UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAMILA MIRANDA CARVALHO

Estudo do melhoramento do solo utilizando resíduos gerados na cadeia produtiva da cana-de-açúcar: uma avaliação da matéria orgânica do solo empregando técnicas espectroscópicas

São Carlos

2015

CAMILA MIRANDA CARVALHO

Estudo do melhoramento do solo utilizando resíduos gerados na cadeia produtiva da cana-de-açúcar: uma avaliação da matéria orgânica do solo empregando técnicas espectroscópicas

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Débora Marcondes
Bastos Pereira Milori

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carvalho, Camila Miranda

Estudo do melhoramento do solo utilizando resíduos gerados na cadeia produtiva da cana-de-açúcar: uma avaliação da matéria orgânica do solo empregando técnicas espectroscópicas / Camila Miranda Carvalho; orientadora Debora Marcondes Bastos Pereira Milori - versão corrigida -- São Carlos, 2015.
100 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Matéria orgânica do solo. 2. Cinza de bagaço de cana-de-açúcar. 3. Torta de filtro. 4. Espectroscopia. 5. Fluorescência induzida por laser.
I. Milori, Debora Marcondes Bastos Pereira, orient.
II. Título.

Dedico a Deus Pai, Deus Filho
e Deus Espírito Santo.

Aos meus pais e irmã.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor e Salvador de minha vida, Jesus Cristo, com amor agradeço por ter me achado e hoje ser o motivo maior de minha existência. À Deus criador do céu, da terra e de tudo que nela há, obrigada porque o Senhor é bom, e nos permite conhecer um pouco do que o Senhor criou. A pessoa do Espírito Santo, Aquele que me ajuda, que está comigo todos os dias, e que sem a presença eu não conseguiria realizar este trabalho e viver dia a dia.

Aos meus pais, agradeço os exemplos, o auxílio e apoio incondicional, sou abençoada porque os tenho como pais. Entre muitas coisas aos exemplos de meu pai pela curiosidade e busca do conhecimento e à minha mãe por ser uma mulher simples e trabalhadora. À minha irmã, minha companheira desde de o ventre de nossa mãe, pelo apoio e influência em minha vida, por ser minha referência espiritual e amiga. Aos meus avós, a maioria está na Glória de Deus agora, mas agradeço a vida que compartilhamos juntos e os exemplos que me marcaram para sempre. A todos os parentes que sei que torcem por mim e pela finalização deste trabalho.

À Dra Débora, minha orientadora, pessoa a qual agradeço muitíssimo, primeiramente por este trabalho, por toda a ajuda e condução das conclusões e direcionamento ao longo do doutorado. Obrigada por tudo Dra Débora, que Deus a abençoe ainda mais, você abençoa muitas vidas através de seu trabalho.

Ao professor Eduardo Corá por ceder as amostras de solo estudadas, pelas discussões e solicitude. Ao professor Newton La Scala e Dr. Eduardo Figueiredo pela ajuda prestada no início do doutorado. Ao professor Stéphane Mounier, meu coorientador no exterior, agradeço muito a oportunidade.

Aos amigos que fizeram minha vida mais alegre, em especial ao Cleber Hilário dos Santos, que além da amizade me ensinou a maioria do *know how* da parte de química do meu trabalho, um mestre por natureza. A querida Lilian Martelli que muitas vezes me tirou dúvidas de química. Aos irmãos de fé, obrigada pelo apoio espiritual, ensinamentos e orações, ação que move o coração de Deus a nos ajudar.

À Embrapa Instrumentação e Instituto de Física de São Carlos, lugares abençoados, cheio de pessoas competentes e solícitas. Á todos os colegas de trabalho, técnicos de laboratório e trabalhadores em geral.

Esteja sobre nós a bondade do nosso
Deus Soberano. Consolida para nós, a
obra de nossas mãos; consolida a obra
de nossas mãos!

Salmo 90: 17

RESUMO

CARVALHO, C. M. Estudo do melhoramento do solo utilizando resíduos gerados na cadeia produtiva da cana-de-açúcar: uma avaliação da matéria orgânica do solo empregando técnicas espectroscópicas. 2015. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Em face ao bom desempenho da agricultura brasileira, cresce também a responsabilidade por uma produção sustentável. Particularmente, o sistema produtivo da cana-de-açúcar vem se adaptando a uma produção sem queima, e busca formas alternativas de manejo dos resíduos da produção que sejam sustentáveis tanto economicamente, quanto ambientalmente. Neste trabalho apresentamos resultados dos tratamentos de solo agriculturável com resíduos de i) cinzas de bagaço de cana aplicado em cobertura e ii) torta de filtro na entrelinha da cultura, em diferentes doses. Avaliamos o impacto desses tratamentos no conteúdo de carbono e na matéria orgânica do solo. Para determinar se os tratamentos podem ser considerados sequestradores de carbono e ambientalmente sustentáveis nos detemos na preservação seletiva como mecanismo de retenção da matéria orgânica do solo, a qual leva a acumulação de componentes orgânicos químicos mais recalcitrantes. Utilizamos as técnicas espectroscópicas de fluorescência de luz UV-Visível, espectroscopia de fluorescência matriz excitação-emissão para avaliar a fração de ácido húmico do solo e o aumento da recalcitrância química, a fluorescência induzida por laser (FIL) para observar a matéria orgânica como um todo e a espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS) utilizada como uma nova ferramenta para avaliar o conteúdo de carbono do solo. No tratamento de solo com adição de cinza de bagaço de cana tivemos potencial de estoque de carbono na dose 40 t/ha. Quanto a torta de filtro, o carbono total do solo aumenta menos significativamente que na cinza, mas não houve potencial de estoque de carbono. Na fração ácido húmico não observamos modificação do grau de humificação do solo com os tratamentos, mesmo a torta sendo um produto rico em matéria orgânica, porém houve um aumento de grupos carbonílicos, que estão associados ao aumento das interações intermoleculares favorecendo por exemplo a complexação do ácido húmico com metais. Nossos resultados de fluorescência induzida por laser apontam que a cinza possivelmente ofereceu melhora nas condições de crescimento da cultura havendo aumento de grupos alifáticos na MOS. Concluimos portanto, que não houve impacto negativo para o estoque de carbono no solo e qualidade da matéria sob tratamento de adição de cinza de bagaço de cana e torta de filtro.

