Nayrê Ohana de Souza Thiago

**Utilização de métodos espectroscópicos para avaliação de ácidos
húmicos extraídos de solos de diferentes sistemas produtivos de
pastagens**

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

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

Área de concentração: Química analítica.

Orientadora: Dra Débora Marcondes Bastos
Pereira Milori

São Carlos

2016

Dedico este trabalho aos meus pais Sylvio e Marinalva, pelo apoio que sempre me deram e pela confiança. Dedico também às minhas irmãs Aymê e Maytê por serem a luz da minha existência. Ao meu namorado Gustavo, por todo o incentivo, confiança e carinho, e por fim, dedico aos meus avós Jurandir e Clautildes, por serem minha base e o que há de mais sagrado em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho, me dar forças em momentos difíceis e confiança para sempre seguir em frente.

Aos meus familiares, meus pais, irmãs, avós e meu namorado Gustavo, pelo apoio, pelos conselhos positivos e por sempre me mostrarem o lado bom de tudo.

À Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori pela orientação nesses dois anos e meio, pelos conselhos, ensinamentos e paciência em todo o desenvolver do trabalho.

À Dr. Sthéphane Mounier e a todos do laboratório PROTEE, onde eu pude passar três meses maravilhosos na França, com muito ensinamento profissional e de vida.

Aos colegas do laboratório de Óptica e Fotônica, Amanda, Gustavo, Aida, Aline, Mariana, Jéssica, Renan, Alfredo, Ivan, Marco Aurélio, Kleydson, Camila, Anne, Thiago, Lilian, entre outros, pela amizade, colaboração e convivência.

A todos os funcionários da Embrapa Instrumentação, em especial às técnicas de laboratório Silviane e Viviane.

À Dra Patrícia Perondi Anchão Oliveira, pela coordenação da rede PECUS e suporte ao projeto desenvolvido.

Aos professores do IQSC pelo conhecimento.

Aos funcionários da biblioteca do IQSC pelo apoio.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, Gustavo, Andréia e Sílvia, o meu muito obrigada pela dedicação, paciência e o ótimo trabalho realizado.

Aos amigos que cultivei em São Carlos, Poliane, Évelyn, Natália, Bruna, Bianca, Beatriz e aos amigos da GAPeria, os quais foram responsáveis pelos melhores momentos que vivi em São Carlos, em especial Felipe Fernandes, Laura, Gabriela, Thaís, Luana, Neyla, Júlia, Maria, Bianca, Fernanda e Fabiana.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos professores da banca pela disposição e contribuição com o trabalho.

Muito obrigada a todos!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade. ”

Marie Curie

RESUMO

A agropecuária pode ser uma aliada importante para a mitigação de gases causadores do efeito estufa. Um exemplo disso é a recuperação direta de pastagens degradadas, em que é possível incorporar o carbono presente na atmosfera no solo, e ainda evita o desmatamento de florestas virgens para a implantação de novas áreas de pastagens. Uma maneira possível de se avaliar o carbono presente nos solos é por meio de estudos sobre a dinâmica e estabilidade da matéria orgânica do solo (MOS), uma vez que a MOS constitui o maior reservatório dinâmico de carbono (C) da superfície terrestre, e qualquer variação na abundância e composição desta perfaz importantes efeitos na dinâmica que ocorre entre os sistemas de armazenamento de carbono. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a recuperação de pastagens degradadas podem sequestrar carbono presente na atmosfera para o solo, e se diferentes sistemas de manejo pecuário podem alterar as estruturas da MOS. O experimento estava localizado na unidade da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP, sendo os sistemas de manejos o intensivo irrigado e alta lotação animal, intensivo de sequeiro e alta lotação animal, em recuperação e média lotação animal, degradado e média lotação animal e a mata nativa como sendo a área de referência. Foram coletadas amostras de solo das cinco áreas de estudo, e posteriormente realizou-se a extração dos ácidos húmicos AH do solo. As técnicas utilizadas na caracterização dos AH foram análise elementar (CHNS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), fluorescência bidimensional e tridimensional e supressão de fluorescência por metais. Os resultados mostraram que a área degradada apresentou pouco acúmulo de carbono no solo, e também um AH rico em compostos aromáticos e com alto valor do índice humificação. Já as áreas de intensivo de sequeiro e em recuperação mostraram comportamento semelhante ao da mata nativa, apresentando um alto acúmulo de carbono no solo, uma estrutura dos AH mais lábeis nas camadas superficiais e baixos índices de humificação. A área irrigada teve baixa incorporação de carbono no solo, igualmente à área degradada, apresentando também um AH mais humificado e com estruturas mais conjugadas. O experimento de supressão de fluorescência mostrou valores menores da constante de estabilidade condicional (K) para as áreas intensiva irrigada e degradada, mostrando que os AH dessas áreas podem ter perdido alguns sítios ativos, deixando a MOS menos reativa na presença de íons metálicos. Conclui-se que o excesso de irrigação e a degradação de pastagens não causaram um efeito positivo na MOS, ambos os manejos deixaram a MOS com poucos sítios ligantes, muito humificada mesmo nas camadas superficiais e com menos teor de carbono no solo deixando essa matéria orgânica pouco interativa, afetando assim a produtividade do solo. Em contrapartida, verificou-se que a recuperação de áreas degradadas é um caminho viável para a estocagem de matéria orgânica no solo, uma vez que a área em recuperação apresentou valores semelhantes aos da mata nativa. Esse estudo mostrou que com a utilização de técnicas simples, como a análise de fluorescência, pode-se obter resultados que contenham muitas informações a respeito das estruturas dos AH do solo, facilitando assim o entendimento da dinâmica do carbono nessas áreas. Observou-se ainda que este trabalho pode contribuir muito com pesquisas futuras, uma vez que existem poucos trabalhos na literatura que tratam da dinâmica do carbono em sistemas de pastagens, uma vez que esse foi sequestrado no solo.

Palavras-chave: Matéria orgânica do solo, ácidos húmicos, manejo de pastagens, índice de humificação.

ABSTRACT

Agricultural and livestock can be a great allied important for the mitigation of greenhouse gas effect. An example of this is the direct recovery of degraded pastures, where it is possible to incorporate the carbon present in the atmosphere into the soil, and it also avoids the deforestation of virgin forests for the implantation of new pasture areas. One possible way to assess soil carbon is through the dynamics and stability of the soil organic matter (SOM) is needed, since the SOM constitutes the largest dynamic carbon (C) reservoir from the land surface, and any variation in the abundance and composition thereof, adds up significant effects on the dynamics that occurs between the carbon storage systems. In this context, the objective of this study was to evaluate whether the recovery of degraded pastures can sequester carbon present in the atmosphere to the soil and whether different livestock management systems can alter the structures of MOS. The experiment was located in the unit Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP, with the management's systems the intensive irrigated and high animal stocking, intensive of dry and high animal stocking, in recovery and average animal stocking, degraded and average animal stocking and native forest as a reference area. Soil samples were collected from five study areas, and later was carried out the extraction of soil AH. The techniques used in the characterization of HA was elemental analysis (CHNS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), two-dimensional, three-dimensional fluorescence and fluorescence quenching. The results showed that degraded management showed little accumulation of carbon in the soil, an HA rich in aromatic compounds and with high value humification. Already the intensive dry and in recovery areas showed similar behavior to that the native forest, with a high accumulation of carbon in the soil, a structure of HA more labile, in the surface layers and low levels of humidification. The irrigated area had low incorporation of carbon in the soil, as well the degraded area, also presenting an HA more humified and with more conjugated structures. The fluorescence quenching experiment showed lower values of the conditional stability constant (K) for intensive irrigation and degraded areas, showing that they may have lost some active sites, leaving the less reactive SOM soil. It's concluded that the excess irrigation and pasture degradation did not show a positive behavior for SOM, both managements left SOM with few binding sites, very much humified in surface and low carbon accumulation in the soil, leaving this organic matter little interactive, affecting thus soil productivity. However, it was found that the recovery of pastures recovery of degraded areas is a viable way to SOM storage, since that the area in recovery showed values similar to those of native forest. This study showed that the use of simple techniques, such as fluorescence analysis, can be obtained results that contain a lot of information about the AH structures of the soil, thus facilitating the understanding of the carbon dynamics in these areas. It was also observed that this work can contribute much with future researches, since there are few studies in the literature dealing with the dynamics of carbon in pasture systems, since this was accumulated in the soil.

Keywords: Soil organic matter, humic acids, pasture management, humification degree.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais compartimentos globais de carbono: oceano, formações geológicas, atmosfera, biosfera e solo. Os valores de C estão em petagrama que é equivalente a 1015 gramas. Os valores foram retirados de LAL et al., (2004a).	22
Figura 2 - Modelo macromolecular de ácido húmico proposto por Schnitzer e Schulten (1993).	27
Figura 3 - Modelo tridimensional de ácido húmico proposto por Schnitzer e Schulten (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.	28
Figura 4 - Modelo esquemático de estrutura das substâncias húmicas proposto por Simpson et al. (2002). Em (A) observa-se a proposta de que as SH sejam uma única macromolécula, já em (B) observa-se a proposta de que as SH sejam um agregado de moléculas com menor massa molecular. Em (vermelho) representa-se cátions metálicos, em (marrom), fragmentos de lignina, em (azul), polipeptídeos, em (preto), polissacarídeos e em (verde), cadeias alifáticas.	29
Figura 5 - Espectro eletromagnético.	32
Figura 6 - Vibrações moleculares típicas. Os sinais (+) e (-) significam vibrações perpendiculares ao plano do papel.	33
Figura 7 - Espectros de absorbância no infravermelho dos ácidos húmicos purificados e não purificados, extraídos do horizonte A de um Latossolo Vermelho-Amarelo.	34
Figura 8 - Diagrama de Jablonski.	35
Figura 9 - Representação das quatro áreas de pastagem e mata nativa (área de referência). Imagem coletada a partir dos dados das coordenadas geográficas (Google Maps).	43
Figura 10 - (a) decantação do resíduo sólido e sobrenadante (extrato fúlvico 1); (b) Separação da humina do sobrenadante; (c) Separação do extrato fúlvico 2; (d) Purificação dos AH com solução de HCl 0,1 mol L ⁻¹ + HF 0,3 mol L ⁻¹ ; (e) Diálise dos AH.	46
Figura 11 - Fluxograma da extração dos AH.	46
Figura 12 - (a) Pesagem das amostras de AH em cápsula de estanho; (b) Adição das cápsulas contendo AH no porta-amostra; (c) Equipamento utilizado nas medidas (CHNS/O).	47
Figura 13 - Preparação das pastilhas para análises de Infravermelho.	48
Figura 14 - Espectrômetro Perkin-Elmer e seu porta-amostra.	48

Figura 15 - As 11 soluções usadas para cada amostra analisada e o fluorímetro utilizado.....	51
Figura 16 - Ajuste logarítmico dos valores de carbono nos AH extraídos das cinco áreas avaliadas. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	55
Figura 17 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal.	57
Figura 18 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal.	57
Figura 19 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A3 – em recuperação e média lotação animal.	58
Figura 20 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A4 – degradada e média lotação animal.	58
Figura 21 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	59
Figura 22 - Intensidades dos picos de FTIR para AH A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal.	60
Figura 23 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal.	60
Figura 24 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A3 – em recuperação e média lotação animal.	61
Figura 25 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A4 – degradada e média lotação animal.	61
Figura 26 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	62
Figura 27 - Espectros de fluorescência obtidos segundo Milori et al. (2002) para todas as amostras de AH obtidas nas 8 profundidades e nas 5 diferentes áreas. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	64
Figura 28 - Espectros de fluorescência obtidos segundo Zsolnay et al. (1999) para todas as amostras de AH obtidas nas 8 profundidades e nas 5 diferentes áreas. A1 – intensiva irrigada	

e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	65
Figura 29 - Espectros de fluorescência obtidos segundo Kalbitz et al. (1999) para todas as amostras de AH obtidas nas 8 profundidades e nas 5 diferentes áreas. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	66
Figura 30 - Valores dos índices de humificação obtidos segundo a metodologia de Milori et al. (2002).....	67
Figura 31 - Valores dos índices de humificação obtidos segundo a metodologia de Zsolnay et al. (1999).....	68
Figura 32 - Valores dos índices de humificação obtidos segundo a metodologia de Kalbitz et al. (1999).....	68
Figura 33 - Gráfico de correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias de Milori et al. (2002) (A_{465nm}) e Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1).....	70
Figura 34 - Gráfico de correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias Milori et al. (2002) (A_{465nm}) e Kalbitz et al. (1999) (I_{451}/I_{374}).....	71
Figura 35 - Gráfico de correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias Kalbitz et al. (1999) (I_{451}/I_{374}) e Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1).....	71
Figura 36 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal.	73
Figura 37 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal.....	74
Figura 38 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A3 – em recuperação e média lotação animal.	75

Figura 39 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A4 – degradada e média lotação animal.	76
Figura 40 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	77
Figura 41 - Componentes de fluorescência encontrados nas amostras de AH, após à aplicação da ferramenta CP/PARAFAC.	79
Figura 42 - Contribuição numérica das intensidades de fluorescência de cada componente (1 e 2), para todas as amostras de AH.....	80
Figura 43 - Correlação entre a componente 1 obtida pelo tratamento com o PARAFAC, versus o índice de humificação proposto por Milori et al. (2002). O valor do r^2 foi de 0,74.	81
Figura 44 - Espectros de fluorescência referentes à amostra de AH da A5 (mata nativa) na profundidade de 80-100 cm. Método utilizado na obtenção dos espectros foi o proposto por Kalbitz, et al. (1999).....	82
Figura 45 - Espectros de fluorescência referentes à amostra de AH da A5 (mata nativa) na profundidade de 80-100 cm. Método utilizado na obtenção dos espectros foi o proposto por Milori, et al. (2002).....	83
Figura 46 - Os picos máximos de intensidade de fluorescência versus a concentração de ácido húmico. (A) método Kalbitz et al. (1999), (B) método Milori et al. (2002).	83
Figura 47 - Componentes 1 e 2 obtidas pela análise de PARAFAC.....	84
Figura 48 - Contribuição da intensidade relativa de fluorescência para componente 1 e 2 das amostras de AH, referente a área intensiva irrigada de alta lotação animal (A1), com profundidades de 0 a 5 cm e 80 a 100 cm.....	85
Figura 49 - Gráficos de relação entre o teor de carbono nos AH, com a humificação dos mesmos segundo a metodologia proposta por Milori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.	89

Figura 50 - Gráficos de relação entre as bandas de FTIR referentes à grupos alifáticos, com os índices de humificação proposto por Millori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.89

Figura 51 - Gráficos de relação entre as bandas de FTIR referentes à grupos aromáticos, com os índices de humificação proposto por Millori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.90

Figura 52 - Gráficos de relação entre os valores obtidos para a constante de estabilidade condicional (K) para a componente 2, com os índices de humificação proposto por Milori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedimento de preparo das amostras utilizadas no experimento. A concentração utilizada de AH foi de 10 mg L ⁻¹ , o tampão utilizado foi o acetato de sódio, concentração 1 corresponde à concentração na ordem de 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e concentração 2 na ordem de 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de Cu (II).....	51
Tabela 2 - Teores de carbono, em porcentagem, determinados pela análise elementar (média ± desvio padrão considerando as replicatas em campo), nos quatro sistemas de pastagem e mata nativa. As características dos sistemas de pastagem avaliados são: A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	53
Tabela 3 - Valores médios de carbono nos ácidos húmicos extraídos dos quatro sistemas de pastejo e da mata nativa. As características dos sistemas de pastagem avaliados são: A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.	54
Tabela 4 - Resultados do teste de comparações múltiplas de Duncan. Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes.	55
Tabela 5 - Descritivo dos principais picos extraídos dos espectros de AH.....	59
Tabela 6 - Valores das constantes de estabilidade condicional (K) para as 5 áreas avaliadas e calculado para as componentes 1 e 2. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácidos fúlvicos
AH	Ácidos húmicos
CORCONDIA	Core Consistency Diagnostic
CTC	Capacidade de troca catiônica
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GEE	Gases de efeito estufa
ILP	Integração lavoura-pecuária
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
IV	Infravermelho
K	Constante de estabilidade condicional
MEE	Matrix excitação-emissão
MO	Matéria orgânica
MOD	Matéria orgânica dissolvida
MOS	Matéria orgânica do solo
PARAFAC	Análise dos fatores paralelos
PCA	Análises das componentes principais
PD	Plantio direto
SH	Substâncias húmicas
SPD	Sistema de plantio direto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Sistemas produtivos de pastagem no Brasil	19
3.2 Solo e sua importância no ciclo de carbono.....	21
3.2.1 Matéria orgânica do solo	24
3.2.2 Substâncias húmicas.....	25
3.3 Técnicas analíticas utilizadas no estudo da matéria orgânica do solo.....	30
3.3.1 Métodos químicos	30
3.3.1.1 Análise elementar (CHNS)	30
3.3.2 Métodos espectroscópicos.....	31
3.3.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	31
3.3.2.2 Espectroscopia de fluorescência de luz UV-Visível	34
3.3.2.3. Supressão de Fluorescência	38
4. MATERIAS E MÉTODOS	41
4.1 Área experimental.....	41
4.2 Coleta das amostras	43
4.3 Preparo das amostras de solo para extração.....	44
4.4 Extração e purificação dos ácidos húmicos.....	44
4.5 Caracterização das amostras de ácidos húmicos	47
4.5.1 Análise elementar	47
4.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	47
4.5.3 Espectroscopia de fluorescência bidimensional	48
4.5.4 Espectroscopia de fluorescência em matriz excitação-emissão (MEE)	49
4.5.5 Supressão de Fluorescência	50
4.5.5.1 Teste de diluição	50
4.5.5.2 Experimento de supressão de fluorescência	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5.1 Análise elementar dos ácidos húmicos	53
5.2 Métodos espectroscópicos	56
5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	57
5.2.2 Fluorescência bidimensional.....	63

5.2.3 Fluorescência matriz excitação emissão.....	72
5.2.4 Supressão de Fluorescência	82
5.2.4.1 Resultados do teste de diluição	82
5.2.4.2 Componentes de fluorescência dos ácidos húmicos + Cu II.....	84
5.2.4.3 Valores da constante de estabilidade condicional.....	85
5.3 Relações entre os parâmetros dos AH	88
6. CONCLUSÃO	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional é inevitável o aumento da expansão da fronteira agrícola, a qual tem como consequências a remoção da vegetação nativa e revolvimento do solo para práticas de manejos. Isso se deve à busca de maiores produtividades, em decorrência à maior demanda por alimentos e produtos de origem agrícola (BRONICK; LAL, 2005; GOLÇALVES; FRANCHINI, 2007). Práticas de manejos inadequadas podem levar a degradação do solo, juntamente com perda de carbono e matéria orgânica do solo (MOS) (LAL, 2003; GAZOLLA et al., 2015).

Para reverter a degradação do solo, práticas conservacionistas podem ser aplicadas, como o sistema de plantio direto (SPD) e integração de lavoura-pecuária (ILP), as quais minimizam a degradação do solo e diminuem a necessidade de desmatamento de áreas nativas para a aplicação de pastagens (OLIVEIRA, 2005). Nesses sistemas de manejo não há o revolvimento do solo, preservando assim a vegetação presente na superfície, diminuindo a emissão de gases causadores do efeito estufa (GEE) para a atmosfera e aumentando assim o estoque de carbono no solo (GAZOLLA et al., 2015).

