

Não foi possível a realização das medidas de ^{13}C RMN VACP/MAS para todos os tratamentos empregados nas profundidades de 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 cm, devido quantidade insuficiente de amostras obtidas nas extrações nestas profundidades.

5.3.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

A Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser aplicada a solos inteiros é uma nova metodologia, que tem se mostrado eficiente na análise da MO de solos inteiros, fornecendo resultados de uma maneira ágil, limpa e em condições próximas das naturais Milori et al. (2006).

A espectroscopia de FIL foi aplicada às amostras de solos inteiros para avaliar o grau de humificação da MOS (H_{FIL}).

O índice de humificação H_{FIL} foi obtido através do cálculo da razão entre o valor da área sob o espectro de emissão de fluorescência com excitação em 458 nm (ACF) e o valor de carbono orgânico total (COT) presente na amostra de solo inteiro.

$$H_{FIL} = \frac{ACF}{COT} \quad (3.1)$$

A razão entre ACF e COT foi feita para normalizar a relação entre a intensidade de emissão e a concentração de fluoróforos presentes na MO da amostra. A adoção da área sobre a curva de fluorescência (ACF) como parâmetro para estimativa da humificação se baseia na metodologia para análise de fluorescência de AH em solução proposta por Milori et al. (2002), ou seja, o índice de humificação A_{465} .

Os espectros de fluorescência induzida por laser das amostras de AH obtidos para os diferentes tratamentos são apresentados na Figuras 5.59.

Figura 5.59: Espectro de fluorescência induzida por laser obtido para todas as amostras de solo inteiro de Argissolo Vermelho no perfil da amostragem. SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

Os resultados do grau de humificação obtido através da técnica de FIL das amostras de solo nas diferentes profundidades dos tratamentos analisados estão representados na Figura 5.60.

Figura 5.60: Valores de H_{FIL} obtidos para todas as amostras de solo inteiro de Argissolo Vermelho no perfil da amostragem.

SI: sem irrigação e sem fertilização nitrogenada mineral (FNM); W100: irrigação com água de consumo e 100% da FNM; E0: irrigação com efluente e 0% da FNM; E33: irrigação com efluente e 33% da FNM; E66: irrigação com efluente e 66% da FNM; E100: irrigação com efluente e 100% da FNM.

As amostras apresentaram um incremento no grau de humificação da matéria orgânica com a profundidade do solo. Este comportamento pode ser atribuído a dois fatores principais: ao aporte de matéria orgânica fresca na superfície do solo causando um efeito de diluição do material orgânico mais recalcitrante e à percolação natural das substâncias húmicas solúveis, causando um acúmulo em profundidade de material humificado.

De uma maneira geral, a irrigação com águas residuárias durante um período de aplicação de aproximadamente quatro anos não afetou de maneira significativa a MOS, exceto para o tratamento E33 onde foi observado um significativo aumento do grau de humificação da matéria orgânica. Embora pareça antagônico aos resultados obtidos para a fluorescência dos AH, é importante ressaltar que no solo inteiro observa-se a contribuição de frações como a humina e o AF.

No caso das amostras estudadas, durante o fracionamento observou-se que o solo possuía muito pouco de AF, mas quantidades muito grandes de humina (acima de 80% da quantidade total das SH). Por estes resultados, parece que enquanto a fração solúvel (AH) sofre alterações significativas em termos de quantidade e estrutura química, a fração insolúvel praticamente não é alterada. Apenas para o tratamento E33 mudanças mais significativas ocorrem com uma diminuição maior dos teores de carbono bem como aumento da intensidade de emissão de fluorescência.

O tratamento E33 foi considerado, no experimento global conduzido pelo projeto temático FAPESP 04/14315-4, como um tratamento singular. Outras técnicas também observaram um comportamento atípico do mesmo.

Nas Figuras 5.61, 5.62 e 5.63 temos uma comparação entre o grau de humificação avaliado por FIL utilizando amostras de solo inteiro e por fluorescência convencional utilizando AH em solução e índices de humificação já estabelecidos na literatura. Em todos os casos os índices de humificação refletem de maneira satisfatória as características da MO e as correlações obtidas foram altas e significativas mostrando que a metodologia proposta tem um grande potencial de aplicação para análises de solos.