Palavras-chave: Matéria orgânica do solo. Cinza de bagaço de cana-de-açúcar. Torta de filtro. Espectroscopia. Fluorescência induzida por laser.

ABSTRACT

CARVALHO, C. M. **Study of soil amendment under sugar mill waste: an organic matter assessment with spectroscopic techniques.** 2015. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Given the good performance of Brazilian agriculture, grows the responsibility for sustainable production. Particularly, the sugarcane production system has been adapting to a production without burning, and seeks alternative forms of waste management in production that are both economically and environmentally sustainable. We present results of arable soil treatments with i) sugarcane bagasse ash applied in coverage soil and ii) filter cake applied between the lines of culture in different doses. We assess the impact of these treatments on the content and quality of soil organic matter and carbon sequestration capacity. To determine if treatments can be considered environmentally sustainable and carbon sequestration we embrace the selective preservation as a retention mechanism of soil organic matter, which leads to accumulation of chemical organic compounds recalcitrant. We use bidimensional fluorescence UV-Visible spectroscopy and fluorescence excitation-emission matrix to assess the fraction of soil humic acid, the laser-induced fluorescence spectroscopy (LIF) for observing the whole organic matter and laser breakdown induced spectroscopy (LIBS) used as a new tool to assess the soil carbon content. The soil treatment with sugarcane bagasse ash had increased carbon stock in dose 40 t / ha. In humic acid fraction did not observe any change in the degree of humification treatment with AML, but there was an increase of carbonyl groups, which are associated with increased intermolecular interactions and enhancing the complexation of metals with humic acid. Our results suggest a possible improvement in crop growth conditions with an increase of aliphatic groups in MOS. The filter cake is no carbon content recorded, also did not observe any impact on soil organic matter with the incorporation of filter cake although this is a product rich in organic matter. In this context, we conclude that there was no negative impact on the carbon stock and quality of soil organic matter under treatment addition of sugarcane bagasse ash and filter cake.

Keywords: Soil organic matter. Sugarcane bagasse ash. Filter cake. Spectroscopy. Laser induced fluorescence spectroscopy.

SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 Objetivos	17
3 Fundamentos Teóricos	19
3.1 Matéria Orgânica do Solo	19
3.1.1 Substâncias Húmicas	21
3.2 Manejo Agrícola e Estoque de Carbono.....	23
3.3 Métodos Espectroscópicos	29
3.3.1 Espectroscopia de UV-Vis	29
3.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	41
3.3.3 Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzido por Laser	47
3.4 Método Quimiométrico - PARAFAC	52
4 Materiais e Métodos	57
4.1 Áreas experimentais	57
4.2 Preparo das amostras de solo	58
4.3 Extração das Substâncias Húmicas	58
4.4 Métodos químicos e Espectroscópicos.....	61
4.4.1 Análise Elementar	61
4.4.2 Espectroscopia de Absorção de Radiação UV-Vis e Espectroscopia de Fluorescência de Matriz Excitação-Emissão.....	61
4.4.3 Espectroscopia de Fluorescência Bidimensional UV-Vis	62
4.4.4 Ressonância Magnética Nuclear	64
4.4.5 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser.....	65
4.4.6 Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzido por Laser	66
5 Resultados e Discussão	67
5.1 Análise Elementar (CHNS)	67
5.2 Espectroscopia de Absorção de Radiação no UV-Vis	69
5.3 Espectroscopia de Fluorescência de Luz UV-Vis	70
5.3.1 Espectro de Emissão.....	71
5.3.2 Espectros de Varredura Sincronizada.....	72
5.3.3 Espectros Tridimensionais de Fluorescência – Matriz Emissão – Excitação (MEE).....	73
5.3.4 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL)	81
5.5 Ressonância Magnética Nuclear	83

5.6 Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzida por Laser (LIBS)	86
6 Conclusão.....	91
REFERÊNCIAS	93

1 Introdução

Dados recentes mostram que o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e sua área de cultivo tem se expandido, principalmente devido à crescente demanda por etanol, um combustível limpo e renovável que se ajusta ao modelo de economia sustentável atualmente discutido e almejado pela sociedade cujo país é líder na produção. Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o Brasil deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, para o etanol a produção projetada para 2019 é mais que o dobro da registrada em 2008. (51) O estado de São Paulo concentra 60% da produção mundial, representando uma considerável parte da produção mundial sendo todo esse potencial econômico acompanhado de perto pela comunidade científica, a qual procura desenvolver numerosos estudos para melhorar a eficiência da produção e reduzir os impactos ambientais causados pela produção.

A rápida degradação do solo sob exploração agrícola no mundo, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento, despertou nas últimas décadas, a preocupação com a qualidade do solo e a sustentabilidade da produção agrícola. (59) Segundo Lal (40) três das questões mais importantes para o século XXI será o crescimento populacional; um decréscimo na disponibilidade per capita de solos cultiváveis e fontes de água renovável.

O solo é o um dos maiores reservatórios de carbono na natureza, tem quase 3,3 mais carbono que a atmosfera e 4,5 mais carbono que a biomassa (40), sendo 62% de carbono orgânico e 38% de carbono inorgânico, e este pode atuar como fonte ou dreno de carbono para a atmosfera, dependendo das condições naturais e, sobretudo, do tipo de manejo adotado. Além do impacto que o manejo agrícola tem na qualidade do solo, este está fortemente relacionado à emissão de gases do efeito estufa (GEE), sendo as práticas agrícolas e mudanças no uso da terra responsáveis por 30,9% da emissão dos GEE. (47)

Neste trabalho técnicas fotônicas serão utilizadas para quantificação do carbono e avaliação de sua estabilidade no solo, apresentando resultados de tratamento do solo com adição de resíduos da agroindústria da cana-de-açúcar para a matéria orgânica do solo. Foram avaliados os resíduos de: i) cinza de bagaço de cana e ii) torta de filtro, em diferentes doses.

No manejo da cana-de-açúcar, há duas práticas mais comuns: manejo tradicional, que envolve a queima da cana, visando facilitar a sua colheita manual, e a colheita mecanizada, ou cana crua, com deposição da palhada na superfície do solo. Estima-se que 80% da produção brasileira seja convertida em cana crua nos próximos 10 anos. (32) A prática de manejo do

solo utilizando sobras da cultura ou a reutilização de elementos gerados no processo de produção são práticas bem conhecidas e tem o objetivo de melhorar a qualidade do solo e a produção agrícola, também o solo é visto como via de descarte dos subprodutos produzidos, uma saída relativamente simples e econômica. Atualmente a agroindústria da cana tem aplicado cinza de bagaço de cana (CBC) e torta de filtro no tratamento do solo, seguindo o exemplo da aplicação de vinhaça, ou vinhoto, empregado na lavoura como substituto de fertilizantes, entretanto, não há muitos estudos a respeito dos efeitos desta prática para a matéria orgânica do solo.