Silva e colaboradores (2011) avaliaram o teor de carbono na MOS sob três diferentes tipos de manejo, o ILP, pastagem, SPD e vegetação nativa em um Latossolo Vermelho de Maracaju, MS, onde puderam constatar que o teor de carbono na MOS, no sistema ILP, foi maior em comparação aos demais sistemas de manejo avaliados.

Avaliando especificamente a pecuária, o Brasil é um país que se destaca muito nesse setor, estando entre os maiores produtores de carne bovina do mundo. Com isso, a pecuária despertou interesse para muitos pesquisadores do solo, uma vez que essa prática pode acarretar em grandes modificações no solo. A grande maioria dos criadores de gado no Brasil adotam a mesma lotação de animal durante todo o ano, o que ocasiona na utilização do pasto além da capacidade de suporte no período de estiagem, fato que contribui para acelerar o processo de degradação (SILVA et al., 2004).

Os problemas relacionados à pecuária não se resumem somente na degradação do solo, mas também podem influenciar nas mudanças climáticas. A pecuária é responsável por grande parte da emissão do gás metano (CH_4), este que é produzido na digestão dos ruminantes e eliminado por eructação (MERCADANTE et al., 2015). Isso faz do CH_4 o principal gás de efeito estufa (GEE) gerado pela pecuária (MCTI, 2014). Pesquisas mostraram que o

manejo de gado tem apresentado uma emissão de 57 kg (média anual) de gases metano para à atmosfera, esse gás que possui um potencial de intensificação do efeito estufa 20 vezes maior do que o gás carbônico (OLIVEIRA, 2015).

Em 2013, a emissão de GEE pelo setor agropecuário brasileiro foi de 418 Mt CO₂e (418 milhões de toneladas de carbono equivalente), esse valor corresponde a 27% das emissões nacionais (MCTI, 2014; SEEG, 2015). A pecuária de corte é considerada uma das principais fontes de emissões de GEE do setor agropecuário, uma vez que os animais ruminantes liberam GEE durante o processo digestivo e na decomposição de seus dejetos (SEEG, 2015).

Dessa forma, a recuperação direta de pastagens degradadas e a adoção do manejo intensivo das pastagens têm apresentado grande potencial de mitigação dos GEE, devido à elevada produção de massa de forragem das gramíneas tropicais, com eficiência de uso de fertilizantes nitrogenados e ao acúmulo de matéria orgânica no solo. No Brasil, para essa prática ser viável há a necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados, já que o potencial de intensificação é proporcional à dose de nitrogênio empregada na fertilização, tendo relação direta na quantidade da matéria orgânica (OLIVEIRA; PENATTI; CORSI, 2008; XAVIER, 2014).

O presente trabalho está inserido nos estudos da Rede PECUS, onde o projeto PECUS avalia a dinâmica de GEE e o balanço de carbono em sistemas de produção agropecuários de seis biomas do Brasil, sendo esses a Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal, Cerrado, Pampa e Amazônico. O projeto é desenvolvido por pesquisadores de várias instituições do Brasil e do exterior, sendo o objetivo principal a sustentabilidade da pecuária brasileira, sequestrando carbono no solo, para compensar as emissões dos GEE (EMBRAPA, 2011).

Esta dissertação se propõe: avaliar a matéria orgânica do solo (MOS) extraída de diferentes sistemas de pastagens, para verificar possíveis mudanças na MOS, utilizando métodos espectroscópicos. O projeto foi desenvolvido em parceria com a Embrapa Instrumentação de São Carlos.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar as alterações químicas, reatividade e as características estruturais dos ácidos húmicos extraídos de diferentes sistemas de pastagem que são estes a A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal, A2 – intensiva de sequeiro e alta lotação animal, A3 em recuperação e média lotação animal, A4 – degradada e média lotação animal e A5 – área de referência (mata nativa), por meio de técnicas espectroscópicas (Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR e Fluorescência de UV-visível) e análise elementar (CHN).

Verificar se os diferentes manejos possuem potencial em acumular o carbono presente na atmosfera no solo, minimizando assim a intensificação do efeito estufa pelas pastagens. E se a recuperação de pastagens degradadas pode contribuir no acúmulo de carbono no solo.

Verificar se os diferentes tipos de manejos podem causar alterações nas estruturas químicas dos ácidos húmicos. E quais seriam as características dos sistemas de pastagens que atenderiam uma sustentabilidade ambiental.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sistemas produtivos de pastagem no Brasil

A agropecuária desempenha um papel muito importante na economia do país, principalmente em um país como o Brasil, que as condições naturais favorecem vantagens para o desenvolvimento do agronegócio, gerando simultaneamente empregos para a população, renda e mercado consumidor para bens industrializados (MAPA, 2014).

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro, tendo grande significância na economia nacional. O Brasil é o maior exportador de carne bovina, possuindo o maior rebanho comercial do mundo, segundo maior produtor de carne e sexto maior produtor de leite (USDA, 2014).

O Brasil dispõe de uma área total de aproximadamente 850 milhões de hectares (Mha) onde 554 Mha (65%) são constituídos por vegetação nativa, 60 Mha (7%) são empregados em áreas produtivas de frutas e silviculturas, 38 Mha (4%) estão distribuídos nas porções urbanas e cerca de 200 Mha (23%) são destinados a pastagem (ICONE, 2012). Desses 200 Mha de pastagens, 100 Mha são pastagens cultivadas com gramíneas tropicais (SPAROVEK; CORRECHEL; BARRETO, 2007).

A pecuária é uma atividade de grande representatividade ao Brasil, tanto economicamente quanto ambientalmente, assumindo lotação média de 0,8 UA/ha (unidade animal por hectare). Especialistas afirmam que em 2021 a pecuária brasileira irá criar 220 milhões de cabeças em 150 milhões de hectares. (RURAL CENTRO, 2011).

No cenário mundial, alguns relatórios foram publicados pelo United States Department of Agriculture (2014), onde esses relatórios indicaram que a pecuária mundial sobre pastejo ocupa 26% da superfície terrestre livre de gelo, e que a pecuária tem levado a degradação de 20% das pastagens e terras de pastagens (73% dos pastos em áreas secas). Esses dados evidenciam os impactos negativos que a produção de gado pode produzir ao ambiente. Assim, é necessário melhorar os sistemas pecuários para minimizar impactos ambientais, mantendo alta produtividade, qualidade e sustentabilidade ambiental.

Um dos impactos negativos gerados pela pecuária é o desmatamento de áreas nativas para a implantação de pastagens. Por décadas foram utilizadas áreas para pastagens com alto potencial produtivo que exigiam muito da fertilidade do solo. Com o tempo, essas pastagens

necessitavam de mudanças para espécies forrageiras que necessitavam de uma menor fertilidade do solo, até chegar ao ponto que nem pastagens mais resistentes se mantinham vivas no solo, chegando então à degradação da área. Nesse processo, pecuaristas decidiram diminuir a lotação animal por área, mas isso gerava outro problema, pois necessitavam de mais áreas para poder realizar o manejo de gado (OLIVEIRA, 2005).

Em resposta a esse comportamento, o Brasil possui atualmente quase 30% de suas áreas de pastagens em estágio de degradação, isso indica um valor ao redor de 60 milhões de ha (EMBRAPA, 2011; SAE, 2014). A partir desse problema ambiental gerado pelas pastagens, houve-se a necessidade de recuperar essas áreas degradadas. Quando é possível adotar a prática de recuperação de áreas degradadas, é viável economicamente e ambientalmente, visto que o custo para recuperar uma área de pastagem é menor do que estabelecer uma nova área de pastagem. Dessa forma, a recuperação das pastagens degradadas e a adoção de sistemas de manejos intensivos ganham espaço no cenário agropecuário (OLIVEIRA, 2005).

Uma maneira de recuperar áreas degradadas pode ser pela introdução de árvores (como as leguminosas), por meio da deposição de biomassa, as árvores promovem aumentos da matéria orgânica e de outros nutrientes no solo (CARVALHO; XAVIER; ALVIM, 2001; DIAS et al. 2007).

A introdução de espécies de gramíneas tropicais de origem africana, como, por exemplo, do gênero *Brachiaria* sp. têm capacidade de armazenar quantidades significantes de carbono nos solos. Esse acúmulo de carbono no solo em áreas sob pastagem tem sequestrado o carbono presente na atmosfera para o solo (REZENDE et al., 1999; BODDEY et al., 2001; NEVES et al., 2004; SILVA et al., 2004).

Alguns dados retirados da literatura mostraram que os teores de MOS sob pastagens de *Brachiaria* podem ser maiores que os dos Cerrados virgens (KLUTHCOUSKI et al., 2006). Rezende e colaboradores (1999) mostraram em seus estudos que após 10 anos de substituição de uma mata nativa por pastagens cultivadas por *Brachiaria*, o estoque de MOS foi reposto pela forrageira e tendeu a aumentar, por meio da decomposição de seus resíduos vegetais, acumulando grande quantidade de carbono no solo.

Assim, a introdução de espécies gramíneas pode proporcionar o acúmulo de carbono no solo, que juntamente com pastagens bem manejadas e o não revolvimento do solo, proporcionam um manejo de pecuária sem impactos negativos (ROSCOE et al., 2006).

Uma proposta para minimizar o uso da terra para práticas de pecuária seria a intensificação do manejo, ou seja, “acomodar” um número maior de animais por hectares, a fim de liberar áreas para outro tipo de manejo. Porém, de acordo com Bouwman et al. (2005), o aumento na intensificação deverá ser obrigatoriamente acompanhado da melhoria no manejo.

Com o crescimento populacional e consequentemente o aumento no consumo de alimentos, a busca de alternativas sustentáveis do ponto de vista econômico, social e ambiental são fundamentais. A recuperação de pastagens é uma opção muito interessante, não apenas para reduzir o impacto ambiental causado pela pecuária, mas também para liberar área para outras práticas de agricultura, e consequentemente reduzir a necessidade de eliminação de florestas, as quais exercem um grande serviço ambiental na regulação das condições climáticas do mundo.

3.2 Solo e sua importância no ciclo de carbono

A formação do compartimento solo ocorre devido ao intemperismo causado à rocha mãe, podendo variar com o tipo do clima, exposição à atmosfera, hidrologia e seres vivos. Os fenômenos químicos, físicos e biológicos que agem sobre a rocha mãe conduzem a formação de partículas não consolidadas que vão se acumulando sobre o material de origem (BRADY; WEIL, 2008).

O solo tem grande importância ambiental, pois promove o crescimento das plantas, proporciona o suporte para vida, armazena água e nutrientes, promove trocas gasosas entre ele e a atmosfera e ainda, é considerado um importante compartimento para o ciclo global do carbono (MACHADO, 2005).

Com o intuito de minimizar as mudanças climáticas, o ciclo do carbono tem sido estudado por vários pesquisadores, uma vez que o carbono, quando na sua forma de gás carbônico (CO_2) e gás metano (CH_4), é um dos compostos chave nos processos que envolvem as mudanças climáticas globais (LAL et al., 2004a; CERRI et al., 2005).

O carbono está distribuído em cinco principais compartimentos do globo terrestre, sendo estes os oceanos, que contém cerca de 38000 Pg de carbono (1 Pg equivale a 10^{15} g) e é o maior compartimento de carbono presente no planeta Terra, as formações geológicas

contendo carbono fóssil e mineral (5000 Pg de C), a atmosfera (760 Pg de C), biosfera (560 Pg de C) e por fim o solo com estimativas de que existam 2500 Pg de carbono (IPCC, 2001; LAL et al., 2004a). A figura 1 ilustra os compartimentos de carbono com suas respectivas quantidades do mesmo.

Figura 1 - Principais compartimentos globais de carbono: oceano, formações geológicas, atmosfera, biosfera e solo. Os valores de C estão em petagrama que é equivalente a 1015 gramas. Os valores foram retirados de LAL et al., (2004a).

O balanço de C no ecossistema terrestre tem sofrido mudanças decorrentes da destruição das florestas, queimada de biomassa, mudança do uso e manejo do solo e poluição do ambiente. Tais mudanças liberam uma maior quantidade de GEE para a atmosfera, intensificando assim o efeito estufa e elevando a temperatura na superfície terrestre (BAIRD, 2002; CERRI et al., 2005).

Da quantidade total dos gases do efeito estufa (GEE) lançados para a atmosfera, 34% são oriundos da agricultura e da mudança do uso do solo (CERRI, et al., 2007). Essa estatística é prevista em um âmbito global, no Brasil atualmente, as emissões de gases de efeito estufa são de aproximadamente 1.500 MtCO₂e, destacando as atividades agropecuárias, essas que são responsáveis por aproximadamente 30% desse valor (SEEG, 2014; MCTI, 2014).

Segundo previsões realizadas pelo MAPA, a área para cultivo das principais lavouras e florestas plantadas aumentará cerca de 30% até o ano de 2030, para atender o crescimento do consumo populacional. A demanda por carnes e leite deve ser suprida com adicional de 75 milhões de cabeças de bovinos de corte, 10 milhões de cabeças de bovinos de leite e 14 milhões de cabeças de suínos, além de quase um bilhão de aves. Neste cenário existem sérios

riscos de que aumentem as emissões de CO₂e, sendo então de extrema importância a adoção de técnicas de produção de baixas emissões e alto sequestro de carbono, para que assim seja possível equilibrar o balanço de carbono no sistema produtivo (IPCC, 2014; OBSERVATÓRIO DO CLIMA, 2015).

Frente a essa situação, várias pesquisas têm sido realizadas nas últimas décadas a fim de minimizar a perda de carbono para a atmosfera. Alguns estudos sugerem que o sequestro de C pelo solo é um possível meio de aliviar o aumento dos GEE na atmosfera. Pela fotossíntese pode-se converter o carbono presente na atmosfera em massa vegetal, e, utilizando um manejo adequado desta massa vegetal é possível ainda reter o C no solo, caracterizando assim um “sequestro de carbono” da atmosfera pelo solo (LAL, 2004a; LAL, 2004b).

Algumas alternativas viáveis para a mitigação das emissões dos GEE pela prática de manejo no solo seria o reflorestamento, recuperação de áreas degradadas, sistemas de integração lavoura-pecuária e sistema de plantio direto (PD) (BODDEY et al., 2004; SILVA et al., 2004; LAL et al., 2004a; BAYER et al., 2006). Nicoloso (2005) sugere em seu estudo que a utilização de gramíneas da espécie *Brachiaria* spp. em pastagens, uma vez que essas pastagens estejam bem manejadas, indicam um acúmulo de C no solo. Bayer e colaboradores (2006) avaliaram o potencial do sequestro de carbono pelo solo, em sistemas de plantio direto, os resultados mostraram uma taxa de sequestro de carbono na ordem de 0,35 mg ha⁻¹ ano⁻¹.

Deve-se levar em consideração que a capacidade de armazenamento de C pelo solo depende de alguns fatores tais como: mineralogia do solo e textura do mesmo, tipo de manejo aplica ao solo, clima, e o tipo de cobertura vegetal (CORAZZA et al., 1999). Solos com vegetação natural preservada possuem uma matéria orgânica do solo (MOS) com preservação máxima, pois o revolvimento do solo é mínimo. Já em áreas que a agropecuária está presente, os teores de MOS tendem a diminuir, uma vez que a MOS está mais exposta a ação de micro-organismos em função do revolvimento e da desestruturação do solo (RYAN; LAW, 2005).

Em suma, o grande desafio é utilizar o solo levando em consideração a sua sustentabilidade, ou seja, realizar atividades agrícolas que atendam às necessidades socioeconômicas, mas sem comprometer a integridade desse solo, para que este possa suprir as necessidades humanas nas gerações futuras.

3.2.1 Matéria orgânica do solo

Os solos possuem em média 5% de MO em sua composição, porém, esta fração do solo determina em grande parte a produtividade do mesmo. Com isso, a matéria orgânica do solo (MOS) pode ser utilizada como atributo chave na avaliação da qualidade do solo, uma vez que a MOS é sensível a modificações sofridas pelos diferentes tipos de manejo do solo (BUDZIAK et al., 2004; CONCEIÇÃO et al., 2005).

Segundo Bayer et al. (2003), no Brasil, o estudo sobre a influência de diferentes sistemas de manejo, sobre a qualidade da matéria orgânica presente no solo ainda não é claro, principalmente no manejo de pecuária. Informações quanto a estrutura, composição química, e alterações resultantes da ação antropogênica na MOS também estão em fase de pesquisa, de acordo com González-Pérez et al. 2004.

A importância de se estudar a MOS é devido a uma série de funções que ela desenvolve no meio ambiente, que incluem a fertilidade, a reciclagem de nutrientes e de carbono (PRIMO et al., 2011). A MOS ainda está intimamente relacionada com vários parâmetros físicos e químicos do solo tais como a retenção de água, densidade do solo, acidez do solo, capacidade de troca catiônica (CTC), aeração, estabilidade de agregados e atividade microbiana. A quantidade de MOS é influenciada pelo tipo de vegetação, textura e umidade (SANTOS, 2006).

Sabe-se que a MOS constitui o maior reservatório dinâmico de carbono da superfície terrestre, e qualquer variação na abundância e composição desta perfaz importantes efeitos na dinâmica que ocorre entre os sistemas de armazenamento de C. Práticas de manejo e demais ações humanas, como queimadas, desmatamento e uso abusivo do solo podem causar mudanças na estrutura e perda da MOS, afetando diretamente o carbono presente no solo.

Bayer et al. (2004) constataram que em manejos onde ocorre o revolvimento das camadas superficiais do solo, ocorre queda no estoque de MOS, conseqüentemente perda de C para a atmosfera, intensificando efeitos climáticos como o efeito estufa. Em contrapartida, solos que são aplicados o sistema de plantio direto, a taxa de decomposição da MOS é de aproximadamente 50% menor do que em solos sob sistema de preparo convencional, resultando um acúmulo no estoque de C orgânico (CIOTTA et al., 2003).

A MOS é definida como uma mistura de compostos em vários estágios de decomposição, resultantes da degradação biológica de plantas e animais (STEVENSON, 1994). É constituída, basicamente, de dois tipos de substâncias: as húmicas (ácido húmico, ácido

fúlvico e humina) e não húmicas (proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos orgânicos, entre outros). As substâncias não húmicas possuem grupos de moléculas mais simples e com isso possuem características físicas e químicas bem definidas. Essa fração da matéria orgânica é mais facilmente degradada por micro-organismos presentes no solo.

As substâncias húmicas, por sua vez, possuem uma estrutura mais complexa, sofrendo variações na massa molecular, na estrutura e na composição química, dificultando assim a definição de uma estrutura química para as SH. Consequentemente, as características físicas e químicas não são bem definidas (STEVENSON, 1994).

3.2.2 Substâncias húmicas

Há décadas são realizados estudos envolvendo as SH, essas que são o principal componente da matéria orgânica encontrada no solo, e são importantes por contribuírem com cerca de 85 a 90% do carbono em sua forma orgânica, encontrado no solo (SIMPSON, 2001; PRIMO et al., 2011).

As SH exercem influência direta nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, elas podem auxiliar na germinação de sementes e desenvolvimentos de raízes devido a sua coloração escura que proporciona a retenção de calor pelo solo (NARIMOTO, 2006). As SH podem interagir com os metais e a argila presente no solo, formando a ligação argila-metal-SH, onde a parcela hidrofílica da SH orienta-se em direção ao interior dos agregados, de maneira que a parcela hidrofóbica se orienta para a face externa, originando uma camada que repele a água, reduzindo assim a perda de água do solo, evitando a erosão do mesmo (BASTOS et al., 2005).

Ainda sobre as propriedades das SH, elas possuem boa capacidade tamponante ao solo, auxiliando na distribuição de macro e micronutrientes. Rocha e Rosa (2003) destacaram a capacidade que as SH apresentam de interagir com espécies metálicas e orgânicas presentes no solo.