Figura 5.61: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1).

Figura 5.62: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Milori et al. (2002) (A_{465}).

Figura 5.63: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Kalbitz et al. (1999) (I_{468}/I_{374}).

Os resultados apontam que a principal vantagem da espectroscopia de FIL é uma análise rápida sem a necessidade de fracionamento químico e permitindo estudar a MOS o mais próximo possível de suas condições naturais (Santos, 2006).

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pela análise elementar não foi possível obter informações a respeito das alterações sofridas pelo solo em função dos diferentes tratamentos, pois a técnica não é sensível o suficiente para detectar as mudanças. Os valores obtidos para a razão C/N para todos os tratamentos também se encontram dentro dos intervalos referidos na literatura (Stevenson, 1994). A razão H/C indicou maior percentual de grupos alifáticos para os AH, sendo também comprovado através dos espectros de ^{13}C RMN VACP/MAS. A razão O/C foi similar em todos os casos, e não mostrou nenhum efeito dos diferentes tratamentos.

Os espectros de FTIR obtidos são típicos para AH. Neles as principais bandas estão associadas a grupos carboxila, carbonila, amida, amina, hidroxila, fenóis e aromáticos. Novamente, não foram observadas diferenças significativas nos espectros para os diferentes tratamentos empregados.

Assim como os espectros de FTIR, os espectros de ^{13}C RMN VACP/MAS foram semelhantes para todas as amostras de AH analisadas. Basicamente, elas possuem maior percentual de grupos alifáticos do que aromáticos, e a aplicação das águas residuárias não alteraram de forma significativa a distribuição dos grupos funcionais no espectro.

A espectroscopia de fluorescência, entretanto, demonstrou ser uma ferramenta sensível para a avaliação das alterações ocorridas nas amostras de AH extraídos dos solos sob os diferentes tipos de tratamentos.

De maneira geral, a espectroscopia de fluorescência bidimensional mostrou que a irrigação com águas residuárias não afetou significativamente a estrutura do

AH das camadas superficiais, mas causou um ligeiro aumento do grau de humificação em profundidade, especialmente para o tratamento E33. Esta tendência foi observada através dos três índices de humificação calculados (Zsolnay et al., 1999; Milori et al., 2002; Kalbitz et al., 1999), os quais mostraram uma correlação significativa acima de 95%. Parece que a irrigação com águas residuárias favorece a formação de SH solúveis que tendem a se acumular em profundidade.

Os espectros tridimensionais mostraram que a fluorescência dos AH de um mesmo tratamento aumenta com a profundidade. Ambas as excitações em 470 e 320 nm levam a um máximo de emissão em 530 nm, entretanto a excitação em 470 nm, mais relacionada com estruturas complexas, tem uma contribuição bem mais significativa para a fluorescência.

Comparando-se os tratamentos W100 e E100, observou-se que a irrigação com águas residuárias promoveu um aumento na concentração de estruturas fluorescentes em geral, possivelmente acarretado por um aumento na atividade microbiana e conseqüente degradação da matéria orgânica do solo. Mudanças estruturais também foram observadas pela espectroscopia 3D através da razão entre os máximos de excitação em 470 e 320 nm (R_{3D}). Os AH dos solos irrigados com águas residuárias mostraram alterações estruturais muito mais significativas do que os solos irrigados com água de consumo quando comparados ao solo sem irrigação (SI – referência).

Os resultados da espectroscopia de FIL aplicada aos solos inteiros mostraram um incremento no grau de humificação da matéria orgânica com a profundidade do solo, similar ao observado na fluorescência dos AH em solução. De maneira geral, a irrigação com águas residuárias, durante um período de aplicação de aproximadamente quatro anos, não afetou de maneira significativa a MOS, exceto

apenas para o tratamento E33, onde mudanças significativas ocorreram com uma diminuição nos teores de carbono e aumento significativo do grau de humificação da MO.