Atualmente, para se avaliar condições de sequestro de carbono no solo é realizada a quantificação do carbono, em geral utilizando-se analisadores elementares, técnica que verifica a composição elementar das amostras. Entretanto, é um consenso no meio científico que a informação da estabilidade do carbono adicionado ao solo é imprescindível para a caracterização efetiva do sequestro. As informações sobre a estabilidade do carbono, em geral, são obtidas por análise do ácido húmico extraído quimicamente da matéria orgânica do solo através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Este método, entretanto, não pode ser aplicado em larga escala para a obtenção de mapas, o que prejudica a qualidade dos inventários de carbono feitos atualmente. A busca por novos métodos que viabilizem este tipo de análise têm sido extremamente almejados pelos cientistas de solo, neste contexto novas técnicas tem sido propostas e sido trabalhadas quanto à portabilidade e melhoramentos de em geral para serem empregadas no campo, como a fluorescência induzida por laser e a espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzido por Laser.

A seguir será apresentado um capítulo dos fundamentos teóricos utilizados no trabalho: a introdução do conceito de matéria orgânica do solo, um componente do solo relacionado às suas funções básicas; o manejo do solo enfatizando a importância da ação do homem na manutenção e qualidade do solo; o tratamento dado na agroindústria da cana para o solo e os resíduos gerados, em especial a incorporação destes subprodutos no solo; e finalmente os fundamentos teóricos das técnicas de análises de solos empregadas.

2 Objetivos

Avaliar o impacto dos tratamentos do solo utilizando cinza de bagaço de cana e torta de filtro para o conteúdo e qualidade da matéria orgânica do solo, e o potencial de sequestro de carbono.

Verificar se a fluorescência induzida por laser pode oferecer resultados além das técnicas que observam a humificação do ácido húmico, já que esta nos permite ver a matéria orgânica do solo em todas as suas frações. Também avaliar se o método de espectroscopia de emissão ótica induzida por laser (LIBS) obtém sucesso na determinação do carbono total das amostras solos.

3 Fundamentos Teóricos

3.1 Matéria Orgânica do Solo

A formação do solo se dá pelo desgaste das rochas que formam a crosta terrestre, devido a processos físicos e químicos de intemperismo, ação de ventos, água e ação de ácidos orgânicos dos líquens sobre as rochas, por isso regiões diferentes do globo possuem solos com distintas pedogêneses (formação, característica e evolução na paisagem).

O conceito de solo depende diretamente do uso que faremos deste, “do ponto de vista ambiental, o solo pode ser considerado o elo entre a litosfera, o domínio das rochas, atmosfera, o domínio dos gases que envolvem o planeta, biosfera, o domínio dos seres vivos, e hidrosfera, o domínio das águas superficiais” (46), mas seus principais constituintes são ar, água, minerais, matéria orgânica e a biota.

A fração gasosa do solo é chamada atmosfera do solo, que apresenta basicamente as mesmas substâncias encontradas na atmosfera, mas em diferentes proporções, por exemplo, a concentração de CO_2 é duas vezes maior em relação à atmosfera (42), e sua evolução é indicativo da atividade microbiana do solo, que está relacionada a qualidade do solo. A água no solo é o meio onde muitas substâncias se apresentam dissolvidas, compondo a solução do solo, “na solução do solo a maioria das reações químicas do solo se desenvolvem” (Tan¹ *apud* Melo e Alleoni 43).

O material mineral no solo “é aquele formado, predominantemente, por compostos inorgânicos, em vários estágios de intemperismo” (29), os atributos da fase sólida do solo, tamanho de partícula e composição mineral, determinam majoritariamente o comportamento do solo: sua interação com fluidos e solutos, assim como sua compressibilidade, força e regime térmico (27) As frações minerais do solo podem ser divididas segundo sua textura, ou tamanho de partícula (figura 1).

¹ TAN, K.H. **Principles of soil chemistry**. New York, John Wiley & Sons, 1993. 362p.

Figura 1 - Classificação das frações do solo por intervalo de tamanho do diâmetro da partícula definidas pelo: United States Department of Agriculture (USDA); International Soil Science Society (ISSS); United States Public Road Administration (USPRA); British Standards Institute (BSI); Massachusetts Institute of Technology (MIT); and German Standards (DIN) (after Hillel, 1998).

Fonte: Adaptada de DIERICKX (27)

A matéria orgânica do solo (MOS) engloba os resíduos vegetais em variados estágios de decomposição, a biomassa microbiana, as raízes e a fração mais estável denominada húmus (59). Segundo Schnitzer (75) em solos férteis, a função da matéria orgânica é direta e indireta, “seu papel direto é devido a esta providenciar nutrientes para as plantas através dos processos de decomposição e mineralização; e indiretamente ela é associada ao seu efeito nas propriedades físico-químicas do solo”.

Segundo SANTOS (59)

[...] a maioria dos atributos do solo e do ambiente relacionados às funções básicas do solo, tem estreita relação com a MOS, destacando a estabilidade e estrutura dos agregados, infiltração e retenção de água, resistência à erosão, atividade biológica, capacidade de troca de cátions (CTC), disponibilidade de nutrientes para as plantas, lixiviação de nutrientes, liberação de CO₂ e outros gases para a atmosfera.

A MOS pode ser dividida em duas frações: matéria orgânica viva e não viva. A matéria orgânica viva constitui cerca de 5% do carbono orgânico total (COT), e pode ser dividida em três frações: raízes de plantas (5-10%), macrofauna do solo (15-30%) e microrganismos do solo (60-80%). A matéria orgânica não viva constitui 95% da COT, e pode ser dividida em matéria orgânica leve, compostos orgânicos dissolvidos e o húmus.

A matéria orgânica leve ou particulada (MOP) representa 10-30% do carbono orgânico total do solo e corresponde ao material orgânico recentemente adicionado ao solo. Essa fração é de fácil decomposição e pode ser considerada uma boa indicadora das mudanças no solo e manejo de resíduos (86). O carbono solúvel em água é uma forma lábil facilmente

perdida por lixiviação e ataque microbiano, e tem em sua constituição carboidratos, aminoácidos, proteínas, sideróforos, ácidos orgânicos de baixo peso molecular e uma pequena fração de ácidos fulvicos (86).