O potencial de interagir com os metais se dá devido a presença de grupos funcionais distintos, tais como carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas (CHIEN; HUANG; WANG, 2003), assim, com uma estrutura polifuncional as SH assumem um comportamento polieletrólítico e atuam como agentes complexantes de vários íons metálicos, além de

adsorverem diversos poluentes orgânicos, como pesticidas, diminuindo as concentrações desses materiais no ambiente (ROCHA; ROSA, 2003).

A interação das SH com os metais tem uma importância ambiental, pois mesmo em concentrações muito pequenas, as SH podem interagir com os metais presentes no solo (MARTINS, 2008). No caso de metais tóxicos, a formação de complexos desses metais com as SH ajuda na redução dos impactos ambientais que os metais podem causar ao meio ambiente, uma vez que complexados há uma diminuição na toxicidade desses metais (ZHOU et al., 2005).

Outro aspecto ambiental importante que envolve as SH é o fato que elas são consideradas o maior reservatório de carbono orgânico refratário presente nos solos (ROSA et al., 2005). Uma vez que as SH são mais resistentes à degradação microbiana do que outras frações presentes na matéria orgânica, faz com que o carbono presente nas SH esteja mais inerte, ou seja, quanto maior for o grau de estabilização das SH, por maior tempo o carbono presente nessa fração estará “sequestrado” no solo, evitando assim liberação de gases que potencializam o efeito estufa (SEGNINI, 2007).

O tipo de uso e ocupação do solo, a sazonalidade, clima, pluviosidade, entre outros fatores, possuem influência na formação das substâncias húmicas, não apenas na sua composição, mas também no tipo de processo que a originou e o grau de humificação, consequentemente fazendo com que esta apresente estrutura diferente de acordo com esses fatores (MCKNIGHT et al. 1985; SARGENTINI et al. 2001; ALBERTS; TAKÁCS, 2004; FILELLA; PARTHASARATHY; BUFFLE, 2005; ESTEVES; OTERO; DUARTE, 2009).

Alguns autores definem o processo de humificação como sendo um processo químico, físico e biológico, no qual há uma transformação de materiais macromorfologicamente identificáveis em compostos amorfos (ALVAREZ-PUEBLA et al., 2004; ROSA et al., 2005). Existe ainda na literatura autores que defendem que a humificação pode ser definida como um processo de preservação seletiva de biopolímeros e a policondensação de moléculas pequenas (CANELLAS et al., 2003).

As principais vias de formação das substâncias húmicas no solo ocorrem por oxidação dos substratos hidrolisados monoméricos, promovendo a quebra e reações de seus substratos a polímeros macromoleculares de massa molecular elevada (ROCHA; ROSA, 2003).

A variedade de materiais de origem e o grande número de caminhos reacionais possíveis para a formação das SH são a razão para as dificuldades na sugestão de uma estrutura precisa para as mesmas. Alguns autores sugeriram possíveis estruturas para as

substâncias húmicas. A figura 2 mostra o modelo macromolecular de ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer (1993). Nesse modelo, existem cadeias alifáticas, funções oxigenadas como ácido carboxílicos, fenóis, éter, éster e compostos nitrogenados.

Figura 2 - Modelo macromolecular de ácido húmico proposto por Schnitzer e Schulten (1993).

Esse modelo macromolecular foi proposto baseando-se em várias técnicas analíticas como espectroscopia, degradação oxidativa pirólise e microscopia eletrônica. Devido a elevada massa molecular apresentada, as SH poderiam ter uma estrutura macromolecular (SIMPSON et al., 2002).

Alguns anos depois, os mesmos autores (SCHULTEN e SCHNITZER, 1997) realizaram experimentos de pirólise acoplada a um espectrômetro de massa, onde propuseram um modelo tridimensional para o ácido húmico. A figura 3 ilustra o modelo do AH, nesse modelo fica evidente a presença de espaços vazios no interior da molécula de AH. Esses espaços vazios poderiam interagir com várias substâncias presentes no ambiente, como por exemplo, pesticidas, metais e alguns minerais, justificando assim a interação das SH com outros compostos presentes no solo.

Figura 3 - Modelo tridimensional de ácido húmico proposto por Schnitzer e Schulten (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.

Depois do modelo macromolecular proposto para as SH, alguns autores ainda questionavam esse modelo estrutural das SH. Piccolo e Conte (2000) deram origem ao modelo supramolecular para as SH, nesse modelo a elevada massa molecular das SH é devido as interações entre moléculas pequenas e heterogêneas, oriundas de várias fontes diferentes.

Utilizando a cromatografia de exclusão por tamanho, Piccolo (2001) mostrou evidências para a natureza conformacional das SH, onde as SH devem ser consideradas como associações supramoleculares de moléculas com massa molecular pequenas, as quais se estabilizam por forças dispersivas fracas (Van der Waals e ponte de hidrogênio) ao invés de ligações covalentes.

Simpson et al. (2002), baseado na teoria proposta por Piccolo (2001), esquematizaram um modelo para as estruturas das SH. No modelo, existem associações entre as moléculas pequenas que são do tipo hidrofóbicas, interações de carga, ligações de hidrogênio e pontes metálicas. O modelo proposto por Simpson et al. (2002) está ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Modelo esquemático de estrutura das substâncias húmicas proposto por Simpson et al. (2002). Em (A) observa-se a proposta de que as SH sejam uma única macromolécula, já em (B) observa-se a proposta de que as SH sejam um agregado de moléculas com menor massa molecular. Em (vermelho) representa-se cátions metálicos, em (marrom), fragmentos de lignina, em (azul), polipeptídeos, em (preto), polissacarídeos e em (verde), cadeias alifáticas.

Diallo et al. (2003) e Conte et al. (2007), utilizando métodos computacionais e dados experimentais, observaram que as estruturas existentes nas SH possuem características necessárias para sustentar o modelo supramolecular. Porém, até os dias atuais ainda não se consolidou um modelo estrutural definitivo para as SH, uma vez que essas são oriundas de fontes heterogêneas, dificultando a definição de um modelo estrutural para as SH.

Com a finalidade de facilitar os estudos das SH, pesquisas são focadas nos componentes diferentes das substâncias húmicas, que são os AH, AF e a humina. A separação dessas três frações se dá pela solubilidade no meio aquoso, onde o AH é solúvel em meio ácido (pH menor que 2), o AF é solúvel apresenta solubilidade em qualquer meio (ácido ou alcalino) e a humina é insolúvel em qualquer faixa de pH (SWIFT, 1996).

Os AF são originados, principalmente, pela associação de pequenas moléculas hidrofílicas (aminoácidos, compostos fenólicos e polissacarídeos) que apresentam grupos funcionais como ácidos carboxílicos e fenólicos, os quais mantêm seus constituintes solúveis em qualquer faixa de pH. A fração dos AF é considerada a de menor porção nas SH e apresenta a maior reatividade e mobilidade no solo, devido à quantidade de grupos funcionais que o AF apresenta em sua estrutura (PICCOLO, 2001; PRIMO et al., 2011).

Já os AH são originados, principalmente, pela associação de compostos hidrofóbicos, que são estáveis em pH neutro devido às forças dispersivas hidrofóbicas (PICCOLO, 2001; CONTE et al., 2007). Os AH possuem maior massa molecular, maior teor de carbono e menor teor de oxigênio, quando comparados aos AF. Os AH tem mais compostos aromáticos, menos compostos carboxílicos e grupos C-O alquil do que os AF (PICCOLO, 2001).

A humina é considerada a parte menos reativa das substâncias húmicas, devido à elevada hidrofobicidade e forte interação com os componentes inorgânicos presentes no solo (RICE, 2001). Devido essas características, a humina tem sido a fração menos estudada das SH, porém isso não descarta a importância no entendimento dessa fração no solo. Um estudo recente mostrou que, SH extraídas de alguns pontos do solo amazônico, podem conter de 80 até 93 % de humina, e essa ainda contribui com mais de 40% do carbono presente nas SH do solo (TADINI et al., 2015).

3.3 Técnicas analíticas utilizadas no estudo da matéria orgânica do solo

Para a caracterização da matéria orgânica presente no solo, tem sido empregado várias técnicas analíticas, tais como os métodos químicos e espectroscópicos. Essas técnicas têm contribuído na avaliação de possíveis mudanças sofridas pela MOS e suas frações húmicas, de acordo com as práticas de manejo que são aplicadas ao solo.

3.3.1 Métodos químicos

3.3.1.1 Análise elementar (CHNS)

A composição elementar da matéria orgânica do solo pode fornecer características importantes sobre a mesma. Segundo alguns autores, a composição elementar das SH é basicamente carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, sendo o carbono e o oxigênio os elementos mais abundantes (STEVENSON, 1994).

Existem vários métodos para determinar os elementos presentes na MOS. Carbono e hidrogênio podem ser quantificados por combustão completa à seco, nitrogênio pelos métodos de Dumas ou de Kjeldahl, oxigênio por pirólise redutiva e enxofre por combustão (HUFFMAN Jr.; STUBER, 1985).

Em todo caso, a análise elementar (CHNS) é a técnica mais confiável na quantificação de carbono, e pode ser utilizada como referência na estimativa de carbono por outras técnicas instrumentais. A análise elementar (CHNS) é considerada uma técnica analítica que dispensa grande parte do preparo de amostra, gerando uma quantidade menor de resíduos químicos.

Os analisadores elementares automáticos são muito eficientes, pois permitem análises confiáveis e rápidas (JIMENEZ; LADHA, 1993). Os analisadores elementares atuais são baseados na oxidação das amostras em altas temperaturas (cerca de 1000°C), após a combustão, os gases gerados são CO₂ para o carbono, H₂O para o hidrogênio, NO₂ para o nitrogênio e SO₂ para o enxofre, os quais são eluídos e separados por uma coluna cromatográfica. Após a passagem pela coluna cromatográfica, esses gases são detectados, normalmente por condutividade térmica (SKOOG et al., 2002).

Com o auxílio desse método químico, pode-se então calcular a quantidade de carbono presente no solo inteiro e nas frações da MOS. Esses dados ajudam na caracterização das MOS e também, no quanto de carbono essa MOS está conseguindo estocar em sua estrutura. Pesquisas sugerem que a quantidade de carbono presente nas amostras de AH, em diferentes tipos de solo, podem variar de 53,8 a 58,7% de C (SCHNITZER; KHAN, 1978; STEVENSON, 1994).

3.3.2 Métodos espectroscópicos

Os métodos espectroscópicos têm sido muito utilizados na caracterização da MOS e de suas frações, devido a facilidade no preparo de amostras, a rapidez nas análises espectroscópicas e no baixo custo.

As análises espectroscópicas fornecem informações quanto as estruturas da MOS, permitem a identificação de grupos funcionais existentes nas amostras e ainda auxilia no entendimento das possíveis mudanças sofridas pela MOS, de acordo com o tipo de manejo aplicado (GONZÁLEZ-PEREZ et al., 2004).

3.3.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho consiste em método analítico qualitativo muito utilizado, por ser uma técnica rápida, confiável, barata e de fácil preparo de amostra. O espectro de infravermelho disponibiliza informações sobre grupos funcionais, que podem

estar presentes nas estruturas das substâncias analisadas. O espectro fornece também a natureza das ligações químicas presentes na amostra, a sua reatividade e o arranjo estrutural de grupos funcionais contendo átomos de oxigênio (STEVENSON, 1994).

A região espectral do infravermelho se encontra entre a região do visível e micro-ondas, como mostra a figura 5. Essa região compreende radiação com números de ondas no intervalo de aproximadamente 12.800 a 10 cm^{-1} , sendo esse intervalo dividido em três regiões conhecidas como infravermelho próximo (12.800 a 4.000 cm^{-1}), médio (4.000 a 200 cm^{-1}) e distante (200 a 10 cm^{-1}) (MARTINS, 2009). A região mais utilizada para o estudo analítico está situada no intervalo do infravermelho médio (4.000 a 400 cm^{-1}) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Figura 5 - Espectro eletromagnético.

Fonte: Climate Science Investigations

A espectroscopia na região do infravermelho possibilita a identificação de diferentes ligações químicas entre os átomos, pelas deformações rotacionais e vibracionais, as quais absorvem energia em determinada frequência de ressonância, de acordo com as características químicas dos átomos envolvidos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Dois tipos fundamentais de vibrações moleculares podem ser distinguidos: i) o estiramento, no qual os átomos envolvidos vibram no mesmo eixo da ligação, variando somente o comprimento da ligação entre os átomos, e ii) a deformação, que ocorre a mudança da posição dos átomos em vibração, em relação ao eixo da ligação. A figura 6 mostra os principais tipos de vibrações moleculares.

Figura 6 - Vibrações moleculares típicas. Os sinais (+) e (-) significam vibrações perpendiculares ao plano do papel.

Fonte: Stuart, 1996.

A aquisição dos dados é feita quando a radiação de infravermelho incidida na amostra tem a mesma frequência de vibração (estiramento ou deformação), das moléculas em análise. A energia então é absorvida e a amplitude de vibração é aumentada. O sinal é então enviado ao detector do espectrômetro de infravermelho (IV), o qual assimila um pico de absorção no comprimento de onda específico, devido à energia alterada pela absorção na frequência de ressonância (STEVENSON, 1994).

Na avaliação das SH tem sido muito utilizado a espectroscopia de infravermelho, pois essa técnica permite identificar possíveis processos de oxidação e alterações de grupos funcionais associados aos efeitos de manejos, mudança do pH, entre outros processos ocorridos no solo. Pode-se verificar também, em um espectro de infravermelho, o grau de purificação no processo de extração de SH, uma vez que algumas bandas encontradas no espectro são atribuídas a impurezas inorgânicas, como a presença de gibbsita, caulinita e o próprio quartzo (BENITES et al., 1999; SANTOS, 2006).

Benites e colaboradores (1999) analisaram ácidos húmicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo. Os autores observaram uma diferença entre os espectros purificados com ácidos fluorídricos e ácidos clorídrico, (HF-HCl), e os não purificados. Os espectros obtidos no estudo estão ilustrados na figura 7. Verificou-se que nos espectros não purificados existem

bandas de absorção referentes à deformação angular na ligação de O-H em gibbsita ou caulinita (536 cm^{-1}), e banda referente à deformação de Si-O em caulinita (468 cm^{-1}).

Figura 7 - Espectros de absorvância no infravermelho dos ácidos húmicos purificados e não purificados, extraídos do horizonte A de um Latossolo Vermelho-Amarelo.

Fonte: Benites et al., 1999.

A espectroscopia de infravermelho é então uma técnica muito viável nos estudos de SH, que somada com outras técnicas analíticas, auxilia muito no estudo da caracterização das SH.

3.3.2.2 Espectroscopia de fluorescência de luz UV-Visível

Algumas substâncias, quando excitadas por uma radiação na região do ultravioleta ou na região do visível, conseguem emitir luz. Essa propriedade é chamada de luminescência ou fotoluminescência (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002). O fenômeno de luminescência pode ser dividido em duas categorias, sendo uma denominada de fluorescência e a outra de fosforescência. O que difere as duas categorias é o tempo de decaimento dos elétrons excitados, para o estado fundamental. Na fluorescência o tempo de decaimento é de 10^{-11} até 10^{-7} segundos, já a fosforescência requer mais tempo, cerca de 10^{-4} até 10 segundos (ATKINS, 1998).

Quando a radiação é absorvida pela matéria pode-se promover transições eletrônicas com emissão de radiação. As transições eletrônicas são compreendidas através da mecânica quântica, sendo que os processos envolvidos são probabilísticos e cada fóton da radiação incidente fornece um quantum de energia. Para uma dada frequência de radiação ν , os fótons da radiação possuem uma energia quantizada dada pela relação de Planck, $E = h \nu$, onde h é a constante de Planck. Assim, para que a absorção dessa radiação ocorra e o elétron do estado fundamental seja excitado para um estado de maior energia, a frequência deve corresponder à separação de energia entre os dois estados eletrônicos (fundamental e excitado) (LAKOWICZ, 2006).

Muitos processos podem acontecer, após a absorção da radiação. O diagrama de Jablonski, mostrado na figura 8, ilustra os possíveis processos de maneira simplificada.

Figura 8 - Diagrama de Jablonski.

Fonte: Cardinali, 2012.

No diagrama, os estados eletrônicos singletos estão representados pela letra S e o estado eletrônico tripleto pela letra T. O sub-índice 0 equivale ao estado fundamental e os sub-índices 1 e 2 equivalem aos estados excitados. Cada linha do estado eletrônico corresponde aos níveis de energia vibracionais, representados pelos números 0, 1 e 2. Assim, quando a amostra absorve radiação, os fluoróforos presentes são excitados para um estado vibracional de energia mais elevada, como por exemplo do S₀ para o S₁, logo após a excitação, parte da energia do fóton incidente é dissipada por vibrações moleculares. O retorno do elétron para o seu estado de origem ocorre com a emissão de radiação, e a transição entre os

estados do tipo singlete (exemplo: S_1 e S_0) com emissão de radiação é chamada de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

Em compostos orgânicos, a fluorescência ocorre tipicamente em estruturas rígidas, ou seja, cadeias fechadas e com ligações duplas. A ausência de rigidez em moléculas que possuem cadeias lineares e longas, aumenta a taxa de relaxação vibracional. A rigidez de compostos aromáticos garante que a energia da radiação incidente não seja perdida completamente em relaxações vibracionais (LAKOWICZ, 2006). Assim, a estrutura da molécula juntamente com suas ligações químicas são fatores importantes na emissão da fluorescência.

A utilização dessa técnica para o estudo de SH é intrinsicamente viável, visto que as SH são substâncias ricas em estruturas fluorescentes, denominadas “fluoróforos”, que são grupos cromóforos que apresentam fluorescência em comprimento de onda específico, incluindo desde estruturas aromáticas condensadas e cadeias alifáticas insaturadas (MILORI et al., 2002). A espectroscopia de fluorescência vem sendo amplamente reconhecida também, por ser uma técnica com alta sensibilidade, seletividade, simplicidade no preparo de amostra e proporciona rapidez na obtenção dos resultados. As informações obtidas pela fluorescência das SH permitem a diferenciação e a classificação da matéria orgânica em vários aspectos, tais como a sua natureza, origem, gênese e ainda informações sobre as modificações sofridas pela MOS (SENESI et al., 1991, KALBITZ et al., 1999; PLAZA et al., 2006).

Com base nas propriedades de fluorescência da MOS, algumas metodologias foram sugeridas na literatura, para determinar o grau de humificação das SH (ZSOLNAY et al., 1999; KALBITZ et al., 1999; MILORI et al., 2002).

Os métodos propostos por esses três autores são avaliados com a aplicação dos espectros bidimensionais de fluorescência, os quais podem ser obtidos pelo modo de excitação, emissão e varredura sincronizada (SENESI et al., 1992).

Para a obtenção de espectros de emissão, faz-se uma varredura dos comprimentos de onda de emissão, fixando um único comprimento de onda de excitação. Já para os espectros obtidos no modo de excitação, faz-se o contrário, varia-se os comprimentos de onda de excitação e fixa-se um único comprimento de onda de emissão. Os espectros de varredura sincronizada são obtidos medindo a intensidade de fluorescência enquanto, simultaneamente, são varridos os comprimentos de ondas de excitação e emissão, mantendo-se constante a diferença de comprimento de onda entre eles ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{emissão}} - \lambda_{\text{excitação}}$).