Embora este resultado pareça antagônico ao obtido através da fluorescência dos AH em solução, deve-se ressaltar que no caso da fluorescência dos solos a fração insolúvel das substâncias húmicas (Humina) deve contribuir para o sinal de forma significativa, visto que compõe mais de 80% do material húmico da MOS. Portanto, o que este resultado aparentemente está mostrando é que o ácido húmico sofreu alterações estruturais com a aplicação das águas residuárias, enquanto que a humina praticamente permaneceu a mesma. Como a humina é a parte mais recalcitrante das substâncias húmicas, este resultado parece bem plausível.

A atividade microbiana, aumentada pela irrigação, segue na decomposição de materiais mais lábeis. Talvez, em um intervalo de tempo maior de irrigação, mudanças estruturais da humina também comecem a ser detectadas. O tratamento E33 mostrou alterações na humina, entretanto no experimento ele foi considerado um tratamento singular. Dados coletados por outros membros do projeto que gerencia este experimento, mostraram que este tratamento apresentou maior atividade microbiana e maior umidade, por motivos ainda não identificados. Entretanto, estes resultados corroboram com o resultado obtido por FIL onde o E33 apresenta os maiores índices de humificação da MOS.

Os AH em solução tinham mostrado um aumento do sinal em profundidade, mas o FIL mostrou um aumento na superfície do E33, enfatizando que as mudanças estruturais em substâncias húmicas com mobilidade muito menor do que a do AH ocorreram efetivamente.

As correlações entre o índice de humificação obtido por FIL (H_{FIL}) com os índices de humificação obtido pelas três metodologias empregadas foram significativas.

A partir dos resultados obtidos por RPE foi observado um incremento na concentração de RLS em profundidade para todos os tratamentos e que nas amostras de AH extraídas dos solos irrigados com águas residuárias a concentração de RLS foi maior. Comparando-se os tratamentos E100 e W100, a aplicação das águas residuárias aumenta a concentração de RLS e o grau de humificação dos AH do solo, corroborando com os resultados obtidos através dos espectros de fluorescência tridimensionais.

Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas espectroscópicas e químicas mostraram a irrigação com águas residuárias não afetando de maneira significativa a MOS. Sutil elevação do grau de humificação foi observada, principalmente para o AH.

Sendo assim, desde que sejam estabelecidos critérios para o uso de águas residuárias, ela é uma alternativa viável e sustentável para um problema ambiental atual e uma solução sanitariamente segura, pois seu reuso pode substituir eficientemente a água potável na irrigação de pastagens e outros tipos de culturas, não impactando significativamente a matéria orgânica proporcionando benefícios econômicos, ambientais e sociais.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTIOLA, J.F.; PEPPER, I.L. Longterm influence of liquid sewage sludge on the organic carbon and nitrogen content of a furrow-irrigated desert soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 14, p. 30-36, 1992.

BARTON, D.H.R.; SCHNITZER, M. A new experimental approach to the humic acid problem. **Nature**, v. 198, p. 217-218, 1963.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C.A. Fracionamento da matéria orgânica e sua avaliação qualitativa por EPR num solo submetido dez anos a diferentes sistemas de cultura em plantio direto. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, 1., 1996, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. p. 115-121.

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

BERTONCINI, E.I.; D'ORAZIO, V.; SENESI, N.; MATTIAZZO, M.E. Fluorescent analysis of humic and fulvic acids from two Brazilian oxisols as affected by biosolid amendment. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1281-1288, 2005.

BLOOM, P.R.; LEENHER, J.A. **In search of structure**. New York: John Wiley, 1989. p. 410-446.

BOND, W.J. Effluent irrigation – an environmental challenge for soil science. **Australian Journal of Soil Research**, v. 36, p. 543-555, 1998.

BOUWER, H.; CHANEY, R.L. Land treatment of wastewater. **Advances in Agronomy**, v. 26, p. 133-176, 1974.

BOUWER, H.; IDELOVITCH, E. Quality requirements for irrigation with sewage water. **Journal of Irrigation and Drainage Engineering**, v. 113, p. 516-535, 1987.

BRAVARD, S.; RIGHI, D. Characterization of fulvic and humic acids from an oxisol spodosol toposequence of Amazonia, Brazil. **Geoderma**, v. 48, p. 151-162, 1991.