A fração que resta após a separação da matéria orgânica leve, o húmus, é um compartimento que inclui as substâncias húmicas (SH) e não húmicas (SnH). As substâncias não húmicas apresentam 10-15% do COT dos solos minerais. São grupos de compostos orgânicos bem definidos, como carboidratos, lignina, lipídios, ácidos orgânicos, polifenóis, ácidos nucleicos, pigmentos e proteínas e são grupos mais facilmente degradados pelos microorganismos, tendo normalmente tempo de vida curto no ambiente. As SH contribuem com cerca de 85-90 % da reserva total de COT dos solos minerais e representa o principal compartimento da matéria orgânica do solo, constituindo a grande reserva orgânica do solo.

3.1.1 Substâncias Húmicas

As SH são formadas a partir do processo de humificação, o qual altera estruturas químicas da MO pela degradação de resíduos orgânicos via lixiviação, trituração e catabolismo, sendo controlado por variáveis como temperatura, regime de água do solo, pH e nutrientes livres. Durante o processo de humificação ocorre um aumento nos grupos C-carboxílicos, C-aromáticos e C-alquil, principalmente fenólicos e a diminuição de grupos O-alquil (88). Apesar de conhecidos os grupos funcionais e a composição elementar que compõem as SH, ainda hoje não existe um modelo estrutural definitivo.

Muitas estruturas foram propostas para as SH, cada uma delas foi caracterizada por grupos funcionais similares e a presença de componentes aromáticos e alifáticos. Na literatura há duas propostas de modelos que tentam explicar a estrutura das substâncias húmicas: o modelo macromolecular e o supramolecular (76, 63, 64, 87).

No modelo estrutural macromolecular (figura 2) os AH apresentam grandes porções alifáticas, as funções oxigenadas estão presentes como grupos carboxílicos, hidroxílicos, fenólicos, éter e éster e as funções nitrogenadas presentes como nitrilas e estruturas heterocíclicas. A composição elementar da estrutura do ácido húmico é $C_{308}H_{328}O_{90}N_5$ e tem tamanho molecular de 5540 u.

Figura 2- Modelo macromolecular do AH do solo.

Fonte: Adaptada de SCHULTEN et al. (77)

Outra corrente considera que são estruturas supramoleculares (61), com massa molar aparente variando de poucas centenas a diversos milhares de unidades de massa atômica. Segundo Piccolo (61) as SH são constituídas de uma mistura heterogênea de compostos orgânicos naturais, em que cada fração (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas) deve ser considerada como sendo constituída de uma série de moléculas de tamanhos diferentes (figura 3). A maioria delas não possui a mesma configuração estrutural ou grupos reativos na mesma posição. Entretanto, ambas as correntes concordam que as SH são os componentes mais recalcitrantes da MOS e podem ser separados com base nas suas características de solubilidade (86).

Figura 3 - Modelo estrutural supramolecular das substâncias húmicas

Fonte: Adaptada de SIMPSON. (82)

A divisão das SH em ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina é uma classificação operacional levando-se em conta apenas às características de solubilidade em meio aquoso e não as propriedades inerentes a essas substâncias. Segundo a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e a literatura internacional, as SH podem ser classificadas com base na sua solubilidade em meio aquoso e se dividem em:

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

Neste trabalho iremos acompanhar as modificações da MOS observando as substâncias húmicas, já que este compartimento tem a maior reserva de COT. Em especial analisaremos o ácido húmico, fração mais estudada nas SH e devido a maior presença deste em solos agrícolas brasileiros em relação ao fúlvico, devido a alta acidez do solo e a precipitação, e porque a humina é a parte da MO que mais se complexa com metais dificultando algumas análises em laboratório.

3.2 Manejo Agrícola e Estoque de Carbono

Embora os solos tenham propriedades inerentes associadas a suas características físicas, químicas e biológicas, o manejo do solo tem um papel muito importante para a qualidade do solo (Doran² *apud* Ferreira et al. 30) O manejo do solo consiste num conjunto de operações realizadas com objetivos de propiciar condições favoráveis à semeadura, ao desenvolvimento e à produção das plantas cultivadas, por tempo ilimitado (28).

Muitos estudos tem concluído que a conversão de florestas, savanas e pradarias em solos cultiváveis ou de pastagem tem diminuído o conteúdo da MOS, principalmente devido a distúrbios de rápido a longo prazo causados por operações de preparo do solo associados a baixa adição de nutrientes (Nye et al.³, Dalal et al.⁴ *apud* Dieckow et al.26). Porém há muitas

²DORAN, J. W. Soil health and global sustainability: translating science into practice. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 88, n. 02, p. 119-127, 2002.

³ NYE, P. H.; GREENLAND, D. J. Changes in the soil after clearing tropical forest. **Plant and Soil**, v. 21, p. 101-112, 1964.

variáveis relacionadas à razão de perda de C pelo solo como textura (26) a mudança do microclima na superfície do solo em solos manejados (Houghton⁵ *apud* Cremers²⁴) entre outros. Há os seguintes mecanismos conhecidos de retenção da MOS: i) preservação seletiva, a qual leva ao acúmulo de componentes orgânicos químicos mais recalcitrantes; ii) interação com superfícies de minerais, a qual leva a estabilização (complexação) e iii) proteção física decorrente do “aprisionamento” no interior de microagregados.

Como relatado por Lal (40) o sequestro de carbono no solo acontece ao adotarmos sistemas de manejo que adicionam grandes quantidades de biomassa no solo, ao produzirmos mínimos distúrbios, conservamos os reservatórios de água e a biodiversidade local, melhoramos a estrutura e reforçamos os mecanismos dos ciclos de nutrientes no solo. A estratégia de sequestrar carbono no solo é barata e ambientalmente favorável. Estimativas globais do potencial total do solo como seqüestrador de carbono variam muito, de 0,4 a 0,6 Gt C/ano a 0,6 a 1,2 Gt C/ano (40). O potencial é finito no tempo e capacidade, mas é uma saída rápida até que fontes alternativas de combustíveis fósseis sejam efetivamente adotadas. Porém a quantificação de carbono do solo em condições de campo é um desafio importante relacionado ao ciclo de carbono e às mudanças climáticas globais. Na figura 4 vemos a contribuição da agricultura para o efeito estufa⁶.