Na metodologia proposta por Zsolnay et al. (1999), os autores consideram que a humificação da MO leva a condensação de anéis aromáticos, e esse processo faz com que a fluorescência da amostra se desloca para comprimentos de ondas maiores (região do vermelho) no espectro. Os espectros obtidos pelos autores utilizam o modo emissão, com comprimentos de onda que vão de 350 a 650 nm, com excitação em 240 nm. Para calcular o índice de humificação o espectro de emissão é dividido em quatro partes e o índice de humificação se dá pela razão entre as áreas do último quarto (570 - 641 nm) pelo primeiro quarto (356 - 432 nm), ou seja, A_4/A_1 . Ressaltando que a área do último quarto corresponde às estruturas mais humificadas, em contrapartida a área do primeiro quarto se refere às estruturas mais simples (ZSOLNAY et al., 1999; MILORI et al., 2002).

No método proposto por Kalbitz et al. (1999), o espectro é obtido no modo de varredura sincronizada, na região de 300 a 520 nm, mantendo a diferença de comprimento de onda constante, $\Delta\lambda = (\lambda_{\text{emissão}} - \lambda_{\text{excitação}}) = 55 \text{ nm}$. De acordo com essa metodologia, o espectro de varredura sincronizada das SH apresenta dois picos ao redor de 360 e 400 nm e um ombro em torno de 470 nm. As intensidades dessas bandas podem sofrer mudanças, dependendo do grau de humificação das amostras analisadas. A região do espectro com comprimentos de onda maiores (região do vermelho), está associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados. A região mais para o azul, ou seja, menor comprimento de onda, está associada a compostos mais simples. Assim, a razão entre a intensidade de fluorescência em 400 e 360 nm (I_{400}/I_{360}), ou 470 e 360 nm, pode ser utilizada para medir o grau de humificação das SH (KALBITZ et al., 1999; MILORI et al., 2002).

Por último, a metodologia proposta por Milori et al. (2002) consiste em utilizar o comprimento de onda em 465 nm (na região do azul), como fonte de excitação, e o espectro é obtido no modo de emissão. Esta absorção é mais ressoante com estruturas cuja concentração aumenta com o avanço do processo de humificação da MOS. Assim, neste método a área total sob o espectro de emissão de fluorescência com excitação em 465 nm (A_{465}) deve ser proporcional ao grau de humificação (MILORI et al., 2002).

Com o avanço e a chegada de espectrômetros mais modernos, os espectros podem ser obtidos pelo modo tridimensional (comumente chamado de fluorescência tridimensional), ou seja, os dados são gerados em matrizes de excitação-emissão (MEE). Para a aquisição das MEE, faz-se uma varredura nos comprimentos de onda de excitação, mantendo-se constante

o comprimento de onda de emissão, e o contrário é feito para obter os espectros de emissão (TREVISAN, 2003).

A projeção dos espectros, espectros de excitação juntamente com os espectros de emissão, gera uma superfície tridimensional de fluorescência total, destacando a presença de todos os pares de excitação-emissão dos fluoróforos presentes na amostra (TREVISAN, 2003).

Essa forma de obter dados de fluorescência da MOS permite um avanço considerável, quando comparado com os métodos tradicionais (fluorescência bidimensional) (Guo et al., 2015). Essa técnica disponibiliza informações sobre o número, o tipo e também a abundância de fluoróforos presentes na MOS (STEDON; MARKAGER; BRO, 2003). Como exemplo, Coble (1996) utilizou a fluorescência MEE para diferenciar a matéria orgânica dissolvida (MOD) marinha, da MOD terrestre, onde verificou que os espectros tridimensionais da MOD marinha possui fluorescência máxima em comprimentos de ondas menores, que os encontrados para a MOD terrestre.

O uso de ferramentas estatísticas como análises dos componentes principais (PCA), regressão por mínimos quadrados parciais e análises dos fatores paralelos (PARAFAC) têm sido utilizadas com a finalidade de realizar uma análise mais completa dos dados (STEDON; MARKAGER; BRO 2003; STEDON; BRO, 2008; GUO et al., 2015). As MEE juntamente com as análises de PARAFAC, oferecem informações mais detalhadas sobre as características das amostras de solo, a análise de PARAFAC pode dividir as MEE em componentes de fluorescência (STEDON; MARKAGER; BRO, 2003; GUO et al., 2015).

3.3.2.3. Supressão de Fluorescência

A matéria orgânica, como já discutido, consiste em uma mistura complexa de substâncias orgânicas, que contém uma variedade de grupos funcionais orgânicos diferentes, como os grupos carboxílicos, fenóis, álcoois, tióis e aminas (SMITH; BELL; KRAMER, 2002; GUO et al., 2015). Todos esses grupos mencionados podem ser responsáveis pela complexação com íons metálicos (KARLSSON; PERSSON; SKYLLBERG, 2006).

A presença de metais no solo faz com que seja indispensável estudar as interações da MOS, quando em contato com esses metais. Vale concentrar os estudos principalmente nas frações humificadas, como por exemplo, os ácidos húmicos, que interagem muito com metais presentes no solo (PLAZA et al., 2006).

Íons metálicos paramagnéticos, como o íon cobre II (Cu II), entram em contato com as frações mais humificadas do solo, que como consequência, formam complexos e esses geralmente possuem um rendimento quântico de fluorescência menor, do que o ligante livre. A partir desse processo, informações quantitativas sobre o fenômeno de complexação podem ser obtidas (RYAN; WEBER, 1982; MACHADO; ESTEVES da SILVA; MAIA, 1994; ESTEVES da SILVA et al., 1998).

Vários métodos e técnicas têm sido usados para estudar a matéria orgânica presente no solo, na presença de íons metálicos. Dentre os métodos, a espectroscopia de fluorescência é muito utilizada para avaliar as estruturas e possíveis mudanças na composição na MOS, quando em contato com espécies metálicas (KALBITZ et al., 1999; PLAZA et al., 2006). A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que possui alta sensibilidade, possui um preparo de amostra mais simples e ainda não é destrutiva, fazendo assim com que a técnica seja mais favorável nos estudos entre a interação da matéria orgânica com íons metálicos (ESTEVES da SILVA et al., 1998).

Dentre os estudos das propriedades de fluorescência tem se destacado o uso da supressão da fluorescência. A supressão da fluorescência pode ser definida como o decréscimo ou mudança da intensidade de fluorescência na presença de espécies metálicas (MOUNIER et al., 2011).

Pesquisadores têm usados a fluorescência da MEE durante o experimento de supressão da fluorescência para estudar a presença de sítios de complexação de metais na MOS (MOUNIER et al., 2011; YUAN et al., 2015).

No entanto, a avaliação do espectro de matriz de excitação-emissão da matéria orgânica do solo pode não ser fácil, devido aos vários tipos de sobreposição dos fluoróforos existem na amostra (HENDERSON et al., 2009). Com os avanços das análises do espectro de MEE usando a ferramenta PARAFAC, tem se provado uma boa solução para o problema de sobreposição de fluoróforos (BRO, 1997; MURPHY et al., 2006).

As análises dos fatores paralelos (PARAFAC) consegue dividir as MEE em componentes de fluorescência, podendo assim obter informações mais específicas da MOS (STEDMON; BRO, 2008; GUO et al., 2015).

Alguns autores têm utilizado essa técnica de fluorescência para determinar a capacidade de ligação entre ácidos húmicos e fúlvicos oriundos da MOS na presença de íons como cobre (II), ferro (II) e alumínio (III) e também determinar a constante de estabilidade

condicional (K) do complexo formado metal-MOD (RYAN; WEBER, 1982; COBLE, 1996; PLAZA, 2006; MOUNIER, 2011).

A associação da matéria orgânica com espécies metálicas leva a formação de espécies complexas de metal-MO, onde a matéria orgânica (MO) se comporta como a espécie ligante. Com essa associação, verifica-se as propriedades de complexação da matéria orgânica (RYAN; WEBER, 1982). Normalmente a fluorescência dessas espécies é menor, quando comparado com as espécies livres de ligantes, exceto para cátions tipo Al^{+3} (MOUNIER, 2011).

A obtenção de alguns parâmetros como a constante de estabilidade condicional (K), pode ser possível usando a técnica de titulação de fluorescência combinado com a abordagem matemática introduzida por Ryan e Weber (1982) (HERNANDEZ et al., 2006).

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Área experimental

A área experimental está localizada na Embrapa Pecuária Sudeste – Fazenda Canchim, em São Carlos-SP (latitude 22°11' sul e longitude 47°53' oeste), com média de altitude de 856 m. A logística das coletas de solos foi conduzida pelos alunos de doutorado (Alfredo Augusto Pereira Xavier) e pós-doutorado (Aline Segnini), juntamente com o auxílio da equipe interdisciplinar presente na Embrapa Pecuária Sudeste e Instrumentação.

O clima local é considerado tropical de altitude, que, segundo a classificação de Köppen, é o Cwa, clima quente com inverno seco. A área compreende um total de 22,5 hectares, sendo 10,5 ha de *Brachiaria decumbens* e 12 ha de *Panicum maximum* cv. *Mombaça*.

Os sistemas de pastagens avaliados estão divididos em quatro áreas as quais foram denominadas: A1 – Intensiva irrigada e alta lotação animal, A2 – Intensiva de seuqueiro e alta lotação animal, A3 – Em recuperação e média lotação animal, A4 – Degradada e média lotação animal. As características dos sistemas de pastagens estão descritas abaixo:

A1. Intensiva irrigada e alta lotação animal: A pastagem utilizada foi a *Panicum maximum* cv. *Mombaça*, localizada em um Latossolo Vermelho distrófico, implantada em 2002, sendo manejada com irrigação em esquema intensivo com correção do solo e fertilizações anuais. Esta área foi manejada com machos Nelore nas fases de recria. A lotação animal é de 6 a 8 ua/ha na estação das águas e 1 a 1,5 ua/ha na estação seca. Os cálculos das doses dos corretivos e fertilizantes foram realizados segundo Oliveira e colaboradores (2008), com dose de 600 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹, dividida em adubações de cobertura pós pastejo. Essas adubações foram realizadas há no mínimo 10 anos a cada 33 dias. O controle da irrigação é realizado por Evaporação/Precipitação/Solo (EPS).

A2. Intensiva de seuqueiro e alta lotação animal: Possui as mesmas características de vegetação e tipo de solo do sistema anterior, porém em condição intensiva de seuqueiro. As doses dos corretivos e fertilizantes também foram calculadas segundo Oliveira e colaboradores (2008), com dose de 400 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, dividida em adubações de cobertura pós pastejo.

A3. Em recuperação e média lotação animal: A pastagem utilizada foi a *Brachiaria decumbens*, localizada em um Latossolo Vermelho distrófico. O sistema foi utilizado por vacas de cria durante o período de estação de monta e gestação, cerca de 2 a 3 ua/ha na estação das águas e 0,7 a 1 ua/ha na época seca. Para a recuperação direta de pastagens utilizou-se a correção do solo e fertilização, os quais foram calculados para atingir cerca de 2 a 3 ua ha⁻¹ na estação das águas (novembro a abril) e 0,7 a 1 ua ha⁻¹ na época seca (maio a setembro) segundo Oliveira e colaboradores (2008). As doses dos corretivos e fertilizantes foram calculadas em 200 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹. A fonte de nitrogênio empregada foi a ureia e a forma de aplicação foi a lanço e parceladas em três e quatro aplicações (adubações de cobertura) após os pastejos da época das águas.

A4. Degradada e média lotação animal: Possui as mesmas características da A3. A área apresentava-se em degradação desde 1996 até o momento do estudo, mas passível de recuperação. É mantida com baixa lotação animal, invadida com grama batatais e *Brachiaria humidicola* e algumas espécies arbustivas. A pastagem não recebeu nenhum tipo de correção do solo e fertilização. Durante o período do projeto estava sendo manejada com machos Nelore.

A5. Área de referência (mata nativa): Os quatro sistemas avaliados foram comparados com área de vegetação natural, a Mata Atlântica (Floresta Tropical Subcaducifolia).

A figura 9 mostra os pontos de coleta das amostras das cinco áreas estudadas. Os pontos em azul, vermelho, verde, amarelo e rosa representam as trincheiras abertas nas áreas A1, A2, A3, A4 e A5, respectivamente.

Figura 9 - Representação das quatro áreas de pastagem e mata nativa (área de referência). Imagem coletada a partir dos dados das coordenadas geográficas (Google Maps).

Estudos prévios realizados na mesma área experimental classificaram o solo quanto a sua textura. Os resultados mostraram que as áreas degradada, irrigada e a mata nativa possuem textura média, enquanto que as áreas de sequeiro e em recuperação possuem textura argilosa, tanto na superfície do solo (camada de 0 a 5 cm) quanto em profundidade (camada de 80 a 100 cm), indicando que os sistemas estão alocados em uma área de transição entre textura média e argilosa.

4.2 Coleta das amostras

As amostras de solo foram coletadas por meio de trincheiras abertas no solo, com largura de 100 cm e com profundidade de 120 cm. Coletaram-se amostras a partir da superfície do solo até uma profundidade de 100 cm. Foram coletadas seis replicatas de campo para cada profundidade selecionada, sendo estas de 0-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40 40-60, 60-80 e 80-100 cm. Como foram cinco áreas avaliadas, sendo oito o total de profundidades e seis replicatas de campo obteve-se um total de 240 amostras de solo.

Para a extração das substâncias húmicas do solo, foram realizadas amostragens compostas com as seis replicadas de solo coletadas, nas oito profundidades do perfil do solo, para as cinco áreas estudadas, em que as seis replicatas resultaram em apenas uma amostra composta de solo, para cada profundidade. Dessa forma, reduziu-se as 240 amostras em 40 amostras de solo.

4.3 Preparo das amostras de solo para extração

Amostras coletadas foram secas ao ar. Raízes e restos de vegetais foram removidos. Em seguida, as amostras foram trituradas com a utilização de almofariz e pistilo e peneiradas a 2 mm.

4.4 Extração e purificação dos ácidos húmicos

A extração dos ácidos húmicos seguiu as recomendações descritas pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) (SWIFT, 1996), baseado nas características de solubilidade em meio aquoso.

Para a extração, pesaram-se 200 g de solo e adicionaram-se 2 litros de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ (obedecendo a proporção de 10 mL de solução para 1 g de solo). A solução foi agitada manualmente por 1 hora e depois permaneceu em repouso por 2 horas. Após o repouso, houve decantação do resíduo, sendo o sobrenadante o extrato fúlvico 1 (figura 10a). O extrato 1 foi separado do resíduo sólido por sifonação, neutralizado a seguir e descartado. Ao resíduo sólido, foi adicionado 2 L de NaOH 0,1 mol L⁻¹, a solução foi então agitada manualmente por 4 horas e depois deixada em repouso de 16 a 18 horas. Após esse período de repouso, separou o decantado (humina) do sobrenadante por centrifugação (15 minutos a 10000 g) (figura 10b). Nessa etapa da extração, a humina foi a primeira fração das SH a ser isolada.

Em seguida, foi adicionado ao sobrenadante 40 mL de HCl 6 mol L⁻¹, misturou a solução e deixou em repouso por 16 horas para decantação. Após o repouso, o precipitado é referente à fração de ácido húmico e o sobrenadante é referente ao extrato fúlvico 2. As duas frações foram separadas novamente por sifonação e centrifugação.

A partir dessa etapa, iniciou-se o processo de purificação dos ácidos húmicos, que era a nossa fração de interesse no estudo. Foi feita a dissolução dos AH em solução de KOH 0,1 mol L⁻¹ com adição de KCl, até que completasse uma concentração de íons K⁺ equivalente a 3 mol L⁻¹. A solução foi submetida a agitação (40 g) por um período de 3 horas, e depois centrifugou-se a solução para remoção dos sólidos suspensos (impurezas) por um período de 18 minutos a 10.000 g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi reprecipitado com adição de 20 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹. A solução foi deixada em repouso por 12 a 16 horas.

Passadas as 16 horas, centrifugou-se a solução e descartou o sobrenadante. O precipitado foi tratado com adição de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ + HF 0,3 mol L⁻¹. Em seguida, a solução foi submetida a agitação por 12 a 16 horas em agitador orbitalar. Esse procedimento é realizado para eliminar impurezas como metais e a sílica. Feito isso, centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi dissolvido em água deionizada e transferido para as membranas de diálise, preparadas segundo a metodologia de Mc Phie (1971). O processo de diálise é realizado para eliminar cloretos dos AH. O procedimento é feito no período mínimo de 5 dias, ou até que o teste utilizando nitrato de prata para Cl⁻¹ fosse negativo, havendo troca de água (Mili-Q) pelo menos duas vezes ao dia, até o final da diálise.

Após o procedimento de diálise, os AH foram congelados e posteriormente liofilizados, obtendo no final AH pronto para ser analisado. A figura 11 resume o processo de extração e purificação dos AH.

Figura 10 - (a) decantação do resíduo sólido e sobrenadante (extrato fúlvico 1); (b) Separação da humina do sobrenadante; (c) Separação do extrato fúlvico 2; (d) Purificação dos AH com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ + HF 0,3 mol L⁻¹; (e) Diálise dos AH.

Figura 11 - Fluxograma da extração dos AH.

Fonte: Santos, 2008.

4.5 Caracterização das amostras de ácidos húmicos

4.5.1 Análise elementar

Para determinação do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio das amostras de AH, foram feitas análises em duplicata, pesando cerca de 2 mg de AH diretamente em cápsula de estanho. As cápsulas eram colocadas no porta-amostras do equipamento e a análise era feita por combustão a 1000°C (Figura 12). Os resultados foram fornecidos em porcentagem da massa de AH de cada elemento analisado.

O equipamento utilizado para as análises foi um CHNS/O da marca Perkin Elmer modelo 2400, pertencendo à Embrapa Instrumentação.

Figura 12 - (a) Pesagem das amostras de AH em cápsula de estanho; (b) Adição das cápsulas contendo AH no porta-amostra; (c) Equipamento utilizado nas medidas (CHNS/O).

4.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

As medidas de infravermelho foram realizadas em pastilhas contendo as amostras de ácido húmicos juntamente com o sal brometo de potássio (KBr).

Foram feitas pastilhas utilizando 400 mg de KBr, juntamente com 1 mg de ácido húmico. Os dois sólidos foram homogeneizados e posteriormente foram prensados sob uma pressão de aproximadamente 5.000 kg cm⁻², durante 2 minutos. A figura 13 mostra o preparo das pastilhas.

Figura 13 - Preparação das pastilhas para análises de Infravermelho.

As análises seguiram no espectrômetro da Perkin-Elmer modelo Spectrum 1000, foram realizadas 32 varreduras em um intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} . Todos os espectros foram submetidos a uma correção automática da linha de base. A figura 14 mostra o porta-amostra e o equipamento utilizado nas análises.

Figura 14 - Espectrômetro Perkin-Elmer e seu porta-amostra.

4.5.3 Espectroscopia de fluorescência bidimensional

A fluorescência bidimensional foi utilizada para avaliar o grau de humificação das amostras de AH, seguindo as metodologias propostas por Kalbitz et al. (1999), Zsolnay et al. (1999) e Milori et al. (2002).

Foram preparadas soluções de 200 mg L^{-1} de AH, pesando $0,002\text{ g}$ de AH e dissolvendo em uma solução de NaHCO_3 ($0,05\text{ mol L}^{-1}$). A partir das soluções de 200 mg L^{-1} de AH, as amostras foram diluídas para a concentração de 3 mg L^{-1} . Um estudo de concentração previamente realizado, indicou a concentração de 3 mg L^{-1} como sendo a concentração que menos apresenta efeitos de filtro interno, como o efeito de reabsorção, por exemplo.