BROWN, L.R.; RENNER, M.; HALWEIL, B. **Sinais vitais 2000**: as tendências ambientais que determinarão nosso futuro. Salvador: UMA, 2000. 196 p.

CAMERON, K.C.; DI, H.J.; McLAREN, R.G. Is soil an appropriate dumping ground for our wastes? **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, p. 995-1035, 1997.

CANELLAS, L.P. **Avaliação de características físico-químicas de ácidos húmicos**. 1999. 162f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A.; RUMJANEK, V.M.; MORAES, A.A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1529-1538, 2001.

CARVALHO, E.R.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 53, p. 421, 2004.

CELI, L.; SCHNITZER, M.; NEGRÉ, M. Analysis of carboxyl groups in soil humics acids by wet chemical method, Fourier transform infrared spectrophotometry, and solution-state carbon-13 nuclear magnetic resonance: a comparative study. **Soil Science**, v. 162, p. 189, 1997.

CHRISTOFIDIS, D. **Olhares sobre a política de recursos hídricos no Brasil**: o caso da bacia do rio São Francisco. Brasília: Universidade de Brasília, Brasília DF, 2001. 424p.

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

DAI, K.H.; JOHNSON, C.E. Applicability of solid-state ^{13}C CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. **Geoderma**, v. 93, p. 289-310, 1999.

DARWISH, M.R.; EL-AWAR, F.A.; SHARARA, M.; HAMDAR, B. Economic-environmental approach for optimum wastewater utilization in irrigation: a case study in Lebanon. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 15, p. 41-48, 1999.

DIALLO, M.S. ; SIMPSON, A.J. ; GASSMAN, P. ; FAULON, J.L. ; JOHNSON, J.H. ; GODDARD, W.A. ; HATCHER, P.G. 3-D Structural modeling of humic acids through experimental characterization, computer assisted structure elucidation and atomistic simulations. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 1783-1793, 2003.

DONOSO, J.P.; BARBERIS, G.E. Descrição quântica de espectros de ressonância paramagnética eletrônica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 19, p. 125, 1997.

DORICH, R.A.; NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Algal availability of phosphorus in suspended stream sediments of varying particle size. **Journal of Environmental Quality**, v. 13, p. 82-86, 1984.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1999. 412p.

FALKINER, R.A.; SMITH, C.J. Changes in soil chemistry in effluent-irrigated *Pinus radiata* and *Eucalyptus grandis*. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, p. 131-147, 1997.

FEIGIN, A.; BIELORAI, H.; DAG, Y.; KIPNIS, T.; GISKIN, M. The nitrogen factor in the management of effluent-irrigated soils. **Soil Science**, v. 125, p. 248-254, 1978.

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. **Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. 224p.

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

FIRME, P.F. **Efeito da irrigação com efluente de esgoto tratado no sistema solo-planta em Latossolo cultivado com cana-de-açúcar**. 2007. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FONSECA, A.F. **Disponibilidade de nitrogênio, alterações nas características químicas do solo e do milho pela aplicação de efluente de esgoto tratado.** 2001. 110f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

FONSECA, A.F. **Viabilidade agrônomo-ambiental da disposição de efluente de esgoto tratado em um sistema solo-pastagem.** 2005. 174f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FONSECA, A.F.; HERPIN, U.; PAULA, A.M.; VICTORIA, R.L.; MELFI, A.J. Agricultural use of treated sewage effluents: Agronomical – Environmental Implications and Perspectives for Brazil. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 2, p. 194-209, 2007.

FRIEDEL, J.K.; LANGER, T.; SIEBE, C.; STAHR, K. Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. **Biology and Fertility Soils**, v. 31, p. 414-421, 2000.

GLOAGÜEN, T.V.; FORTI, M.C.; LUCAS, Y.; MONTES, C.R.; GONÇALVES, R. A.B.; HERPIN, U.; MELFI, A.J. Soil solution chemistry of a Brazilian Oxisol irrigated with treated sewage effluent. **Agricultural Water Management**, v. 88, p. 119-131, 2007.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S.C.; NOVOTNY, E.H.; MILORI, D.M.B.P.; BAGNATO, V.S.; COLNAGO, L.A.; MELO, W.J.; KNICKER, H. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, v. 118, p. 181-190, 2004.