Figura 4- a) Concentração atmosférica de quatro GEE nos anos de 1970 a 2004, b) divisão global das emissões dos GEE e c) contribuição por setor em 2004.

Fonte: METZ et al. (47).

⁴ DALAL, R. C.; MAYER, R. J. Long-term trends in fertility of soils under continuous cultivation and cereal cropping in Southern Queensland. 2. Total organic carbon and its rate of loss from the soil profile. **Australian Journal of Soil Research**, v. 24, p. 281-292, 1986.

⁵ HOUGHTON, R. A. The global effects of tropical deflorestations. **Environmental and Science Technology**, v. 24, n. 04, p. 414-422, 1990.

⁶ Gases do efeito estufa, GtCO₂-eq = um Gigaton de massa de gás carbônico equivalente (1GT=1 bilhão de toneladas). A emissão de CO₂ equivalente é obtida multiplicando a emissão do gás num horizonte de tempo pelo seu potencial de contribuição para o efeito estufa (44).

3.2.1 Adição de resíduo no solo

A adição de resíduo no solo é uma prática agrícola bem conhecida, e tem a finalidade de melhorar a qualidade do solo e a produção de alimentos, mas também tem sido usada como um meio de descarte de resíduos acumulados da atividade humana no meio urbano e rural. A adição de lodo de esgoto, dejetos de animais e de frigoríficos, por exemplo, tem sido usado como fertilizantes orgânicos, mas também são fontes potenciais de poluição, principalmente dos aquíferos superficiais e subterrâneos. Também temos a adoção de manejo onde parte da cultura é deixada na superfície do solo, como a palhada da cana-de-açúcar deixada sobre o solo depois da colheita.

A ideia da incorporação de restos de cultura no solo parte do pressuposto que resíduos orgânicos aumentam o conteúdo de nutrientes, da matéria orgânica e umidade superficial do solo, porém em geral não se consideram muito os efeitos negativos como o efeito *priming* (31). Cada prática de adição de resíduo no solo são necessários estudos e avaliações dos impactos gerados na MOS. O efeito *priming* é definido como uma mudança no ciclo da MOS causada por tratamentos de solo com adição de carbono orgânico, em geral a curto prazo de tempo mas pode acontecer a longo prazo (39). No efeito *priming* temos a interação não aditiva entre decomposição do substrato adicionado e a MOS, este substrato pode acelerar a decomposição da MOS, efeito *priming* positivo, ou desacelerar a decomposição da MOS, efeito *priming* negativo (figura 4).

Figura 5 - Esquematização do efeito *priming*

No manejo da cana há duas práticas mais comuns: manejo tradicional, que envolve a queima da cana (CQ), visando facilitar a sua colheita manual e a colheita mecanizada, ou cana crua (CC), com incorporação da palhada no solo. O tipo de colheita da cana pode influenciar a produção e longevidade da cultura, os atributos físicos, químicos e biológicos do solo, o meio ambiente e a saúde pública. O sistema de manejo por cana queimada (CQ) elimina a matéria seca, mas aumenta a concentração de gás carbônico na atmosfera durante o período da queima da cultura. O sistema de cultivo de cana crua (CC) foi desenvolvido com a finalidade de eliminar a queima da cultura, a mobilização superficial dos solos e mantê-los cobertos com restos culturais. Nesse sistema, busca-se a redução da erosão e a um possível aumento do teor de matéria orgânica, mas a densidade do solo é aumentada e sua porosidade é reduzida pelo tráfego de máquinas, já que este é mais facilmente compactado na superfície, o que poderá restringir o desenvolvimento radicular das culturas. Atualmente a CC é o manejo mais aceito, estima-se que 80% da produção brasileira é de cana crua (32).

Efeitos de curto prazo (< 5 anos) sobre a retenção da palhada no solo incluem um pequeno crescimento na labilidade e algumas vezes no conteúdo total de MO na superfície do solo e crescimento da atividade das minhocas (92,13). Contudo os efeitos da conversão de cana queimada para crua no conteúdo e qualidade da MOS são provavelmente cumulativos e são mais observados a longo prazo (>50 anos). Embora esses efeitos possam ser modelados a falta de dados em longo prazo faz com que especulemos tais resultados (32).

Nos produtos gerados pela queima da cana temos a combustão incompleta do material orgânico, o que leva a formação de uma série de compostos genericamente denominados carbono pirogênico. Esses compostos, pela sua recalcitrância, representam um importante reservatório de carbono estável, e também podem desempenhar importante papel na fertilidade dos solos. Depois das queimadas, a liberação de nutrientes da biomassa pode torná-los disponíveis para as culturas, favorecer as perdas deles por volatilização e lixiviação ou mantê-los ligados a complexos altamente recalcitrantes (66). Esses resultados são muito dependentes da intensidade da queima, que pode ser o fator mais importante para a fertilidade do solo. (4)

Estudos realizados em ecossistemas naturais, bem como em laboratório, simulando o efeito do fogo sobre o solo, tem demonstrado que o material piromórfico proveniente das queimadas consiste de substâncias macromoleculares relativamente inertes, principalmente derivadas da biomassa vegetal, e de natureza altamente aromática (35, 7). O aquecimento da

MOS pode resultar em considerável aumento na aromaticidade desta, em detrimento de grupos carboxílicos e estruturas alifáticas.

Tratamento do solo com cinza de bagaço de cana e torta de filtro

A torta de filtro é obtida nos filtros rotativos após extração da sacarose residual, sua composição depende da variedade da cana, do tipo de solo em que é produzida, da maturação da cana, do processo de clarificação do caldo, dentre outros (53), a torta é rica em P, um nutriente muito requerido em solos brasileiros, apresenta altos teores de matéria orgânica, nitrogênio e cálcio, além de teores consideráveis de potássio, magnésio e micronutrientes (57).

A torta de filtro é um subproduto sólido de importância relevante em decorrência do grande volume gerado (30 a 40 kg por tonelada de cana moída). Em sua composição química possui teores, relativamente, elevados de matéria orgânica e de elementos essenciais às plantas, podendo ser utilizada em parte para substituir fertilizantes minerais (53). Graças a essas características, esse subproduto pode desempenhar papel fundamental na produção agrícola e nos solos, na manutenção da fertilidade. Atualmente ainda não há critérios técnicos e uma normatização no setor quanto ao uso dos resíduos de torta de filtro e cinza de bagaço de cana no solo.