Posteriormente, as medidas de fluorescência foram obtidas utilizando o espectrômetro de luminescência Perkin Elmer modelo LS-50B. Os pH de todas as amostras foram ajustados para pH igual a 8.

Para a metodologia de Kalbitz et al. (1999) os espectros de fluorescência foram obtidos pelo modo sincronizado, entre o intervalo de 300 a 520 nm simultaneamente com excitação e emissão, tomando como diferença constante de comprimento de onda de 55 nm ($\Delta\lambda$). O filtro foi mantido aberto, a abertura de fenda foi de 10 nm e a velocidade de varredura foi de 500 nm min⁻¹. O índice de humificação foi determinado a partir da razão entre as intensidades de fluorescência em 400 e 360 nm ou 470 e 360 nm.

Para o estudo de Zsolnay et al. (1999) os espectros de fluorescência foram obtidos no modo emissão, em um intervalo de varredura entre 300 a 700 nm, com excitação em 240 nm. O filtro foi em 290 nm, abertura de fenda foi de 10 nm e a velocidade de varredura foi de 500 nm min⁻¹. O espectro foi dividido em quatro regiões, e o índice de humificação, neste caso foi determinado pela razão entre a última região de emissão, (570-641 nm) e a primeira região do espectro (356-432 nm), sendo A_4/A_1 .

Por último, o método proposto por Milori et al. (2002), foram obtidos espectros de fluorescência no modo de emissão, no intervalo de varredura de 480 a 700nm, com excitação em 465 nm. O filtro foi mantido aberto, abertura de fenda de 10 nm e velocidade de 500 nm min⁻¹. A determinação do índice de humificação foi baseada no cálculo da área total do espectro de fluorescência resultante do comprimento de onda de excitação de 465 nm, ou seja, A_{465} .

4.5.4 Espectroscopia de fluorescência em matriz excitação-emissão (MEE)

Para as análises de fluorescência tridimensional, foi utilizado a mesma concentração das amostras de AH, que nas análises de fluorescência bidimensional (3 mg L⁻¹). As medidas foram feitas no mesmo espectrômetro (espectrômetro de luminescência Perkin Elmer modelo LS-50B). O valor do pH das amostras também foi ajustado para pH igual a 8.

Os espectros de fluorescência, no modo excitação-emissão, foram então adquiridos no intervalo de varredura de 240 a 700 nm para emissão e 220 a 510 nm para excitação, com

incrementos de 10/10 nm, totalizando 30 varreduras. A velocidade de aquisição dos dados foi de 500 nm min⁻¹ e o filtro foi mantido em 290 nm.

Os espectros obtidos pelo modo de MEE foram posteriormente tratados, com o auxílio da ferramenta estatística análise de fatores paralelos (CP/PARAFAC). Essa ferramenta realiza a decomposição espectral de dados multidimensionais trilineares, resultando nos principais componentes de fluorescência (GUO et al., 2015). A utilização do PARAFAC em estudos de fluorescência tridimensional tem sido considerada muito eficaz para a caracterização da fluorescência, e principalmente para determinar os principais componentes de fluorescência existentes na amostra analisada (STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003; STEDMON; BRO, 2008; MURPHY et al., 2006; MOUNIER et al., 2011).

O tratamento PARAFAC foi realizado utilizando o matlab (R2012a), com o software progmeef desenvolvido pelo Dr. R. Redon do laboratório PROTEE (Université de Toulon). O número de componentes foi escolhido utilizando a Análise da Consistência do Tensor Núcleo (do inglês, Core Consistency Diagnostic – Corcondia), onde o número de componentes que melhor se ajusta ao modelo aplicado deverá resultar em um valor de Corcondia maior que 60% (BRO, 1997).

4.5.5 Supressão de Fluorescência

4.5.5.1 Teste de diluição

Antes de realizar as análises de supressão de fluorescência, também foi feito um teste de diluição com diferentes concentrações de AH, a fim de encontrar a melhor concentração de trabalho e assim, evitar efeitos de filtro interno. Os métodos utilizados nos testes foram de modo emissão e sincronizado segundo Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999), respectivamente. A partir de uma solução estoque de 100 mg L⁻¹ de AH foram preparadas todas as soluções diluídas, nas seguintes concentrações: 50 mg L⁻¹; 25 mg L⁻¹; 12,5 mg L⁻¹; 6,25 mg L⁻¹ e 3,13 mg L⁻¹. As soluções foram encaminhadas para as medidas de fluorescência no Fluorímetro Hitachi F4500.

4.5.5.2 Experimento de supressão de fluorescência

A partir da concentração previamente selecionada, as amostras de AH foram encaminhadas para as análises de supressão. O método utilizado foi o modo de obtenção tridimensional dos espectros de fluorescência, proposto por Mounier et al. (2011). Nesse método os espectros foram obtidos no modo excitação-emissão – MEE e foram adquiridos no intervalo de varredura entre 250 a 600 nm para emissão e 200 a 500 nm para excitação. Utilizou-se incrementos de excitação e emissão de 5 nm e trabalhou com uma velocidade de 2.400 nm/min. A tabela 2 apresenta como seguiram os preparos das amostras de AH.

Tabela 1 - Procedimento de preparo das amostras utilizadas no experimento. A concentração utilizada de AH foi de 10 mg L^{-1} , o tampão utilizado foi o acetato de sódio, concentração 1 corresponde à concentração na ordem de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e concentração 2 na ordem de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu (II).

EXPERIMENTO	Volume AMOSTRA de AH (μL)	Volume TAMPÃO (μL)	Volume concentração 1 (μL)	Volume concentração 2 (μL)	Volume H ₂ O (μL)	Concentração final mol/L	Volume final (μL)
E1- Branco	300	1000	0	0	1700	0	3000
E2- Amostra	300	1000	25	0	1675	4,167E-07	3000
E3- Amostra	300	1000	50	0	1650	8,33E-07	3000
E4- Amostra	300	1000	100	0	1600	1,67E-06	3000
E5- Amostra	300	1000	250	0	1450	4,17E-06	3000
E6- Amostra	300	1000	500	0	1200	8,33E-06	3000
E7- Amostra	300	1000	1000	0	700	1,67E-05	3000
E8- Amostra	300	1000	0	100	1600	1,67E-04	3000
E9- Amostra	300	1000	0	200	1500	3,33E-04	3000
E10- Amostra	300	1000	0	600	1100	1,00E-03	3000
E11- Amostra	300	1000	0	1000	700	1,67E-03	3000

Para cada amostra analisada foram preparadas 11 soluções, aumentando a concentração do íon de estudo. O íon metálico utilizado para o estudo foi o cobre II, e para o preparo das soluções de cobre utilizou-se o sal sulfato de cobre pentahidratado. As análises também foram realizadas no Fluorímetro Hitachi F4500, como ilustrado na figura 15. Essa parte do estudo foi realizada no laboratório PROTEE, localizado na universidade de Toulon, em Toulon-Fr.

Figura 15 - As 11 soluções usadas para cada amostra analisada e o fluorímetro utilizado.

Para calcular os valores da constante de estabilidade condicional (K), o modelo de complexação foi baseado no modelo proposto por Ryan e Weber (1982). Os autores sugerem uma equação para o modelo em termos de K.

$$I = \frac{(I_{ml} - 100)}{2K[L]} \left[(K[L] + (K[M] + 1) - \sqrt{(K[L] + K[M] + 1)^2 - 4K^2[L][M]}) + 100 \right] \quad (4.1)$$

Na equação (4.1) I equivale a intensidade de fluorescência, I_{ml} é o valor limite sobre o qual a fluorescência não sofre decaimento, K é a constante de estabilidade condicional, [L] é a concentração de ligante livre e [M] é a concentração de íon metálico livre.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise elementar dos ácidos húmicos

Foi avaliado o teor de carbono no solo inteiro nas mesmas áreas desse estudo, por outro trabalho realizado pelo grupo de pesquisa. Os valores são mostrados na tabela 3.

Tabela 2 - Teores de carbono, em porcentagem, determinados pela análise elementar (média $\pm$ desvio padrão considerando as replicatas em campo), nos quatro sistemas de pastagem e mata nativa. As características dos sistemas de pastagem avaliados são: A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 – intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Teor de carbono no solo inteiro (%)					
Profundidade (cm)	A1	A2	A3	A4	A5
0-5	1,7 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,5
5-10	1,4 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,4	1,18 $\pm$ 0,04	1,8 $\pm$ 0,3
10-20	1,1 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,2	1,05 $\pm$ 0,08	1,3 $\pm$ 0,1
20-30	1,2 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1
30-40	0,9 $\pm$ 0,2	1,18 $\pm$ 0,17	1,2 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,92 $\pm$ 0,03
40-60	0,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	0,74 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 0,1
60-80	0,8 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1
80-100	0,7 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2

Fonte: Segnini, 2014.

O teor de carbono foi maior nas camadas superficiais e menor nas camadas mais profundas. Esse comportamento é esperado para um Latossolo, sendo que na superfície ocorre a entrada de material fresco, oriundo da vegetação e dos dejetos dos animais. Os maiores valores de carbono foram para a área A2 e A3, essa última que apresenta um processo de recuperação de pastagens teve valores superiores aos encontrados para a mata nativa (A5). Algumas pesquisas mostraram que a vegetação de *Brachiaria* possui grande potencial de estocar CO₂ da atmosfera no solo. Após um período de 10 anos da instalação da vegetação do tipo *Brachiaria*, no lugar da vegetação nativa, o estoque de MOS foi repostado acumulando consequentemente grandes quantidades de carbono (REZENDE et al., 1999; SEGNINI, 2007). Segundo Kluthcouski e colaboradores (2006), os teores encontrados de matéria orgânica em solos, que possuem vegetação do tipo *Brachiaria* em suas pastagens, foram maiores do que a

quantidade de MO em solos virgens presentes no Cerrado, comprovando assim o potencial que esse tipo de vegetação possui em incorporar MO nos solos.

Em contrapartida, foi encontrado um baixo teor de carbono para a área A4, evidenciando que pastagens degradadas perdem quantidades de carbono significativas. Essas situações são frequentemente afetadas pelas diminuições das gramíneas de cobertura, já que há uma menor entrada de carbono orgânico pelas raízes. O pisoteio animal associado com a degradação da área faz com que haja também, perdas significativas de carbono (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998; CERRI et al., 2004; SEGNINI et al., 2014).

Estudos mostram que pastagens bem manejadas são capazes de estocar carbono presente na atmosfera no solo (CERRI et al., 2004; SEGNINI et al., 2014). Porém, o que falta é entender a dinâmica desse carbono que foi acumulado no solo. Para tal objetivo, foi verificado o teor de carbono em uma fração húmica da MOS, a fim de avaliar a estrutura química deste carbono presente no solo.

As medidas obtidas do teor de carbono nas amostras de ácidos húmicos foram realizadas em duas replicatas, sendo feito posteriormente a média dos teores de carbono obtidos nas replicatas. Os valores de carbono em porcentagem estão apresentados na tabela 4.

Tabela 3 - Valores médios de carbono nos ácidos húmicos extraídos dos quatro sistemas de pastejo e da mata nativa. As características dos sistemas de pastagem avaliados são: A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Teor de carbono na fração ácido húmico (%)					
Profundidade (cm)	A1	A2	A3	A4	A5
0-5	29,3 ±0,2	25,9 ±0,5	26,5 ±0,1	35,5 ±0,1	26,36 ±0,02
5-10	25,1 ±0,1	24,6 ±0,2	25 ±1	38,5 ±1,1	26,1 ± 1
10-20	29,5 ±0,5	29,3 ± 1	30,1 ±0,1	39,6 ±0,4	30 ± 0,3
20-30	32 ±1	34 ±2	34,5 ±0,4	43± 1	28 ± 1
30-40	35,8 ±0,6	34,5 ±0,3	39,5 ±0,1	41,2 ±0,1	41,5 ±0,04
40-60	41 ±1	38,5 ±0,2	41,1 ±0,3	40,5 ±0,2	41,4 ±0,04
60-80	39,8 ±0,2	35,7 ±0,4	38 ±1	38,3 ±0,8	42,2 ±0,6
80-100	40,4 ±0,1	36 ±2	39,6 ±0,4	37,5 ±0,1	46,7 ±0,2

Para fim de comparação das áreas, em relação ao teor inicial de carbono, e a taxa de variação em função da profundidade do solo, foi realizada uma análise de variância e um teste

de comparações múltiplas de Duncan. Para estimar estes parâmetros, foi realizado um ajuste logarítmico em cada amostra. O nível de significância adotado para todas as análises foi 5% e o software utilizado nas análises foi o R versão 3.3.0. Os resultados obtidos pelas análises estatísticas estão ilustrados na figura 17 e na tabela 5.

Figura 16 - Ajuste logarítmico dos valores de carbono nos AH extraídos das cinco áreas avaliadas. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 – intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Tabela 4 - Resultados do teste de comparações múltiplas de Duncan. Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes.

Área	Taxa de			
	Carbono Superficial		variação/Profundidade	
	Média	DP	Média	DP
A1	20,8 b	0,1	4,2 bc	0,2
A2	20 b	0,5	4 c	0,2
A3	20 b	1,3	4,7 b	0,4
A4	36,4 a	0,6	0,8 d	0,002
A5	16,2 c	0,3	6,1 a	0,01

A partir desses resultados, verificou-se que em comparação com o valor de carbono na camada superficial, houve um aumento significativo do teor de carbono, com o aumento da profundidade, para todas as áreas, menos para a área A4, a qual apresentou uma taxa de variação em função da profundidade na ordem de 0,88.

A área A4, que se encontra em um estágio de degradação, apresentou altos valores dos teores de carbono nos ácidos húmicos em todo o perfil do solo, podendo dizer que o AH extraído dessa área possui uma estrutura rica em carbono, mesmo nas camadas superficiais. Já para as demais áreas e mata nativa (A5) o teor de carbono nos AH foi menor nas camadas superficiais, indicando que houve uma introdução de uma MO fresca nessas camadas.

Comparando os teores de carbono no solo inteiro, com os teores de carbono nos AH, verificou-se que a área intensiva de sequeiro (A2), área em recuperação (A3) e na mata nativa (A5) introduziram carbono no solo inteiro, porém, os AH dessas mesmas áreas apresentaram baixo teor de C nas camadas superficiais, mostrando assim que o carbono incorporado nessas áreas está na forma de material não húmico. Essa característica é preocupante, visto que é mais fácil perder carbono presente em material não húmico para a atmosfera, do que o carbono presente nos ácidos húmicos, dependendo do tipo de atividades realizadas nessas áreas.

Já a área degradada (A4) e a intensiva irrigada (A1) apresentaram valores menores de carbono no solo inteiro, indicando que houve pouca incorporação de MO fresca nesse solo. Os AH dessas duas áreas apresentaram altos valores de carbono nas camadas superficiais, reforçando a hipótese de que não houve grande incorporação de uma matéria orgânica mais fresca nas camadas superficiais, e que o carbono presente nessas camadas já está incorporado aos ácidos húmicos.

Pastagens que estão em processo de degradação, ou solos que estão submetidos a um plantio convencional (revolvimento do solo) possuem uma taxa de decomposição da MOS maior do que a entrada da matéria orgânica, emitindo assim uma maior quantidade de carbono para a atmosfera (BAYER et al., 2006; ALVES et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; COSTA JUNIOR et al., 2013).

5.2 Métodos espectroscópicos

5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Com as análises de espectroscopia, na região do infravermelho, foi possível evidenciar também algumas diferenças nos espectros dos AH analisados. Os espectros das amostras de AH das cinco áreas avaliadas são mostrados nas figuras de 18 a 22.

Figura 17 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal.

Figura 18 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal.

Figura 19 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A3 – em recuperação e média lotação animal.

Figura 2019 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A4 – degradada e média lotação animal.

Figura 21 - Espectros de FTIR obtidos de AH extraídos da A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Os espectros foram analisados de acordo com as atribuições propostas por Silverstein et al. (1991), Stevenson, (1994), Benites et al. (1999), González-Pérez et al. (2004) e Bernier et al. (2013).

Para facilitar a interpretação dos espectros, foram extraídos os principais picos obtidos dos espectros das amostras de AH. No total, foram extraídos 5 picos principais. O número de onda (cm^{-1}) e a descrição de cada pico está descrita na tabela 6.

Tabela 5 - Descritivo dos principais picos extraídos dos espectros de AH.

Picos	Número de onda	Descrição
1	2940 - 2.920	Deformação axial assimétrica de C-H em metil e metileno
2	1.620 – 1570	Deformação axial C=C em anel aromático
3	1.385	Deformação axial de O-H em fenóis
4	1.234	Deformação axial de C=O em grupos carboxílicos
5	1.060	Deformação axial de C-O em polissacarídeos

Os gráficos mostrados nas figuras de 23 a 27 relacionam a intensidade da banda de cada pico avaliado, para todas as amostras analisadas.

Figura 202 - Intensidades dos picos de FTIR para AH A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal.

Figura 213 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal.

Figura 224 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A3 – em recuperação e média lotação animal.

Figura 235 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A4 – degradada e média lotação animal.

Figura 26 - Intensidades dos picos de FTIR para AH da A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Todas as bandas selecionadas dos espectros obtidos neste estudo, são bandas comumente encontradas em ácidos húmicos extraídos de solos (STEVENSON, 1994; BENITES et al., 1999; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004; MARTINS, 2009; GUO et al., 2012). A banda que se encontra na região de 2.920 a 2.900 cm^{-1} é atribuída a deformação axial assimétrica de C-H em compostos alifáticos, como metil e metileno. Para todas as áreas houve um decréscimo na intensidade das bandas, conforme o aumento da profundidade. Esse comportamento sugere que os AH avaliados possuem uma estrutura mais alifática nas camadas superficiais, reduzindo o caráter alifático dos AH em camadas profundas do solo.

A região de 1.620 a 1.570 cm^{-1} refere-se à deformação axial de C=C em anel aromático (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004). Novamente, todas as áreas apresentaram comportamento semelhante, onde houve um aumento das intensidades das bandas, com o aumento da profundidade. Destaca-se que, a área degradada (A4) apresentou uma intensidade um pouco superior para essa banda, nas profundidades de 0 a 5 cm e 5 a 10 cm. Esse resultado correlaciona muito bem com o teor de carbono nos ácidos húmicos, que foram bem superiores nas camadas superficiais, quando comparado com os outros manejos.

A terceira região selecionada, 1.385 cm^{-1} , refere-se a estiramentos de O-H em grupos fenóis. A intensidade dessa banda também aumentou, com o aumento da profundidade. A

região de 1.280 a 1.200 cm^{-1} é atribuída a estiramento de C=O de ácidos carboxílicos, segundo alguns autores, essas carbonilas são responsáveis pela complexação de metais presentes no ambiente (PICCOLO; STEVENSON, 1982; HERNÁNDEZ et al., 2006; GUO et al., 2012; GUO et al., 2015). Avaliando a intensidade dessa banda para a área degradada (A4), verificou-se que a intensidade se mantém em todas as profundidades, já para a mata nativa (A5), as intensidades da banda aumentam, conforme aumenta a profundidade.

A última banda selecionada encontra-se na região de 1.080 a 1.050 cm^{-1} , e está referindo-se à deformação axial de C-O em polissacarídeos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; BENITES et al., 1999). Essa banda sofre mais variações em sua intensidade, quando é feito a comparação com as quatro áreas estudadas e a área de referência (mata nativa - A5). Esses compostos podem ser mais sensíveis as mudanças de manejo do que os demais.