HAKEN, H.; WOLF, H.C. **Molecular physics and elements of quantum chemistry.** Springer-Verlag: Heidelberg, 1995. p. 173-179.

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

HERNANDEZ, T.; MORENO, J.I.; COSTA, F. Infrared spectroscopic characterization of sewage sludge humic acids. Evidence of sludge organic matter-metal interactions. **Agrochimica**, v. 37, p. 12-17, 1993.

HERPIN, U.; GLOAGÜEN, T.V.; FONSECA, A.F.; MONTES, C.R.; MENDONÇA, F.C.; PIVELI, R.P.; BREULMANN, G.; FORTI, M.C.; MELFI, A.J. Chemical Effects on the soil-plant system in a secondary treated wastewater irrigated coffee plantation – A pilot field study in Brazil. **Agricultural Water Management**, v. 89, p. 105-115, 2007.

HESPANHOL, I. Potencial de reuso de água no Brasil-agricultura, indústria, municípios, recarga de aquíferos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 7, p. 75-95, 2002.

JELINSKI, L.W.; MELCHIOR, M.T. High-Resolution NMR of solids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 35. p. 25-93, 2000.

JEZIERSKI, A.; DROZD, J.; JERZYKIEWICZ, M.; CHEN, Y.; KAYE, K.J. EPR in the environmental control: copper complexes and free radicals in soil and municipal solid waste compost. **Applied Magnetic Resonance**, v. 14, p. 275-282, 1998.

JORDAN, M.J.; NADELHOFFER, K.J.; FRY, B. Nitrogen cycling in forest and grass ecosystems irrigated with ¹⁵N-enriched wastewater. **Ecological Applications**, v. 7, p. 864-881, 1997.

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

KIEHL, E. Matéria orgânica. In: MANUAL de edafologia. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1979. p. 231-240.

KNICKER, H.; ALMENDROS, G.; GONZALES-VILA, F.J.; MARTIN, F.; LUDEMANN, H.D. ¹³C and ¹⁵N-NMR spectroscopic examination of the transformation of organic nitrogen in plant biomass during thermal treatment. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, p. 1053, 1996.

KÖGEL-KANBER, I. ¹³C AND ¹⁵N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. **Geoderma**, v. 80, p. 243-270, 1997.

KUMKE, M.U.; LÖHMANNSRÖBEN, H.G.; ROCH, T.H. Fluorescence spectroscopy of polyaromatic compounds in environmental monitoring. **Journal of Fluorescence**, v. 5, p. 139-153, 1995.

LEINWEBER, P.; FRÜND, R.; REUTER, G. A. ^{13}C -NMR study on the formation of soil organic matter from grass residues. **Zeitschrift von Pflanzernernahr Bodenk**, v. 156, p. 415-420, 1993.

LUCHESE, E.B.; FAVERO, L.O.B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos Editora, 2002. 159 p.

LUMB, M.D. **Luminescence spectroscopy**. New York: Academic Press, 1978. 375p.

MANGRICH, A.S. Estruturas químicas de: estratégias de pesquisa. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 4., 2001, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Substâncias Húmicas/ Universidade Federal de Viçosa, 2001. p. 15-17.

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

MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J.; POPPI, N.R. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from brazilian soil. **Soil Science**, v. 151, p. 369-376, 1991.

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

MC PHIE, P. Enzyme purification and related techniques: dialysis. In: JACOBY, W.B. (Ed.). **Methods and enzymology**. New York: Academic Press, 1971. v. 22, p. 25-175.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, p. 739-749, 2002.

MILORI, D.M.B.P.; GALETI, H.V.A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. "Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy". **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, p. 57-63, 2006.

MILORI, D.M.B.P; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C. Nova metodologia utilizando fluorescência induzida por laser para análise de solos inteiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto - SP. **Anais...** Jaboticabal: UNESP, 2003. 1 CD-ROM.

MONTES, C.R.; TAKAYUKIKATO, M.; SOUZA, M.A.A.; FILHO, C.; JUNIOR, J.M. Irrigação com esgotos tratados: impactos no solo e no aquífero. In: FLORENCIO, A.; BASTOS, R. K. X.; ASSIE, M.M. **Tratamento e utilização de esgotos sanitários**. Rio de Janeiro: ABES/RiMa, 2006. p.115-200.