O advento da cogeração de energia nas unidades sucroalcooleira por meio da queima do bagaço de cana de açúcar proporciona grande quantidade de cinza. Para cada tonelada de cana moída são gerados 250 kg de bagaço (25%) que, após serem queimados em caldeira para produzir energia origina, aproximadamente, 25 kg de cinza (10%). (9)

A CBC têm sido largamente utilizada como fonte de fósforo, cálcio e magnésio. Tem impacto no pH do solo e no suprimento de nutrientes (60) porém seu efeito na fertilidade é curto. Segundo Oliveira et al. (58) as cinzas, de modo geral, tem potencial de fornecer nutrientes para as plantas e proporcionar efeito corretivo no solo em decorrência de sua composição química, cujos efeitos podem variar com o tipo de solo. Anguissola e Silva (5) citam que as cinzas de caldeira constitui um importante resíduo orgânico capaz de fornecer quantidades significativas de nutrientes às plantas, como por exemplo Mg, S, P, K, Fe, Mn, Zn e Cu. No entanto, pode ainda fornecer Na ao solo, o que proporciona efeitos negativos ao solo e à planta.

Os resíduos de CBC e as cinzas geradas pela queima da cana são produtos que tem relação com os produtos denominados biocarvão ou *black carbon*. A produção e deposição de biochar no solo tem ganho rapidamente o reconhecimento mundial como uma opção viável no armazenamento permanente de carbono, e os seus benefícios para a fertilidade do solo continuam a surgir.

Atualmente, o biocarvão pode ser produzido usando matéria orgânica, tal como resíduos de culturas, cascas, restos de madeira (troncos, casca, ramos), várias gramíneas e outros resíduos da agricultura e pecuária (depois de um pré-tratamento). Os principais processos de produção são a pirólise (lenta e rápida) e a gaseificação em regimes que deixam resíduos de carvão vegetal.

Como corretivo do solo, o biocarvão cria uma reserva de carbono recalcitrante com carga negativa, servindo como uma rede que retira CO₂ da atmosfera e o armazena no solo sob a forma de carbono recalcitrante. (56) A capacidade de retenção de nutrientes não só reduz a necessidade total de fertilizante como também o impacto no clima e ambiente das terras cultiváveis.

Os objetivos importantes que motivam a gestão do biocarvão no solo resumem-se à melhoria da capacidade de retenção de água e de outras propriedades físicas do solo, aumento da estabilidade da reserva de carbono, na adsorção e/ou complexação de matéria orgânica, componentes tóxicos e de gases dentro do solo, retenção e adição de nutrientes e no melhoramento do crescimento de microrganismos benéficos.

O papel do biocarvão como veículo sequestrador viável foi formalmente reconhecido no projeto de texto de negociação na reunião da ONU em Copenhague sobre as alterações climáticas: “Devemos dar especial atenção ao papel dos solos no sequestro de carbono, incluindo o uso de biocarvão e de sumidouros de carbono em terras áridas”.

O destino das cinzas é o solo em áreas cultivadas com cana-de-açúcar, contudo, o descarte no solo não é autorizado pelas agências ambientais do país ou pelo Ministério da Agricultura, sem antes comprovada sua eficácia (9). Além disso, são escassos os estudos visando utilização da CBC. Camargo et al. (15) consideram que a disposição de resíduos industriais no solo pode ser alternativa interessante e econômica, desde que seja tecnicamente embasada.

3.3 Métodos Espectroscópicos

Métodos espectroscópicos têm sido amplamente empregados na ciência do solo, pois permitem detalhado conhecimento dos processos químicos relacionados com a transferência e transformação de elementos e de compostos no sistema solo-água-planta-atmosfera (47). Operacionalmente as técnicas espectroscópicas possuem vantagens como alta sensibilidade, utilização de pequenas quantidades de amostras e de fácil execução.

Técnicas como espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e de fluorescência, têm sido muito utilizadas no estudo das SH, para caracterização estrutural, verificação da natureza e concentração dos radicais livres presentes, identificação de grupos funcionais, determinação do grau de alifaticidade e aromaticidade. Nesta seção será apresentada uma introdução teórica das espectroscopias na região do ultravioleta-visível, de fluorescência UV-Vis, de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser e fluorescência induzida por laser.

3.3.1 Espectroscopia de UV-Vis

A introdução da análise de espectroscopia de UV-Vis nos anos 1930 foi um marco na química analítica, constituindo um caminho para as outras técnicas espectroscópicas. E muitas são as vantagens desse tipo de análise, como não ser destrutiva, analisar um grande número de amostra em tempo reduzido, simplicidade e baixo custo dos equipamentos.

O uso da propriedade da absorção da luz nessa região foi a primeira responsável pela criação do conceito de “grau de maturação” de substâncias húmicas, grau de humificação ou ainda grau de evolução química (17). Hoje novos conceitos foram incorporados com a aplicação de outras técnicas espectroscópicas, mas o parâmetro que persiste e é utilizado nas análises de espectroscopia UV-Vis em substâncias húmicas é a razão entre a absorbância em 465 nm e 665 nm de soluções aquosas diluídas de ácidos húmicos e fúlvicos, a relação E_4/E_6 .

A energia total de uma molécula é a soma de suas energias eletrônicas, vibracional e rotacional. A energia de uma determinada radiação eletromagnética relaciona-se com a sua frequência (ou comprimento de onda), dada pela equação:

$$E = hf = h \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, f é a frequência e λ o comprimento de onda da radiação.

Na interação da radiação com a matéria podem ocorrer muitos processos físicos dependendo da energia envolvida, como a absorção da luz, reflexão, transmissão, espalhamento, luminescência, entre outros. Na figura 6 vemos um esquema da interação da radiação com a matéria nas diferentes regiões do espectro eletromagnético, a energia absorvida na região do ultravioleta e do visível produz transição eletrônica dos elétrons mais energéticos da molécula. A energia absorvida na região UV-Vis gera uma transferência de elétrons de um orbital molecular ocupado (geralmente não ligante n ou ligante π) para um orbital não ocupado antiligante, σ^* ou π^* (17).

Figura 6 - A interação da radiação com a matéria

Fonte: GEORGIA State University (31).