De maneira geral, todas as amostras de AH estudadas apresentaram grupos contendo a ligação C=C (oriunda de anéis aromáticos), nas camadas mais profundas dos perfis de solo, podendo concluir que a condensação dos AH aumenta com o aumento da profundidade. Em contrapartida, nas camadas superficiais ocorreu uma maior presença de grupos C-H oriundo de compostos alifáticos. Esse comportamento já é esperado para AH oriundos de solo, mas as ligações de C=O, C-O e O-H não possuem um comportamento padrão, podendo, portanto, variar de acordo com o manejo aplicado ao solo (FREIXO et al., 2002).

5.2.2 Fluorescência bidimensional

Utilizando a espectroscopia de fluorescência, foram obtidos espectros de fluorescência bidimensional, para avaliar o grau de humificação das amostras de AH, baseando-se nas três metodologias sugeridas na literatura, Kalbitz et al. (1999), Zsolany et al. (1999) e Milori et al. (2002). As figuras 28, 29 e 30 apresentam os espectros de fluorescência obtidos segundo essas três metodologias.

Figura 27. Espectros de fluorescência obtidos segundo Milori et al. (2002) para todas as amostras de AH obtidas nas 8 profundidades e nas 5 diferentes áreas. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 – intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Figura 28 - Espectros de fluorescência obtidos segundo Zsolnay et al. (1999) para todas as amostras de AH obtidas nas 8 profundidades e nas 5 diferentes áreas. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Figura 29 - Espectros de fluorescência obtidos segundo Kalbitz et al. (1999) para todas as amostras de AH obtidas nas 8 profundidades e nas 5 diferentes áreas. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Observou-se que para todas as áreas avaliadas, ocorreu um aumento na intensidade de fluorescência, conforme o aumento da profundidade no perfil do solo.

As áreas A2 e A3 apresentaram os espectros de fluorescência mais parecidos, com os espectros obtidos para a área de referência (A5). As três áreas apresentaram uma intensidade de fluorescência mais baixa, nas três primeiras camadas do solo, e uma fluorescência bem maior na última camada do perfil do solo. Já nas áreas A1 e A4 houve uma menor variação na intensidade de fluorescência, a intensidade variou na faixa de 40 até 160 u.a para Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (1999), e na faixa de 150 a 400 u.a para a metodologia de Zsolnay et al. (1999).

As figuras 31, 32 e 33 ilustram os índices de humificação, calculados segundo Milori et al. (2002), Zsolnay et al. (1999) e Kalbitz et al. (1999), para todas as amostras de AH, a partir dos espectros obtidos de fluorescência.

Figura 30 - Valores dos índices de humificação obtidos segundo a metodologia de Milori et al. (2002).

Figura 31 - Valores dos índices de humificação obtidos segundo a metodologia de Zsolnay et al. (1999).

Figura 32 - Valores dos índices de humificação obtidos segundo a metodologia de Kalbitz et al. (1999).

Como já esperado, a partir das análises dos espectros de fluorescência, os índices de humificação aumentaram, com o aumento da profundidade, para todas as áreas avaliadas e para as três metodologias empregadas. A área em processo de recuperação (A3) e a área de referência (A5) apresentaram os menores índices de humificação nas primeiras camadas do solo (0 até 30 cm). Já nas últimas camadas do perfil, essas duas áreas apresentaram valores maiores dos índices de humificação.

Comparando os resultados dos índices de humificação, da área em processo de recuperação (A3) e da área de referência (A5), com os resultados obtidos para o teor de carbono no solo inteiro, das mesmas áreas, pode-se verificar que nas camadas mais superficiais houve um alto acúmulo de carbono, porém a humificação foi baixa. Quando foi avaliado o teor de carbono na fração húmica (ácidos húmicos) dessas áreas, o teor de carbono foi baixo, corroborando então com os resultados dos índices de humificação. Assim, percebe-se que há uma incorporação de carbono no processo de recuperação de pastagens e na área de referência, mas o carbono acumulado no solo está na forma de matéria orgânica mais lábil, ou ainda em outras estruturas mais simples, e não nas frações húmicas.

A área de intenso sequeiro (A2) apresentou comportamento similar com as áreas A3 e A5, mas nas camadas mais superficiais, essa área apresentou um valor de humificação um pouco mais elevado. Os resultados de carbono, tanto no solo inteiro, quanto no ácido húmico foram semelhantes aos resultados obtidos para as áreas A3 e A5.

A área degradada (A4), nas camadas de 0 até 30 cm, obteve os maiores valores dos índices de humificação, comparado com as demais áreas. Avaliando o teor de carbono no solo inteiro dessa área, observou-se que houve pouco acúmulo de carbono, quando comparado com os outros manejos. Em contrapartida, o teor de carbono nos ácidos húmicos extraídos da A4 foram os maiores, se mantendo constante em todo o perfil do solo. A área de intensa irrigação (A1) apresentou resultados de carbono, no solo inteiro, parecidos com os da área A4. Esse comportamento apresentado para as áreas A4 e A1 comprova que quando a pastagem entra em processo de degradação, ou sofre um estresse hídrico, a taxa de decomposição da MOS se torna maior do que a entrada de MO fresca, sendo assim negativo o estoque de carbono nesse solo. A baixa incorporação de MOS nessas áreas, diminui o potencial de mitigação dos gases de efeito estufa nessas pastagens, e também deixa o solo mais empobrecido, diminuindo assim a sua produtividade (BAYER et al., 2006; CARVALHO et al., 2010; COSTA JUNIOR et al., 2013; CORTA JUNIOR et al., 2015).

Nas camadas mais profundas (30 até 100 cm) houve um aumento no índice de humificação para todas as diferentes áreas. O teor de carbono no solo inteiro, foi menor em todos os manejos e mata nativa, indicando que em profundidades maiores, ocorre pouco acúmulo de carbono (SEGNINI et al., 2014). Já o teor de carbono nos ácidos húmicos foi maior, nas camadas mais profundas, apresentando o mesmo comportamento da humificação. Dessa forma, o pouco carbono acumulado nessas camadas mais profundas está mais seguro, do que

o carbono presente nas camadas mais superficiais. O carbono acumulado na superfície precisa de uma atenção especial, uma vez que um revolvimento do solo, ou qualquer outro tipo de manipulação que o solo venha a sofrer, pode acarretar em uma liberação desse carbono de volta para a atmosfera.

A partir dos valores dos índices de humificação, obtidos a partir das três metodologias propostas, foram feitas as correlações entre os três índices de humificação (Figura 34, 35 e 36).

Figura 33 - Gráfico de correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias de Milori et al. (2002) (A_{465nm}) e Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1).

Figura 34 - Gráfico de correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias Milori et al. (2002) (A_{465nm}) e Kalbitz et al. (1999) (I_{451}/I_{374}).

Figura 35 - Gráfico de correlação entre os resultados obtidos pelas metodologias Kalbitz et al. (1999) (I_{451}/I_{374}) e Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1).

Os três gráficos apresentaram um grau de correlação satisfatório, com valores de r^2 de 0,75 até 0,93.

De maneira geral, os três métodos se mostraram eficientes quanto aos índices de humificação das amostras de AH avaliadas. Todos os métodos mostraram que, em maiores

profundidades, os AH apresentaram valores maiores dos índices de humificação, possuindo assim estruturas mais condensadas. Também foi certificado que a técnica de fluorescência é muito sensível e útil na avaliação das estruturas das SH, essas que apresentam estruturas fluorescentes intrínsecas à sua molécula (SENESI et al., 1991; MILORI et al., 2002).

5.2.3 Fluorescência matriz excitação emissão

As mesmas amostras de AH foram submetidas à análise da fluorescência obtidas pelo modo tridimensional. As figuras de 37 até 41 mostram os espectros resultantes das análises de fluorescência. Os valores de intensidade de fluorescência seguem a escala de cores, localizadas ao lado das figuras, e aparecem na forma de curva de níveis.

Figura 36 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal.

Figura 37 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal.

Figura 38 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A3 – em recuperação e média lotação animal.

Figura 39 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A4 – degradada e média lotação animal.

Figura 40 - Espectros de fluorescência obtidos no modo matriz excitação-emissão para as amostras de AH, em todas as profundidades, sendo a) 0 – 5 cm, b) 5 – 10 cm, c) 10 -20 cm, d) 20 – 30 cm, e) 30 – 40 cm, f) 40 – 60 cm, g) 60 – 80 cm, h) 80 – 100 cm, extraídos da área A5 – mata nativa sendo a área de referência.

De maneira geral, observou-se que a excitação de 250 nm levou a um máximo de emissão em 460 nm, para todos os espectros de fluorescência das cinco áreas avaliadas. A partir das camadas intermediárias, a excitação em 450 nm também contribuiu para a emissão em 460nm. Verificou-se também que houve um deslocamento no comprimento de onda de emissão, conforme aumentou-se a profundidade, comportamento observado para todas as áreas do estudo.

Para as cinco áreas avaliadas, todas apresentaram uma maior intensidade de fluorescência nas camadas mais profundas do solo. A área de referência (A5) apresentou intensidades de fluorescência bem crescentes, de acordo com o aumento da profundidade, e pode-se observar que na superfície, a fluorescência é menor quando comparada com a A4, corroborando com o que foi obtido nos espectros no modo bidimensional. As demais áreas, A1, A2 e A3 apresentaram resultados similares, principalmente a área A2 e a A3.

A utilização da fluorescência em matriz excitação-emissão (MEE), combinada juntamente com o tratamento estatístico CP/PARAFAC, tem se mostrado uma importante ferramenta na caracterização da MOS, uma vez que essa ferramenta matemática permite extrair melhores informações dos espectros de fluorescência (SANTÍN et al., 2009). Vários estudos sobre a MOS utilizaram a combinação da MEE com o CP/PARAFAC (STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003; LUCIANI et al., 2008; YAMASHITA et al., 2008; SANTÍN et al., 2009; PAGANO et al., 2012; HE et al., 2013; WEI et al., 2015; MANN et al., 2016).

Após a análise de fluorescência MEE foi aplicado o método estatístico CP/PARAFAC, para o tratamento dos dados. O valor da corcondia obtido foi de 98,9%, ou seja, os dados se ajustaram muito bem ao modelo utilizado no tratamento, e o número de componentes escolhido foi dois. O valor da corcondia válido é superior a 60% (BRO, 1997). A figura 42 mostra as duas componentes encontradas após o tratamento, utilizando o CP/PARAFAC.

Figura 41 - Componentes de fluorescência encontrados nas amostras de AH, após à aplicação da ferramenta CP/PARAFAC.

A componente 1 apresentou um pico primário, com os pares de comprimentos de ondas de ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$), e outro pico secundário com ($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$). Senesi e colaboradores (2003) sugeriram que comprimentos de ondas maiores estão associados a presença de SH compostas por compostos orgânicos aromáticos de alta massa molecular. Alguns autores encontraram esse pico em seus trabalhos, e esse pico é originado como derivado de fontes terrestres, e classificado como tipo húmico (MATTHEWS et al., 1996; MCKNIGHT et al., 2001; STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003; CORY e MCKNIGHT, 2005; SANTÍN et al, 2009; YAMASHITA, BOYER, JAFFÉ, 2013; GUO et al., 2015). Cory e Mcknight (2005) ainda destacaram em seu trabalho que a componente encontrada ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 275, 405/ 500 \text{ nm}$) classificava o fluoróforo como procedente de quinonas reduzidas de origem terrestre.

A componente 2 apresentou o pico em comprimentos de ondas de ($\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$). Essa componente também já foi citada em outros trabalhos e classificada como tipo húmica (COBLE, 1996; GUO et al., 2015). A componente 2 apresenta comprimentos de ondas de emissão menores do que os da componente 1, sugerindo assim que os fluoróforos pertencentes à componente 2 possuem compostos aromáticos com menor grau de conjugação, enquanto que a componente 1 apresenta compostos com maior grau de conjugação, indo de acordo com o sugerido por (SENESI; D’ORAZIO; RICCA, 2003).

Em suma, as duas componentes encontradas neste estudo são comumente destacadas em ácidos húmicos oriundos de solos, sedimentos e também de ambientes

aquáticos (STEDMON; MARKEGER; BRO, 2003; LUCIANI et al., 2008; YAMASHITA; BOYER; JAFFÉ, 2013).

Com o auxílio da ferramenta CP/PARAFAC pode-se também obter os valores das contribuições numéricas das intensidades de fluorescência de cada componente encontrada (componente 1 e 2), para cada amostra de AH. Esse resultado está mostrado na figura 43.

Figura 42 - Contribuição numérica das intensidades de fluorescência de cada componente (1 e 2), para todas as amostras de AH.

A contribuição da componente 1 é maior do que a da componente 2 nas camadas de 40 até 100 cm, para todas as áreas avaliadas, ou seja, com o aumento da profundidade aumenta a presença dos fluoróforos mais aromáticos e com maior grau de conjugação na MOS, representados pela componente 1. Já nas camadas superficiais, de 0 até 30 cm, a contribuição da componente 2 é maior do que a da componente 1, exceto para a área degradada (A4), a qual apresentou uma maior contribuição da componente 1 desde a profundidade de 10 cm. É esperado que nas camadas superficiais do solo exista uma MOS com mais fresca, não estabilizada e com menos compostos conjugados, e consequentemente a MOS terá menos fluoróforos, podendo justificar então a baixa presença das duas componentes de fluorescência nessas camadas.

Analisando as 5 áreas separadamente, pode-se observar que a área A1 apresentou uma distribuição das componentes bem parecida com a da área A4. Já a área A2 possui

comportamento similar com a área A3, e ambas apresentam maiores valores de intensidades da componente 2, nas camadas superficiais, do que as outras três áreas.

A área de referência (A5) mostrou um crescimento contínuo das intensidades de fluorescência para as duas componentes (1 e 2), apresentando nas camadas superficiais, pouca presença das duas componentes.

Essas variações nas intensidades das duas componentes podem ser devido aos diferentes manejos aplicados ao solo, evidenciando assim que a MOS é sensível às mudanças de manejo (BAYER et al., 2006).

Para discutir mais profundamente os resultados foi feita a correlação dos valores dos índices de humificação, obtidos segundo a metodologia proposta por Milori et al. (2002), com os valores dos scores obtidos pela componente 1. A escolha desses dois parâmetros deve-se porque ambos indicam os fluoróforos mais condensados e complexos presentes dos AH. A figura 44 mostra o gráfico de correlação.

Figura 43 - Correlação entre a componente 1 obtida pelo tratamento com o PARAFAC, versus o índice de humificação proposto por Milori et al. (2002). O valor do r^2 foi de 0,74.

O gráfico de correlação teve um valor de r^2 de 0,74, mostrando assim que existe uma correlação boa entre a humificação e os valores da componente 1. Os mesmos fluoróforos excitados em 465 nm, podem ser representados então por essa componente 1 obtida pelo PARAFAC.

Com esses resultados a técnica de fluorescência se mostrou muito eficiente, uma vez que foi possível selecionar diferentes fluoróforos existentes na MOS. Isso mostra que apenas

com o uso da fluorescência é possível obter informações de suma importância a respeito das características da MOS, dispensando, em alguns casos, o uso de outras técnicas como a ressonância magnética nuclear (RMN) e pirólise, as quais possuem um custo maior de análise, quando comparado com a fluorescência.

5.2.4 Supressão de Fluorescência

5.2.4.1 Resultados do teste de diluição

Os resultados do teste de diluição estão ilustrados nas figuras 47 e 48. O teste foi realizado para todas as áreas estudadas, mas como o comportamento foi semelhante para todas as amostras, as figuras 5.31 e 5.32 ilustram somente os resultados da amostra referente à mata nativa, na profundidade de 80 a 100 cm. As concentrações utilizadas para as soluções de AH foram de 100, 50, 25, 12, 6 e 3 mg L⁻¹, respectivamente. Vale ressaltar que o teste de diluição foi realizado sem a presença do metal.

Figura 44 - Espectros de fluorescência referentes à amostra de AH da A5 (mata nativa) na profundidade de 80-100 cm. Método utilizado na obtenção dos espectros foi o proposto por Kalbitz, et al. (1999).

Figura 45 - 24 Espectros de fluorescência referentes à amostra de AH da A5 (mata nativa) na profundidade de 80-100 cm. Método utilizado na obtenção dos espectros foi o proposto por Milori, et al. (2002).

Analisando os gráficos dos espectros de fluorescência, foram plotados gráficos utilizando as intensidades máximas de fluorescência, em cada espectro, versus a concentração de ácido húmico. Os gráficos estão mostrados na figura 4.

Figura 4256 - Os picos máximos de intensidade de fluorescência versus a concentração de ácido húmico. (A) método Kalbitz et al. (1999), (B) método Milori et al. (2002).

Observa-se que a intensidade de fluorescência aumenta com o aumento da concentração de AH, mas a partir da concentração de 50 mg L⁻¹ inicia-se um decréscimo na intensidade de fluorescência. Verificou-se ainda que a linearidade permanece apenas até a concentração de 12,5 mg L⁻¹, portanto foi escolhida a concentração de 10 mg L⁻¹ para evitar

possíveis efeitos de filtro interno. Guo et al. (2015) e Yuan et al. (2015) trabalharam com uma concentração de 10 mg L^{-1} da matéria orgânica dissolvida, também com o objetivo de evitar os efeitos de filtro internos.

5.2.4.2 Componentes de fluorescência dos ácidos húmicos + Cu II

O experimento de supressão foi realizado utilizando o íon metálico Cu^{2+} , em diferentes concentrações. A partir das amostras de AH e Cu^{2+} , foram extraídos os espectros de fluorescência tridimensional (matriz excitação-emissão).

A partir da decomposição das MEE utilizando o PARAFAC, duas componentes de fluorescência foram identificadas para as amostras de AH. As componentes estão ilustradas na figura 50. A componente 1 apresenta dois comprimentos de onda de excitação de 300 e 460 nm e um único comprimento de emissão de 520 nm. A componente 2 apresenta um único pico com comprimento de onda de emissão de 460 nm e excitação em 310 nm.

Figura 47 - Componentes 1 e 2 obtidas pela análise de PARAFAC.

A componente 2 apresentou um deslocamento no comprimento de onda de excitação, onde esse deslocamento provavelmente foi causado devido a interação do AH com o metal cobre. O pico apresentado na componente 1, com excitação de 460 nm e emissão em 520 nm, foi intensificado, quando comparado com a componente 1, obtida nas amostras de AH, sem a adição de metal. Esse comportamento também pode ter ocorrido, devido à interação com o metal cobre (MOUNIER et al., 2011). Segundo os autores Murphy et al. (2006) e Mounier et al. (2011) essas componentes estão sempre presentes nas amostras de matéria orgânica natural, na presença de íons cobre.

Essas alterações nas componentes obtidas pela análise de PARAFAC indicaram que a MOS, na presença de íons cobre II, possuem afinidade com os íons cobre, complexando-o (YAMASHITA et al., 2008; MOUNIER et al., 2011; GUO et al., 2015)

5.2.4.3 Valores da constante de estabilidade condicional

A partir das análises com o CP/PARAFAC é possível obter a contribuição numérica de cada componente em cada amostra avaliada. Plotando gráficos, com a contribuição numérica de cada componente (1 e 2) versus a concentração adicionada de metal calcula-se os valores da constante de estabilidade condicional (K). A figura 51 mostra os gráficos obtidos para a área irrigada, e para as duas componentes encontradas pelo CP/PARAFAC.

Figura 48 - Contribuição da intensidade relativa de fluorescência para componente 1 e 2 das amostras de AH, referente a área intensiva irrigada de alta lotação animal (A1), com profundidades de 0 a 5 cm e 80 a 100 cm.