MOTA, S.; FONSECA, A.F.; STEFANUTTI, R.; VOLSCHAN, I.JR. NAVAL, L. Irrigação com esgotos tratados sanitário e efeitos nas plantas. In: FLORENCIO, A.; BASTOS, R. K. X.; ASSIE, M.M. **Tratamento e utilização de esgotos sanitários**. Rio de Janeiro: ABES/RiMa, 2006. p.202-238.

MYERS, R.J.K.; CAMPBELL, C.A.; WEIER, K.L. Quantitative relationship between net nitrogen mineralization and moisture content of soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 62, p. 111-124, 1982.

NAKANISHI, K. **Infrared absorption spectroscopy**. Tokyo: Nankondo, 1962. 233p.

NARIMOTO, K.M. **Técnicas espectroscópicas aplicadas à análise da matéria orgânica do solo em pomares de citros sob adição de lodo de esgoto**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

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

OLENDZKI, R.N. **Caracterização das interações de substâncias húmicas com a matéria inorgânica em solos de cultivo de arroz irrigado: contribuição à aquisição de dados essenciais para avaliação global do sequestro de carbono no solo**. 2006. 134f. Tese (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

OLK, D.C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Organic matter in double-cropped lowland rice soils: chemical and spectroscopical properties. **Soil Science**, v. 164, p. 633-649. 1999.

PAGANINI, W.S. **Disposição de esgotos no solo**: escoamento à superfície. 2.ed. São Paulo: Fundo Editorial da AESABESP, 1997. 232p.

PESCOD, M.B. **Wastewater treatment and use in agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1992. 125p. (Irrigation and Drainage Paper, 47).

PEURAVUORI, J. NMR Spectroscopy study of freshwater humic material in light of supramolecular assembly. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 5541, 2005.

PICCOLO, A.; STEVENSON, F. J. Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Ca^{2+} complexes of soil humic substances. **Geoderma**, v. 27, p. 195-208, 1982.

PLAZA, C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N.; POLO, A. Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge-amended soils by fluorescence spectroscopy. **Environment Science Technology**, v. 40, p. 917-923, 2006.

PLAZA, C.; D'ORAZIO, V.; SENESI, N. Copper (II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminescence spectroscopy. **Geoderma**, v. 125, n. 1-2, p. 177-186, 2005.

POLAK, J.; SULKOWSKI, W.W.; BARTOSZEK, M.; PAPIEZ, W. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic acid extracted from sewage sludge. **Journal of Molecular Structure**, v. 744-747, p. 983-989, 2005.

POLGLASE, P.J.; TOMPKINS, D.; STEWART, L.G.; FALKINER, R.A. Mineralization and leaching of nitrogen in an effluent-irrigated pine plantation. **Journal of Environmental Quality**, v. 24, p. 911-920, 1995.

POLLICE, A.; LOPEZ, A.; LAERA, G.; RUBINO, P.; LONIGRO, A. Tertiary filtered municipal wastewater alternative water source in agriculture: a field investigation in Southern Italy. **Science of the Total Environment**, v. 324, p. 201-210, 2004.

POOLE, C.P.; FARACH, H.A. **The Theory of magnetic resonance**. New York: John Wiley, 1972. 452p.

PREMAZI, L.M.; MONTEIRO, F.A.; CORRENTE, J.E. Tillering of Tifton 85 Bermudagrass in response to nitrogen rates and time of application after cutting. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 565-571, 2003.

PRESTON, C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. **Soil Science**, v. 161, p. 144-166, 1996.

PRESTON, C.M.; HEMPLING, R.; SCHULTEN, H.R.; SCNITZER, M.; TROFYMOV, J.A.; AXELSON, D.E. Characterization of organic matter in a forest soil of coastal British Columbia by NMR and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. **Plant and soil**, v. 158, p. 69-82, 1994.

PROVENZANO, M.R.; D'ORAZIO, V.; JERZYKIEWICZ, M.; SENESI, N. Fluorescence behavior of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources, **Chemosphere**, v. 55, n. 6, p. 885-892, 2004.