A energia em excesso no estado excitado pode produzir a quebra de ligação ou a ionização da molécula, ou ainda pode ser reemitida como luz ou calor. Uma vez que a absorção de luz é quantizada, cada transição deveria fornecer uma linha bem definida, mas isso não ocorre, pois cada nível eletrônico possui vários subníveis vibracionais e assim, são obtidas bandas de absorção. As duas características importantes de um espectro UV são a posição da banda e sua intensidade. A posição da banda corresponde ao comprimento de onda cuja energia corresponde àquela necessária para a transição. A intensidade da banda depende de dois fatores: a probabilidade da transição ocorrer e a diferença de energia entre os níveis

fundamental e excitado. A equação que dá a intensidade de absorção é derivada da lei de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = kcl \quad (2)$$

onde I_0 e I correspondem a intensidade de luz que incide sobre a amostra e a que é transmitida depois de atravessá-la, k é uma constante característica da amostra, c é a concentração da amostra, l é o caminho ótico através da amostra e A é a absorbância da amostra.

Nos compostos orgânicos o grupo insaturado que é responsável pela absorção UV é chamado de cromóforo, estes são a ligação dupla C=C, o anel aromático e a ligação dupla C=O. A inclusão de ligações π adicionais e o grau de extensão da conjugação aproximam cada vez mais os níveis de energia entre o orbital do estado fundamental e o excitado, como resultado, o comprimento de onda da radiação se torna maior com o aumento do grau de conjugação (figura 7). Sistemas aromáticos e heteroaromáticos são geralmente utilizados para exemplificar sistemas π conjugados e tais estruturas são bons cromóforos. Os elétrons não ligantes de heteroátomos, tais como N, O e S também são envolvidos na ressonância e podem estender a conjugação desses sistemas.

Figura 7 - A interação da radiação com moléculas aromáticas com grau de conjugação crescente.

Fonte: Adaptada de SILVERSTEIN et al. (81)

Podemos entender fisicamente a situação de conjugação quando associamos o elétron preso à molécula a situação de uma partícula quântica presa numa caixa (figura 8). Os elétrons tem propriedade tanto de partículas como de ondas, e sua localização mais provável é uma região tridimensional em torno do núcleo denominada orbital.

Figura 8 - Partícula quântica presa na caixa e semelhança com elétrons em uma molécula de anel aromático conjugada.

Fonte: Adaptada de MILORI (50).

A equação de energia do elétron preso na caixa (preso á molécula) é dada por:

$$E_n = \frac{n^2 h^2}{8mL^2} \quad (3)$$

onde n é o nível de energia ($n = 1, 2, \dots$), m a massa do elétron e L a largura da caixa.

Então, através da equação 3 pode-se notar que com o aumento da conjugação de anéis aromáticos estamos aumentando a região espacial do elétron, ou seja, estamos aumentando o comprimento L da caixa, e com isso a energia de transição entre os níveis é diminuída e temos um deslocamento da radiação que interagiu com a amostra para maiores comprimentos de onda, um deslocamento para o vermelho.

3.3.1.1 Espectroscopia de Absorção UV-Vis

O espectro de absorção UV-Vis do ácido húmico do solo é largamente conhecido como monotonicamente decrescente com o crescimento do comprimento de onda e assim

difícil de interpretar. (86) Independentemente da origem das substâncias húmicas, espectros UV-Vis são bastante similares devido à presença de ligações π e de conjugações na molécula que promovem a sobreposição na absorção de energia. Na figura 9 temos espectros de absorbância de ácidos húmicos na região UV-Vis.

Figura 9 - Espectros de absorbância UV-Vis de ácidos húmicos isolados de tratamentos com lodo de tratamento de esgoto e composto de resíduo domiciliar urbano.

Fonte: Adaptada de CANELLAS et al. (17)

No espectro apresentado na figura 9 temos um ombro de absorção centrado em 280 nm, Também há um ombro de absorção centrado na região de 250 - 270 nm, que foi atribuído à absorção de estruturas do tipo quinonas. Mas o principal parâmetro utilizado nas análises de espectroscopia UV-Vis em substâncias húmicas é a razão entre a absorbância em 465 nm e 665 nm de soluções aquosas diluídas de ácidos húmicos e fúlvicos. Kononova (38) e depois Schnitzer e Khan⁷ apud Canellas et al. 17) propuseram uma relação inversa entre a razão E_4/E_6 e o grau de condensação de anéis aromáticos nas substâncias húmicas, esta relação reflete qualitativamente a inclinação da reta de Absorbância x λ . A razão E_4/E_6 tem relação inversa com o grau de condensação e indica proporções maiores de componentes alifáticos. Ainda em 1977, Chen (19) e colaboradores argumentaram contra essa assunção medindo indiretamente a aromaticidade ou ramificação de biopolímeros utilizando medidas viscosimétricas e não encontrando qualquer relação com valores de E_4/E_6 .

3.3.1.2 Espectroscopia de Fluorescência

⁷ SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978, 319p.

Quando há a absorção de energia e sua posterior reemissão temos a luminescência, sendo este um fenômeno a nível eletrônico. A luminescência compreende dois processos, a fluorescência e a fosforescência, antes esses fenômenos eram diferenciados pelo tempo de vida média de emissão, tempo que leva para acontecer à emissão de luz pela amostra, mas hoje eles se distinguem pelos estados de spins dos níveis envolvidos. Se durante o processo de emissão não há mudança na multiplicidade de spin, a emissão é fluorescente, se há inversão de spin (exemplo: tripleto $\rightarrow$ singleto) a emissão é fosforescente. Na fluorescência, a radiação emitida cessa imediatamente depois da excitação desaparecer, na fosforescência a emissão espontânea persiste durante longos intervalos de tempo, de segundos até horas (figura 10).

Figura 10 - A observação empírica da diferença entre fluorescência e fosforescência, a curva da fluorescência é mais rapidamente extinguida depois que a fonte de excitação é removida.

Fonte: ATKINS; DE PAULA (6)

A questão do tempo na luminescência sugere que a fluorescência é uma conversão de radiação absorvida em energia reemitida e que a fosforescência envolve o armazenamento de energia e uma emissão lenta. O processo de fluorescência é apresentado na figura 11:

Figura 11 - A sequência de passos que levam a fluorescência. Depois da absorção inicial, o estado vibracional de mais alta energia decai sem emissão de radiação, mas dissipando energia para a vizinhança em forma de movimento. Então acontece a transição radioativa do estado eletrônico mais alto para o menor estado eletrônico.