A forma dos gráficos mostra que ocorre um modelo de complexação de 1:1 (GRIMM et al., 1991). Para as componentes 1 e 2 houve um decaimento expressivo da intensidade de fluorescência, sendo estabilizado perto de 5%. Esse decaimento da contribuição de fluorescência é marcado pela formação de um complexo com o íon metálico, que modifica o campo quântico da fluorescência do ligante (AH), ou seja, a interação dos AH com o cobre pode alterar a estrutura da matéria orgânica (MOUNIER et al., 2011). A supressão da fluorescência já aparece logo nas primeiras concentrações do íon cobre, mostrando que as amostras de AH possuem bastante afinidade com este íon.

Baseando-se no modelo de complexação proposto por Ryan e Weber (1982), foi calculado as constantes de estabilidade condicional. Os valores estão apresentados na tabela 7.

Tabela 6 - Valores das constantes de estabilidade condicional (K) para as 5 áreas avaliadas e calculado para as componentes 1 e 2. A1 – intensiva irrigada e alta lotação animal; A2 - intensiva sequeiro e alta lotação animal; A3 – em recuperação e média lotação animal; A4 – degradada e média lotação animal e A5 – mata nativa sendo a área de referência.

Componente 1					
	A1	A2	A3	A4	A5
	Log K	Log K	Log K	Log K	Log K
Profundidade (cm)					
0-5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
5-10	5,4	5,5	5,5	5,4	5,5
10-20	5,5	5,5	5,5	5,2	5,5
20-30	5,5	5,3	5,5	5,5	5,5
30-40	5,5	5,5	5,5	5,3	5,5
40-60	5,2	5,3	5,5	5,4	5,5
60-80	5,4	5,3	5,2	5,1	5,2
80-100	5,3	5	5,4	5,2	5,5
Componente 2					
	A1	A2	A3	A4	A5
	Log K	Log K	Log K	Log K	Log K
Profundidade (cm)					
0-5	5,1	5,5	5,5	4,8	5,4
5-10	4,9	5,5	5,5	4,8	5,5
10-20	4,9	5,1	5,1	4,7	5,2
20-30	4,9	5,2	5,1	4,9	5,2
30-40	4,9	5,5	5,3	5,5	5,2
40-60	5,2	5,1	5,5	5	5,5
60-80	5	5,4	5,4	4,7	5,4
80-100	5	5,1	5,5	5,4	5,5

A utilização do CP/PARAFAC, para obter os parâmetros de complexação, pode fornecer informações mais detalhadas do que somente utilizando o modelo de complexação simples. O pré-tratamento com o CP/PARAFAC permite encontrar no sistema um número bem definido de ligantes de fluorescência, utilizando toda a informação da MEE e, que pode ser manipulado depois usando o modelo de Ryan e Weber (1982).

Os valores de K se mantiveram no intervalo de 4,7 a 5,5, esses valores são encontrados na literatura para o íon cobre. Resultados semelhantes foram obtidos por Mounier et al. (2011) e Guo et al. (2015) a partir da MOD oriunda do Rio Negro localizado no norte do Brasil e da MOD extraída de solos salinos-alcálinos, respectivamente. Algumas amostras apresentaram um valor de K maior do que encontrado na literatura, indicando assim que o íon Cu pode ser fortemente ligado com o AH oriundo do solo (SENESI, 1992).

Analisando os resultados obtidos para a componente 1, houve pouca mudança nos valores de K. Os valores de K foram maiores quando comparado com os valores referentes à componente 2. Como os valores de comprimento de onda de emissão para a componente 1 são maiores do que a componente 2, pode-se dizer que os fluoróforos encontrados na componente 1 são mais complexos e conjugados (SENESI, 1992). Assim, a componente 1 apresenta compostos mais humificados, sugerindo uma afinidade da ligação de cobre mais forte para compostos mais humificados, do que para compostos menos humificados (GUO et al., 2015).

Alguns estudos sugerem que compostos que contêm ligações (C-O; C=O), presentes em ácidos carboxílicos e a hidroxila de grupos fenólicos (O-H), interagem fortemente com íons metálicos (PICCOLO; STEVENSON, 1982; LU; ALLEN, 2002; HERNÁNDEZ et al., 2006; GUO et al., 2012; GUO et al., 2015). Os resultados obtidos pelo FTIR, mostraram a forte presença dessas bandas, nos AH das áreas avaliadas, responsáveis por essas duas ligações.

Para a componente 2, observou valores menores de K nas áreas intensiva irrigada (A1) e degradada (A4). Esses valores menores podem ser justificados pelo fato que a irrigação, erosão e o desmatamento do solo causam perdas da MOS (JIANG et al, 2012, YU et al., 2012, GUO et al., 2012 e GUO et al., 2015). Observou-se que na área A4 a banda do FTIR, responsável pela ligação de C=O, se manteve constante em todas as camadas do solo, enquanto que em outras áreas houve um aumento dessa banda. Esse comportamento pode também justificar o porquê dos menores valores de K, obtidos pela componente 2, na área A4. O processo de degradação das pastagens pode ter perdido alguns sítios ativos presentes nos AH, diminuindo assim a interação desse com os íons cobre.

Os valores diferentes de K, encontrados para as componentes 1 e 2, sugerem que os sítios de ligações e o processo de complexação são diferentes para as duas componentes avaliadas (GUO et al., 2015). E ainda, os fluoróforos oriundos da componente 2 se mostraram mais sensíveis aos diferentes tipos de manejo e as mudanças sofridas pela degradação do solo.

Os valores menores de K, encontrados para as áreas A1 e A4, podem justificar que o diferente tipo de manejo pode alterar a interação da MOS, quando na presença de íons metálicos.

Esses resultados ressaltaram ainda que a MOS das áreas intensiva irrigada (A1) e degradada (A4) são mais pobres, contendo menos sítios ativos e interagindo assim, em uma menor proporção com os íons metálicos presentes no solo.

5.3 Relações entre os parâmetros dos AH

Foram realizadas algumas relações entre os parâmetros obtidos neste estudo. Observou-se que os parâmetros como índice de humificação, bandas do FTIR (ligações C-H em compostos alifáticos e ligações C=C em compostos aromáticos), teor de carbono nos AH e constante de estabilidade condicional (k) conseguem separar as amostras em diferentes grupos, de acordo com os diferentes tipos de área. As figuras 50 até 53 mostram essas relações entre o índice de humificação proposto segundo Milori et al. (2002), juntamente com os demais parâmetros citados acima.

Figura 49 - Gráficos de relação entre o teor de carbono nos AH, com a humificação dos mesmos segundo a metodologia proposta por Milori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.

Figura 5260 - Gráficos de relação entre as bandas de FTIR referentes à grupos alifáticos, com os índices de humificação proposto por Milori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.

Figura 51 - Gráficos de relação entre as bandas de FTIR referentes à grupos aromáticos, com os índices de humificação proposto por Millori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.

Figura 52 - Gráficos de relação entre os valores obtidos para a constante de estabilidade condicional (K) para a componente 2, com os índices de humificação proposto por Milori et al. (2002). A) AH extraídos na profundidade de 0 a 5 cm, B) AH extraídos na profundidade de 5 a 10 cm. Ai – AH da área intensiva irrigada e alta lotação animal; As – AH da área intensiva sequeiro e alta lotação animal; Ar – AH da área em recuperação e média lotação animal; Ad – Ah da área degradada e média lotação animal e Am – mata nativa sendo a área de referência.

Primeiramente, essas análises foram realizadas somente para as duas primeiras camadas do solo, uma vez que com o aumento da profundidade foi observado que o comportamento dos AH tendem a ser parecidos. Assim, verificou-se que na superfície do solo, com a utilização das técnicas analíticas utilizadas neste estudo, pode-se avaliar as possíveis diferenças apresentadas pelos AH, nos diferentes tipos de manejos e mata nativa.

Analisando os dois gráficos da figura 50, observou-se que nas primeiras camadas do solo, os AH extraídos da área degradada (A4) apresentam um alto teor de carbono e uma alta

humificação também. Na figura 51 e 52, os gráficos mostraram que os AH da área A4 apresentam baixa intensidade das bandas referentes à grupos alifáticos, em contrapartida apresentam alta intensidade das bandas referentes à grupos aromáticos. Isso indica que esses AH possuem uma estrutura mais conjugada, contendo mais carbono e mais estruturas aromáticas.

Indo no sentido oposto, os AH extraídos das áreas em recuperação (A3), intensiva sequeiro (A2) e a mata nativa (A5) apresentaram um teor de carbono mais baixo, uma humificação também menor, uma intensidade das bandas referentes à grupos alifáticos maiores e intensidades menores das bandas referentes à grupos aromáticos. Esse comportamento mostra que os AH dessas áreas possuem uma estrutura mais simples, contendo menos carbono, estruturas mais alifáticas e menos humificada.

A Figura 53 mostra os gráficos relacionando os valores de humificação, com os valores da constante de estabilidade condicional (K) obtida para a componente 2. Pode-se verificar que a mata nativa (A5), juntamente com o manejo em recuperação (A3) e de intensiva sequeiro (A2) apresentaram um maior valor de K, quando comparado com os valores de K para a área degradada (A4) e intensiva irrigada (A1). Esses resultados vão bem de acordo com o que já foi observado, sendo que na área A4 existe um AH mais humificado e aromático, tendo esse perdido sítios ligantes de sua estrutura, reagindo então pouco com íons metálicos. A área intensiva irrigada (A1) também apresentou AH com pouca reatividade na presença de metais, salientando assim que o excesso de água leva à perda de grupos reativos da molécula de AH.

A mata nativa (A5), intensiva sequeiro (A2) e em recuperação (A3), tendo apresentado um valor de K maior, indicam que as estruturas mais simples e alifáticas, presentes nos AH extraídos dessas áreas, possuem uma maior reatividade no solo, ou seja, essas estruturas possuem mais sítios ligantes, uma maior variedade de elementos químicos e menor presença de carbono aromático, reagindo assim muito mais com íons metálicos presentes no solo.

Em síntese, as técnicas analíticas utilizadas neste estudo puderam caracterizar as estruturas e reatividade dos AH extraídos das cinco áreas avaliadas. Partindo de uma análise mais simples, como a quantificação de carbono nos AH, até uma análise mais sensível, como a fluorescência, pode-se verificar que as áreas A1 (intensiva irrigada) e A4 (degradada) apresentaram uma MOS rica em carbono presentes em estruturas conjugadas, valores altos dos índices de humificação nas camadas superficiais do solo, maior presença de fluoróforos

aromáticos conjugados e predomínio de bandas do FTIR referentes aos grupos aromáticos. Essas duas áreas apresentaram ainda pouca reatividade quando na presença de íons Cu II, sugerindo assim que os AH extraídos das áreas A1 e A4 se mostram mais estabilizados, interagindo menos com íons metálicos.

Essas mesmas técnicas analíticas mostraram que as áreas A2 (intensivo sequeiro), A3 (em recuperação) e a área de referência (A5) tiveram um menor teor de carbono nos AH nas camadas superficiais, uma baixa humificação e baixa presença das bandas do FTIR, responsáveis pelas ligações de carbono em aromáticos. As áreas indicaram também a presença de fluoróforos mais simples nos AH, sendo essas estruturas mais susceptíveis a sofrerem mudanças e perderem carbono para a atmosfera, dependendo do tipo de manejo que as áreas venham a sofrer. Em contrapartida, os AH dessas áreas apresentaram maior reatividade na presença de íons Cu II. Dessa forma, as áreas A1, A2 e A5 conseguiram a incorporação de uma MO mais fresca, mostrando então que é possível incorporar carbono nesses manejos, minimizando a presença do mesmo na atmosfera.

6. CONCLUSÃO

O manejo intensivo de sequeiro e o manejo em recuperação apresentaram um acúmulo de carbono no solo inteiro, semelhante e até maior do que o da mata nativa (área de referência), mostrando que esses dois manejos são promissores para o sequestro de carbono presente na atmosfera, para o solo. Os resultados de teor de carbono nos ácidos húmicos, os valores dos índices de humificação e os dados extraídos com o FTIR mostraram que o carbono que está sendo acumulado nesses manejos está presente em uma matéria orgânica mais lábil, com uma estrutura menos estável e mais reativa. Esses resultados comprovam que nessas áreas está ocorrendo uma incorporação de uma MO fresca, o que é bom para o solo, uma vez que este terá uma MO mais dinâmica. Porém, deve-se sempre monitorar essas áreas, visto que uma MO mais lábil é mais susceptível a perder carbono para a atmosfera, dependendo do tipo de atividades que são realizadas nessas áreas.

O manejo degradado apresentou um baixo acúmulo de carbono no solo inteiro, afirmando que o processo de degradação de pastagens ocasiona a perda da vegetação, não incorporando assim uma matéria orgânica fresca, fazendo com que as pastagens não acumulem carbono no solo. A degradação também acelera a decomposição da MOS, deixando a mesma mais humificada desde as camadas mais superficiais. Esse comportamento foi visto pelos AH extraídos da área degradada, os quais apresentaram um índice de humificação superior comparado às outras áreas, mesmo nas camadas mais superficiais. O teor de carbono nos AH dessa área foi alto, a presença de fluoróforos mais conjugados também foi maior nas primeiras camadas do solo, mostrando assim que os AH são mais complexos nesse manejo.

O manejo irrigado apresentou um comportamento semelhante ao manejo degradado, onde houve pouco acúmulo de carbono nessas pastagens, um valor de humificação maior e um valor alto de carbono nos AH de superfície. Esses resultados implicam que o excesso de irrigação das pastagens também não é o mais adequado, quando se deseja acumular carbono por meio de pastagens. Esses resultados ressaltaram também que a MO, tanto da área irrigada quanto da degradada, é muito estabilizada, não interagindo muito com o solo, deixando o mesmo menos dinâmico.

O experimento de supressão de fluorescência realizado neste estudo mostrou que os fluoróforos obtidos se comportam de forma diferente, quanto ao mecanismo de complexação de íons metálicos. O estudo mostrou ainda que os AH oriundos das áreas irrigada e degradada

possuíram pouca afinidade com íons Cu^{II} , enquanto que as áreas de sequeiro, em recuperação e mata nativa apresentaram um AH mais reativo na presença de íons Cu^{II} .

Em suma, pode-se concluir que os diferentes tipos de manejos são capazes de alterar as estruturas químicas dos AH presentes no solo, e até mesmo alterar a sua reatividade na presença de íons metálicos, deixando esses mais ou menos reativos. Pode-se verificar também que os manejos, principalmente o intensivo de sequeiro e o em recuperação, possuem potencial para acumular carbono no solo, sendo então viável o processo de recuperação das pastagens degradadas, possibilitando assim uma diminuição de carbono na atmosfera, pela incorporação deste nos solos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, J. J.; TAKÁCS, M. Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. **Organic Geochemistry**, v. 35, p. 243-256, 2004.

ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; VALENZUELA-CALAHORRO, C.; GARRIDO, J. J. Cu (II) retention in a humic substance. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 270, p. 47-55, 2004.

ALVEZ, B. J. R.; URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; BODDEY, R. M. Dinâmica do carbon em solos sob pastagem. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. Ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 561-569.

ATKINS, P. W. **Physical chemistry**. Oxford: University Press, 1998. 503 p.

BAIRD, C. **Química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

BASTOS, R. S.; MENDONÇA, E. S.; ALVAREZ, V. H.; CORREA, M. M. Formação e estabilização de agregados do solo decorrentes da adição de compostos orgânicos com diferentes características hidrofóbicas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 29, p. 11-20, 2005.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S. C. Diminuição da humificação da matéria orgânica de um cambissolo húmico em plantio direto. **Revista Brasileira do Solo**, v. 27, p. 537-544, 2003.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PAVINATO, A. Armazenamento de carbono em frações de matéria orgânica de um latossolo vermelho sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 677-683, 2004.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PAVINATO, A.; DIECKOW, J. Carbon sequestration in two Brazilian cerrado soils under no-till. **Soil & Tillage Research**, v. 86, p. 237-245, 2006.

BENITES, V. M.; MENDONÇA, E. S.; SCHAEFER, C. E. R.; MARTIN-NETO, L. 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.

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S. Potencial para acumulação e sequestro de carbono em pastagens de *Brachiaria* In: LIMA, M. A., CABRAL, O. M. R., MIGUEZ, J. D. G. (Ed.). **Mudanças climáticas globais e agropecuária brasileira**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 213-229.

BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. de P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 103, p. 389-403, 2004.

BOUWMAN, A.; VAN DER HOEK, K.; EICKHOUT, B.; SOENARJO, I. Exploring changes in world ruminant production systems. **Agricultural Systems**, v. 84, p. 121-153, 2005.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **The nature and properties of soils**. 14. ed. revisada. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2008. 975 p.

BRO, R. PARAFAC, tutorial and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 38, p. 149-171, 1997.

BRONICK, C.J. & LAL, R. Soil structure and management: A review. **Geoderma**, v. 124, p. 3-22, 2005.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E.; SANTOS, G. A. Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar com preservação do palhço e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 935-944, 2003.

CARDINALI, M. C. B. **Diagnóstico de Huanglongbing (HLB) em citros utilizando técnicas fotônicas**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

CARVALHO, M. M.; XAVIER, D.F.; ALVIM, M.J. Uso de leguminosas arbóreas na recuperação e sustentabilidade de pastagens cultivadas. In: CARVALHO, M. M.; ALVIM, M. J.; CARNEIRO, J. C. (Ed.). **Sistemas agroflorestais pecuários: opções de sustentabilidade para áreas tropicais e subtropicais**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 189-204.

CARVALHO, J. L. N.; RAUCCI, G. S.; CERRI, C. E. P.; BERNOUX, FEIGL, B. J.; WRUCK, F. J.; CERRI, C. C. Impact of pasture, agriculture and crop-livestock systems on soil C stocks in Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 110, p. 175-186, 2010.

CERRI, C. C.; BERNOUX, M.; CERRI, C. E. P.; FELLER, C. Carbon cycling and sequestration opportunities in South America: the case of Brazil. **Soil Use and Management**, v. 20, p. 248-254, 2004.

CERRI, C. C.; BERNOUX, M.; CERRI, C. E. P.; FEIGL, B. J.; PICCOLO, M. C. Ciclo do carbono e Efeito Estufa. In: SIMPÓSIO SOBRE PLANTIO DIRETO E MEIO AMBIENTE – SEQUESTRO DE CARBONO E QUALIDADE DA ÁGUA, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha, 2005. p. 15-19.

CERRI, C. E. P.; SPAROVEK, G.; BERNOUX, M.; EASTERLING, W. E.; MELILLO, J. M.; CERRI, C. C. Tropical agriculture and global warming: impacts and mitigation options. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 1, p. 83-99, 2007.

CHIEN, S. W. C.; HUANG, C. C.; WANG, M. C. Analytical and spectroscopic characteristics of refuse compost-derived humic substances. **Internacional Journal of Applied Science and Engineering**, v. 1, n. 1, p. 62-71, 2003.

CIOTTA, N. M.; BAYER, C.; FONTOURA, S. M. V.; ERNANI, P. R.; ALBUQUERQUE, J. A. Matéria orgânica e aumento da capacidade de troca de cátions em solo com argila de atividade baixa sob plantio direto. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1161-1164, 2003.

COBLE, P. G. Characterizing of marine and territorial DOM in seawater using excitation emission matrix spectroscopy. **Marine Chemistry**, v. 51, p. 325-346, 1996

CONCEIÇÃO, P. C.; AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 777-788, 2005.

CONTE, P.; SPACCINI, R.; SMEJKALOVÁ, D.; NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acid. **Chemosphere**, v. 69, p. 1032-1039, 2007.