QUIN, B.F.; WOODS, P.H. Surface irrigation of pasture with treated sewage effluent. I. Nutrient status of soil and pastures. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, p. 419-426, 1978.

REZENDE, M.O.O. **A importância ambiental das substâncias húmicas**. São Carlos, 1999. 147 f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

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

RIVERO, C.; SENESI, N.; PAOLINI, J.; DÓRAZIO, V. Characteristics of humic acids of some Venezuelan soils. **Geoderma**, v. 81, p. 227-239, 1998.

RODRIGUES, L.R.A.; REIS, R.A.; FILHO, C.V.S. Estabelecimento de pastagens de *Cynodon*. In: PEIXOTO, M.A.; MOURA, J.C.; FARIA V.P. (Eds.). **Manejo de pastagens de tifton, coastcross e estrela**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 115-128.

SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A.; ROIG, A.; CEGARRA, J.; BERNAL, M.P.; PAREDES, C. Effects of HCl-HF purification treatment on the chemical composition and structure of humic acids. **European Journal of Soil Science**, v. 53, p. 375-381, 2002.

SANTAMARIA, J.; TORANZOS, G.A. Enteric pathogens and soil: a short review. **International Microbiology**, v. 6, p. 5-9, 2003.

SANTOS, A.P.R. dos. **Efeito da irrigação com efluente de esgoto tratado, rico em sódio, em propriedades químicas e físicas de um argissolo distrófico cultivado com capim-Tifton 85**. 2004. 79f. Dissertação (Mestrado na área de Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SANTOS, L.M. **Dinâmica da matéria orgânica e destino de metais pesados em dois solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. 2006. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SCHNITZER, M. Organic matter characterization. In: METHODS of soil analysis: chemical and microbiological properties. Madison: ASA-SSSA, 1982. p. 582-594 (Agronomy monograph, 9).

SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. **Humic substances in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1972. 315p.

SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978. 319 p.

SCHNITZER, M.; PRESTON, C.M. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, p. 326-331, 1986.

SCHNITZER, M.; PRESTON, C.M. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, p. 326-331, 1986.

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

SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, v. 80, p. 29-30, 1993.

SCOTT, M.J.; WOOF, C.; JONES, M.N.; TIPPING, E. Concentrations and fluxes of dissolved organic carbon in drainage water from upland peat system. **Environmental International**, v. 24, p. 537-546, 1998.

SENESI, N. Application of electron spin resonance and fluorescence spectroscopies to the study of soil humic substances. In: **HUMUS, its structure and role in agriculture and environmet**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. p. 11-26.

SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of chemistry of fulvic acids and its interactions with metals ions and organic chemicals. Part I. the electrons spin resonance approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 51-75, 1990.

SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of chemistry of fulvic acids and its interactions with metals ions and organic chemicals. Part I. the electrons spin resonance approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 232, p. 51-75, 1990.

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

SENESI, N.; MIANO, T.M.; PROVEZANO, M.R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 152, p. 259-271, 1991.

SENESI, N.; SCHNITZER, M. Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acid. **Soil Science**, v. 123, p. 224-234, 1977.

SENESI, N.; SPOSITO, G.; MARTIN, J.P. Copper (II) and iron (III) complexation by humic acid-like polymers (melanins) from fugi. **Soil of the Total Environment**, v. 62, p. 241-252, 1987.

SIEBE, C. Heavy metal availability to plants in soils irrigated with wastewater from Mexico City. **Water Science & Technology**, v. 32, p. 29-34, 1995.

SIERRA, M.M.D.; GIOVANELA, M.; PARLANTI, E.; SORIANO-SIERRA, E.J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. **Chemosphere**, v. 58, p. 715-733, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; BONLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387p.

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

SKJEMSTAD, J.O.; JANIK, L.J.; TAYLOR, J.A. Non-Living soil organic matter: what do we know about it?. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, p. 667-680, 1998.

SKOOG, D.A. HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SMITH, J.H.; PETERSON, J.R. Recycling of nitrogen through land application of agricultural, food processing and wastes. In: STEVENSON, F.J. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soils**. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 791-831.

SNOW, V.O.; SMITH, C.J.; POLGLASE, P.J.; PROBERT, M.E. Nitrogen dynamics in a eucalypt plantation irrigated with sewage effluent or bore water. **Australian Journal of Soil Research**, v. 37, p. 527-544, 1999.

SODRÉ, F.F. **Especiação do cobre em águas naturais: Influência de fatores associados à urbanização**. 2005. 152f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 277p.

STANFORD, G.; EPSTEIN, E. Nitrogen mineralization-water relations in soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, v. 38, p. 99-102, 1974.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reaction**. New York: Wiley Interscience, 1994. 443 p.

STUART, B. **Modern infrared spectroscopy: analytical chemistry by open learning**. New York: John Wiley, 1996. 179 p.

SUMNER, M.E. Beneficial use of effluents, wastes and biosolids. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 31, p. 1701-1705, 2000.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1996. Pte3, p. 1011-1069. (Book Series Agronomy, 9).

TOLEDO, A.P.P.; CARVALHO, J.L. Comparação sobre a capacidade de extração de substâncias húmicas por vários solventes. **Ciência e Cultura**, v. 37, p. 1174, 1985.

TOZE, S. Reuse of effluent water: benefits and risks. **Agricultural water Management**, v. 80, p. 147-159, 2006.

TREVISAN, M.G. **Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas**. 2003. 86f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VAISMAN, I.; SHALHEVET, J.; KIPNIS, T.; FEIGIN, A. Reducing ground-water pollution from municipal waste-water irrigation of Rhodes grass grown on sand dunes. **Journal of Environmental Quality**, v. 10, p. 434-439, 1981.

VASQUEZ-MONTIEL, O.; HORAN, N.J.; MARA, D.D. Management of domestic wastewater for reuse in irrigation. **Water Science and Technology**, v. 33, p. 355-362, 1996.

VEEMAN, W.S. Nuclear magnetic resonance: a simple introduction to the principles and applications. **Geoderma**, v. 80, p. 225-242, 1997.

VILELA, D.; ALVIM, M.J.; Manejo de pastagem do gênero *Cynodon*: introdução, caracterização e evolução do uso no Brasil. In: PEIXOTO, M.A.; MOURA, J.C.; FARIA V.P. (Ed.). **Manejo de pastagens de tifton, coastcross e estrela**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 23-54.

VINKLER, P.; LAKATOS, B.; MEISEL, J. Infrared spectroscopic investigations of humic substances and their metal complexes. **Geoderma**, v. 15, p. 231-242, 1976.

VISSER, S. A. Seasonal changes in the concentration and color of humic substances in some aquatic environments. **Freshwater Biology**, v. 14, p. 79-87, 1984.

WANG, Z.; CHANG, A.C.; WU, L.; CROWLEY, D. Assessing the soil quality of long-term reclaimed wastewater-irrigated cropland. **Geoderma**, v. 114, p. 261-278, 2003.

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

WERSHAW, R.L. Model for humus. **Environmental Science Technology**, v. 27, p. 414-816, 1993.

WESCOT, D.W. **Quality control of wastewater for irrigated crop production**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1997. (Water Reports, 10).

WILSON, M.A. **NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry**. Oxford: Pergamon, 1987. 353p.

WILSON, M.A. Soil organic matter maps by nuclear magnetic resonance. **Journal of Soil Science**, v. 35, p. 209-215, 1984.

YADAV, R.K.; GOYAL, B.; SHARMA, R.K.; DUBEY, S.K.; MINHAS, P.S. Post-irrigation impact of domestic sewage effluent on composition of soils, crops and ground water. A case study. **Environment International**, v. 28, p. 481-486, 2002.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGNBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p. 117-161, 1997.

XIAOLI, C.; SHIMAOKA, T.; QIANG, G.; YOUCAI, Z. Characterization of humic and fulvic acids extracted from landfill by elemental composition, ¹³C CP/MAS NMR and TMAH-Py-GC/MS. **Waste Management**, v. 28, p. 896-903, 2008.

ZSOLNAY, A.; BAIGAR, E.; JIMENEZ, M.; STEINWEG, B.; SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**, v. 38, p. 45-50, 1999.