CORAZZA, E. J.; SILVA, J. E.; RESCK, D. V.; GOMES, A. C. Comportamento de diferentes sistemas de manejo como fonte ou depósito de carbono em relação à vegetação de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 425-432, 1999.

CORY, R. M.; MCKNIGHT, D. M. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 8142-8149, 2005.

COSTA, Jr. C.; CORBEELS, M.; BERNOUX, M.; PICCOLO, M. C.; NETO, M. S.; FEIGL, B. J.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; SCOPEL, E.; LAL, R. Assessing soil carbono storage rates under no-tillage: Comparing the synchronic and diachronic approaches. **Soil and Tillage Research**, v. 134, p. 207-212, 2013.

COSTA JUNIOR, C.; CERRI, C. E. P.; DORICH, C. D.; MAIA, S. M. F.; BERNOUX, M.; CERRI, C. C. Towards a representative assessment of methane and nitrous oxide emissions and mitigation options from manure management of beef cattle feedlots in Brazil. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 20, n. 3, p. 425-438, 2015.

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.

DIAS, P.F.; SOUTO, S.B.; RESENDE, A.S.; URQUIAGA, S.; ROCHA, G.P.; MOREIRA, J.F.; FRANCO, A.A. Transferência do N fixado por leguminosas arbóreas para o capim *Survenola* crescido em consórcio. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 352- 356, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Rede Pecu**. São Carlos, 2011. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/redepecus>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Cursos de capacitação de multiplicadores do Plano ABC – Bruno Carneiro e Pedreira**. 2011. Disponível em: <<http://www.sistemafamato.org.br/site/arquivos/01122011123347.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

ESTEVEES da SILVA, J. C. G.; MACHADO, A. A. S. C.; OLIVEIRA, C. J. S.; PINTO, M. S. S. D. S. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO_2^{2+} . **Talanta**, v. 45, p. 1155-1165, 1998.

ESTEVEES, V. I., OTERO, M., DUARTE, A. C. Comparative characterization of humic substances from the open ocean, estuarine water and fresh water. **Organic Geochemistry**, v. 40, p. 942-950, 2009.

FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 108, p. 147-166, 1998.

FILELLA, M.; PARTHASARATHY, N.; BUFFLE J. Humic and fulvic compounds. In: Encyclopedia of analytical science. WORSFOLD, P. J.; TOWNSHEND, A.; POOLE C. F. (Ed.). 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 288-298.

FREIXO, A. A.; CANELLAS, L. P.; MACHADO, P. L. O. A. Propriedades espectrais da matéria orgânica leve-livre e leve intra-agregado de dois latossolos sob plantio direto e preparo convencional. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 26, p. 445-453, 2002.

GAZOLLA, P. R.; GUARESCHI, R. F.; PERIN, A.; PEREIRA, M. G.; ROSSI, C. Q. Fractions of soil organic matter under pasture, tillage system and crop-livestock integration. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 693-704, 2015.

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 oxisols under tillage systems by EPR, ^{13}C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, v. 118, p. 181-190, 2004.

GONÇALVES, S. A.; FRANCHINI, J. C. **Integração lavoura-pecuária**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 8p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 44).

GRIMM, M.; AZARRAGA, L. V.; CARREIRA, L. A.; SUSETYO, W. Continuous multiligant distribution model used to predict the stability constant of CU (II) metal complexation with humic material from fluorescence quenching data. **Environmental Science Technology**, v. 25, p. 1427-1431, 1991.

GUARESCHI, R. F.; PEREIRA, M. G.; PERIN, A. Frações da matéria orgânica em áreas de Latossolo sob diferentes sistemas de manejo no Cerrado do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2615-2628, 2013.

GUO, X.; JIANG, J.; XI, B.; HE, X.; ZHANG, H.; DENG, Y. Study on the spectral and Cu (II) binding characteristics of DOM leached from soils and lake sediments in the Hetao region. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 2079-2087, 2012.

GUO, X. J.; ZHU, N. M.; CHEN, L.; YUAN, D. H.; HE, L. S. Characterizing the fluorescent properties and copper complexation of dissolved organic matter in saline-alkali soils using fluorescence excitation-emission matrix and parallel factor analysis. **Journal of soils and sediments**, p. 1473-1482, 2015.

HE, X. S.; XI, B. D.; LI, X.; PAN, H. W.; AN, D.; BAI, S. G.; LI, D.; CUI, D. Y. Fluorescence excitation-emission matrix spectra coupled with parallel factor and regional integration analysis to characterize organic matter humification. **Chemosphere**, v. 93, p. 2208-2215, 2013.

HENDERSON, R. K.; BAKER, A.; MURPHY, K. R.; HAMBLIA, A.; STUETZA, R. M.; KHANA, S. J. Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: a review. **Water Research**, v. 43, p. 863-881, 2009.

HERNANDEZ, D.; PLAZA, C.; SENESI, N.; POLO, A. Detection of copper (II) and zinc (II) binding to humic acids from pigs slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy. **Environmental Pollution**, v. 143, p. 212-220, 2006.

HUFFMAN JR, E. W. D.; STUBER, H. A. Analytical methodology for elemental analysis of humic substances. In: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MacCARTHY, P. (Ed.). **Humic Substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization**. New York: John Wiley, 1985. v. 15. p. 433-455.

INSTITUTO DE ESTUDOS DO COMÉRCIO E NEGOCIAÇÕES INTERNACIONAIS (ICONE). **Modeling LUC due to sugarcane expansion by M. Moreira**. 2012. Disponível em: <http://www.ornl.gov/sci/ees/cbes/forums/CBES_MMOREIRA_tech.pdf> Acesso em: 24 abr. 2015.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). **Climate Change 2001: The scientific basis**. Third Assessment Report. 2001. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/press/pr.htm>>. Acesso em: 23 abr 2015.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). **Climate Change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability**. 2014. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg2/ar5_wgii_spm_en.pdf>. Acesso em: 23 abr 2015.

JIANG, J.; YU, H.; XI, B.; MENG, F.; ZHOU, Y.; LIU, H. UV-visible spectroscopic properties of dissolved fulvic acids extracted from salined fluvo-aquic soils in the Hetao Irrigation District, China. **Soil Research**, v. 49, p. 670-679, 2012.

JIMENEZ, R. R.; LADHA, J. K. Automated elemental analysis: a rapid and reliable but expensive measurement of total carbon and nitrogen in plant and soil samples. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 24, n. 15-16, p. 1897-1924, 1993.

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.

KARLSSON, T.; PERSSON, P.; SKYLLBERG U. Complexation of copper (II) in organic soils and in dissolved organic matter EXAFS evidence for chelate ring structures. **Environment Science Technological**, v. 40, p. 2623-2628, 2006.

KLUTHCOUSKI, J.; AIDAR, H.; COBUCI, T.; STONE, L. F.; THUNG, M. D. T.; BALBINO, L. C.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, F. R. Integração lavoura-pecuária: estudo de caso vivenciado pela Embrapa Arroz e Feijão. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Ciência, agricultura e sociedade**. Brasília: Embrapa Informação e Tecnologia, 2006. p. 277-330.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 2006. 204 p.

LAL, R. Soil erosion and the global carbon budget. **Environment International**, v. 29, p. 437-450, 2003.

LAL, R. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. **Geoderma**, v. 123, p. 1-22, 2004a.

LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science**, v. 304, p. 1623-1627, 2004b.

LU, X.; ALLEN, H. Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)-link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg. **Water Research**, v. 36, p. 50-83, 2002.

LUCIANI, X.; MOUNIER, S.; PARAQUETTI, H. H. M.; REDON, R.; LUCAS, Y.; BOIS, A.; LACERDA, L. D.; RAYNAUD, M.; RIPERT, M. Tracing of dissolved organic matter from the SEPETIBA Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices. **Marine Environmental Research**, v. 65, p. 148-157, 2008.

MACHADO, A. A. S. C.; ESTEVES da SILVA, J. C. G.; MAIA, J. A. C. Multiwavelength analysis of synchronous fluorescence spectra of the complexes between a soil fulvic acid and Cu (II). **Analytica Chimica Acta**, v. 292, p. 121-132, 1994.

MACHADO, P. L. O. A. Carbono no solo e a mitigação da mudança climática global. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 329-334, 2005.

MANN, P. J.; SPENCER, R. G. M.; HERNES, P. J.; SIX, J.; AIKEN, G. R.; TANK, S. E.; McCLELLAND, J. W.; BUTLER, K. D.; DYDA, R. Y.; HOLMES, R. M. Pan-arctic trends in terrestrial dissolved organic matter from optical measurements. **Frontiers in Earth Science**, v. 4, p. 1-18, 2016.

MARTINS, B. H. **Estudos espectroscópicos de matéria orgânica e ácidos húmicos de solos sob adição de efluente de esgoto tratado**. 2009. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MATTHEWS, B. J. H.; JONES, A. C.; THEODOROU, N. K.; TUDHOPE, A. W. Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs. **Marine Chemistry**, v. 55, p. 317-332, 1996.

MCDONALD, S.; BISHOP, A. G.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Analytical chemistry of freshwater humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 527, p. 105-124, 2004.

MCKNIGHT, D.; THURMAN, E. M.; WERSHAW, R. L.; HEMOND, H. Biogeochemistry of aquatic humic substances in thoreau's bog, Concord, Massachusetts. **Ecology**, v. 66, p. 1339-1352, 1985.

MCKNIGHT, D. M.; BOYER, E. W.; WESTERHOOF, P. K.; DORAN, P. T.; KULBE, T.; ANDERSEN, D. Y. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. **Limnology and Oceanography**, v. 46, p. 38-48, 2001.

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.

MELO, C. A. **Caracterização e dinâmica de metais em Rios da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

MERCADANTE M. E. Z.; CALIMAN A. P. M.; CANESIN R. C.; BONILHA S. F. M. Relationship between residual feed intake and enteric methane emission in Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 44, p. 255-262, 2015.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Plano mais pecuária**. Brasília: Assessoria de Gestão Estratégica, 2014. 32 p.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO (MCTI). **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. Brasília, 2014. 168 p.

MOUNIER, S.; ZHAO, H.; GARNIER, C.; REDON, R. Copper complexing properties dissolved organic matter: PARAFAC treatment of fluorescence quenching. **Biogeochemistry**, v. 106, p. 107-116, 2011.

MURPHY, K. R.; RUIZ, G. M.; DUNSMUIR, W. T. M.; WAITE, T. D. Optimized parameters for fluorescence-based verification of ballast water exchange by ships. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 2357-2362, 2006.

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

NEVES, C. M. N.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; MACEDO, R. L. G.; TOKURA, A. M. Estoque de carbono em sistemas agrossilvopastoril, pastagem e eucalipto sob cultivo convencional na região noroeste do estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1038-1046, 2004.

NICOLOSO, R. S. **Dinâmica da matéria orgânica do solo em áreas de integração lavoura-pecuária sob sistema plantio direto**. 2005. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

OBSERVATÓRIO DO CLIMA. **A parte que nos cabe**. 2015. Disponível em: <http://www.observatoriodoclima.eco.br/wp-content/uploads/2015/06/notatecnica_oc.pdf>. Acesso em: 18 jun 2016.

OLIVEIRA, P. P. A. **Recuperação de pastagens degradadas para sistemas intensivos de produção de bovinos**. Concórdia: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 23 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica, 38).

OLIVEIRA, P. P. A.; PENATTI, M. A.; CORSI, M. **Correção do solo e fertilização de pastagens em sistemas intensivos de produção de leite**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. 56 p. (Documentos / Embrapa Pecuária Sudeste, 86).

OLIVEIRA, P. P. A. Gases de efeito estufa em sistemas de produção animal brasileiros e a importância do balanço de carbono para a preservação ambiental. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 623-634, 2015.

O ECO. **Gases do efeito estufa**: dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄). 2014. Disponível em: <<http://www.oeco.org.br/dicionario-ambiental/28261-gases-do-efeito-estufa-dioxido-de-carbono-co2-e-metano-ch4/>>. Acesso em: 10 jul 2016.

PAGANO, T.; ROSS, A. D.; CHIARELLI, J.; KENNY, J. E. Multidimensional fluorescence studies of the phenolic content of dissolved organic carbon in humic substances. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, p. 937-943, 2012.

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 Technological**, v. 40, p. 917-923, 2006.

PICCOLO, A.; STEVENSON, F. J. Infrared spectra of Cu²⁺, Pb²⁺ and Ca²⁺ complexes of soil humic substances. **Geoderma**, v. 27, p. 195-208, 1982.

PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. **Advances in Environmental Research**, v. 3, p. 508-521, 2000.

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

PRIMO, D. C.; MENEZES, R. S. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-13, 2011.

REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; BRAGA, J. M.; FERREIRA, E.; TARRÉ, R. M.; MACEDO, R. O.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; CADISH, G.; GILLER, K; BODDEY, R. M. Litter deposition and disappearance in *Brachiaria* pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 54, p. 99-112, 1999.

RICE, J. Humim. **Soil Science**, v. 166, p. 848-857, 2001.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas**. São Paulo: Unesp, 2003. 120 p.

ROSA, A. H.; SIMÕES, M. L.; OLIVEIRA, L. C.; ROCHA, J. C.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P. Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soil profiles in Brazil's amazonian region. **Geoderma**, v. 127, p. 1-10, 2005.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J. C. **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 304 p.

RURAL CENTRO. **Expogrande começa nesta sexta com palestra sobre sustentabilidade**. Campo Grande, 2011. Disponível em: <<http://www.ruralcentro.com.br/noticias/38554/expogrande-comeca-nesta-sexta-com-palestra-sobre-sustentabilidade>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RYAN, D. K.; WEBER, J. H. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. **Analytical Chemistry**, v. 5, p. 986-990, 1982.

RYAN, M. G.; LAW, B. E. Interpreting, measuring and modeling soil respiration. **Biogeochemistry**, v. 73, p. 3-27, 2005.

SANTÍN, C.; YAMASHITA, Y.; OTERO, X. L.; ÁLVAREZ, M. Á.; JAFFÉ, R. Characterizing humic substances from estuarine soils and sediments by excitation-emission matrix spectroscopy and parallel factor analysis. **Biogeochemistry**, v.96, p. 131-147, 2009.

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

SARGENTINI, E.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; ZARA, L. F.; DOS SANTOS, A. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v. 24, p. 339-344, 2001.

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

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

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

SECRETARIA DE ASSUNTOS ESTRATÉGICOS DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA (SAE). **Radiografia das Pastagens – SAE/LAPIG-UFG**. 2014. Disponível em: <<http://www.sae.gov.br/imprensa/noticia/cerca-de-40-das-pastagens-no-brasil-estao-em-boas-condicoes/>>. Acesso em: 18 jun 2016.

SEGNINI, A. **Estrutura e estabilidade da matéria orgânica em áreas com potencial de sequestro de carbono no solo**. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SEGNINI, A.; XAVIER, A. A. P.; OTAVIANI-JUNIOR, P. L.; FERREIRA, E. C.; WATANABE, A. M.; SPERANÇA, M. A.; NICOLODELLI, G.; VILLAS-BOAS, P. R.; OLIVEIRA, P. P. A.; MILORI, D. M. B. P. Physical and chemical matrix effects in soil carbon quantification using laser-induced breakdown spectroscopy. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, p. 722-729, 2014.

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

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 environment. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. p. 11-26.

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

SILVA, J. E.; RESCK, D. V. S.; CORAZZA, E. J.; VIVALDI, L. Carbon storage in clayey oxisol cultivated pastures in the "Cerrado" region, Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 103, p. 357-363, 2004.

SILVA, E. F.; LOURENTE, E. P. R.; MARCHETTI, M. E.; MERCANTE, F. M.; FERREIRA, A. K.; FUJII, G. C. Frações lábeis e recalcitrantes da matéria orgânica em solos sob integração lavoura-pecuária. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 46, n. 10, p. 1321-1331, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000. 460 p.

SIMPSON, A. Multidimensional solution state NMR of humic substance: a practical guide and review. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 795-809, 2001.

SIMPSON, A. J.; KINGERY, W. L.; SWAW, D. R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 84-88, 2002.

SISTEMA DE ESTIMATIVA DE EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA (SEEG). **Agropecuária (1970-2014)**. 2014. Disponível em: <<http://seeg.eco.br/panorama-agropecuaria/>>. Acesso em: 20 jun 2016.

SISTEMA DE ESTIMATIVA DE EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA (SEEG). **Relatórios Analíticos**. 2015. Disponível em: <<http://seeg.eco.br/analise-do-panorama-atual-de-emissoes-brasileiras-tendencias-e-desafios/>>. Acesso em: 20 jun 2016.

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

SMITH, D. S.; BELL, R. A.; KRAMER, J. R. Metal speciation in natural Waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 74, p. 133-65, 2002.

SPAROVEK, G.; CORRECHEL, V.; BARRETTO, A. G. O. P. The risk of erosion in Brazilian cultivated pastures. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 1, p. 77-82, 2007.

STEDMON, C. A.; MARKAGER, S.; BRO, R. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. **Marine Chemistry**, v. 82, p. 239-254, 2003.

STEDMON, C. A.; BRO, R. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 6, p. 572-579, 2008.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry**: genesis, composition, reactions. New York: Wiley, 1994. 496p.

STUART, B. **Modern infrared spectroscopy**: analytical chemistry by open learning. New York: John Willey, 1996. 176 p.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: Sparks D.L.; PAGE, A. L.; HELMKE, P. A.; LOEPPERT, R. H.; SOLTANPOUR, P. N.; TABATABAI, M. A.; JOHSTON, C. T.; SUMNER, M. E. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America / American Society of Agronomy, 1996, p. 1011-1020.

TADINI, A. M.; NICOLODELLI, G.; MOUNIER, S.; MONTES, C. R.; MILORI, D. M. B. P. The importance of humin in soil characterisation: a study on Amazonian soils using diferente fluorescence techniques. **Science of the Total Environment**, v. 537, p. 152-158, 2015.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Record brazilian agricultural production spurs further export gains**. 2014. Disponível em <<http://www.fas.usda.gov/data/record-brazilian-agricultural-production-spurs-further-export-gains>>. Acesso em 12 ago 2014.

WEI, J.; HAN, L.; SONG, J.; CHEN, M. Evaluation of the Interactions between water extractable soil organic matter and metal cations (Cu(II), Eu(III)) using excitation-emission matrix combined with Parallel Factor Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 14464-14476, 2015.

XAVIER, A. **Avaliação do acúmulo e emissão de carbono no solo sob sistemas produtivos de pastagem**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

YAMASHITA, Y.; JAFFÉ, R.; MAIE, N.; TANOUE, E. Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in costal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel fator analysis (EEM-PARAFAC). **Limnology and Oceanography**, v. 53, p. 1900-1908, 2008.

YAMASHITA, Y.; BOYER, J. R.; JAFFÉ, R. Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy. **Continental Shelf Research**, v. 66, p. 136-144, 2013.

YU, H.; SONG, Y.; XI, B.; ZHANG, M.; HE, X. Application of derivative synchronous fluorescence spectroscopy (DSFS) to indicate salinization processes of saline soils in semi-arid region. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 532-539, 2012.

YUAN, D. H.; GUO, X. J.; WEN, L.; HE, L. S.; WANG, J. G.; LI, J. Q. Detection of Copper (II) and Cadmiun (II) binding to dissolved organic matter from macrphyte decomposition by fluorescence excitatiom-emission matrix spectra combined with parallel fator analysis. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 152-160, 2015.

ZHOU, P.; YAN, H.; GU, B. Competitive complexation of metal ions with humic substances. **Chemosphere**, v. 58, p. 1327-1337, 2005.

ZSOLNAY, Y. 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.