Fonte: ATKINS; DE PAULA (6)

Na fosforescência a molécula pode efetuar um cruzamento intersistema e transição não radioativa entre estados de diferentes multiplicidades (figura 12). As transições entre estados singlete e tripleto podem ocorrer na presença de acoplamento spin-órbita. O mecanismo de cruzamento intersistema será importante quando a molécula tiver átomos pesados, pois o acoplamento spin-órbita será grande. Este acoplamento quebra a regra de seleção e a molécula pode, então, emitir fracamente. Este processo explica a observação de a energia de excitação parecer estar confinada em um reservatório que vaza lentamente (figura 10).

Figura 12 - A sequência de passos que levam a fosforescência. O passo mais importante é o cruzamento entre sistemas, a troca de estado singlete para tripleto advém do acoplamento spin-órbita. O estado tripleto age como um reservatório de irradiando lentamente porque o retorno ao estado de mais baixa energia é spin proibida.

Fonte: ATKINS; DE PAULA (6)

3.3.1.2.1 Espectroscopia de Fluorescência Bidimensional

O potencial da espectroscopia de fluorescência para estudar moléculas e propriedades funcionais de amostras tiradas do meio ambiente tais como as substâncias húmicas tem sido enfatizado, mas as estruturas fluorescentes parecem constituir a minoria dos componentes na macromolécula húmica (Senesi⁸ *apud* Canellas et al. 17). Os mais eficientes fluoróforos no

⁸ 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.

polímero húmico são indicados ser variavelmente substuídos, anéis aromáticos condensados, e/ou cadeias alifáticas insturadas. Se as moléculas se apresentam mais humificadas temos um deslocamento do sinal de fluorescência para maiores comprimentos de onda, baseados na localização do espectro bidimensional de fluorescência os autores como Zsolnay (94), Kalbitz (36) e Milori (48) desenvolveram índices de humificação da MOS. Os espectros bidimensionais podem ser adquiridos de três modos: emissão, excitação e varredura sincronizada:

1. Modo de emissão: os espectros são obtidos medindo-se a intensidade relativa da radiação emitida como uma função do comprimento de onda, mantendo-se constante o comprimento de onda de excitação.
2. Modo de excitação: os espectros são obtidos medindo-se a intensidade relativa de emissão em um comprimento de onda fixo, enquanto o comprimento de onda de excitação é variado.
3. Modo de varredura sincronizada: os espectros são obtidos medindo a intensidade de fluorescência enquanto simultaneamente são varridos os comprimentos de onda de excitação e emissão, mantendo-se constante a diferença de comprimentos de onda entre eles: $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$. Quando essa diferença é usada, esta técnica pode aumentar a intensidade de alguns picos, aumentando a sensibilidade do método.

A razão A_4/A_1 (90) é baseada no espectro de emissão de fluorescência do AH do solo com excitação em 240 nm. A fluorescência relativa é definida como sendo a área do primeiro quarto do pico da emissão dividido pela área do último quarto, nos fornecendo a razão A_4/A_1 (figura 13).

Figura 13 - Espectro de emissão de fluorescência com excitação em 240 nm do AH do solo, dividido em quatro áreas para o obtenção do grau de humificação da MOS.

Fonte: Adaptada de MILORI et al. (50)

Os espectros de varredura sincronizada oferecem melhor resolução dos picos e seletividade dos sinais do que os espectros de excitação e emissão. Na figura 14a) é possível ver a interferência dos sinais de excitação e emissão obtidos na fluorescência da amostra e verificar que o espectro de varredura sincronizada separa os picos fluorescentes figura 14b).

Figura 14 - a) interferência dos sinais de excitação e emissão da amostra, b) obtenção de melhor resolução nos picos e fluoróforos (A, B, C e D).

Fonte: Adaptada de MILORI (50).

Para o índice de Kalbitz (36) temos a fluorescência dada por um espectro de varredura sincronizada e o índice de humificação é a razão das intensidades em torno dos comprimentos de onda de 370 e 450 nm ou de 400 e 450 nm (figura 15).

Figura 15 - Espectro típico de fluorescência de varredura sincronizada do AH do solo, com comprimento de onda de emissão e excitação $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 55$.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.1.2.2 Espectroscopia Tridimensional de Fluorescência Matriz Excitação-Emissão (MEE)

Chen et al. (19) consideram o espectro de matriz excitação-emissão melhor para caracterizar as substâncias húmicas em relação aos espectros obtidos por fluorescência bidimensional, matrizes de excitação-emissão são geradas por duas dimensões independentes de comprimentos de onda, a projeção destes espectros gera uma superfície tridimensional de fluorescência total, com a presença de todas as bandas de excitação e emissão dos fluoróforos presentes como visto na figura 16.

Figura 16 - Espectro de fluorescência no modo matriz excitação-emissão (MEE) (ou curvas de nível) obtidos para os AH.

Fonte: SANTOS (67)

O espectro tridimensional de MEE é gerado pela obtenção de espectros de excitação e de emissão de uma amostra. Os espectros de excitação são produzidos pela medida da intensidade de luminescência mantendo-se constante o comprimento de onda de emissão e varrendo-se o de excitação. Espectros de emissão são obtidos de forma contrária, mas através do mesmo princípio, mantendo-se a excitação constante e varrendo-se o modo de emissão.

Na figura 15 podemos notar nos espectros a presença um sinal de cor branca, que são ruídos, eles acontecem devido ao espalhamento da luz pela amostra, espalhamento Rayleigh e Raman. No espalhamento Rayleigh a presença de partículas ou moléculas de tamanho muito inferior ao comprimento da luz incidente faz com que parte da luz colida elasticamente com

estes corpos no trajeto do raio luminoso incidente, e então o comprimento da luz espalhada é o mesmo daquele incidente. Este espalhamento pode ser observado como uma linha diagonal no espectro de fluorescência de MEE para comprimentos de onda de excitação iguais aos comprimentos de emissão. Devido à construção da grade do monocromador (sistema contendo basicamente fenda e grade de difração) usada para selecionar o comprimento de onda excitação, temos também alguns comprimentos de luz duplicados na luz de excitação que incidirá na amostra, por esta razão uma banda extra de espalhamento Rayleigh, a banda de difração de segunda ordem, aparecerá no espectro de MEE.

O espalhamento Raman é um espalhamento causado pela absorção e reemissão da luz acoplada com estados vibracionais, teremos o comprimento de onda da luz espalhada maior do que da luz de excitação, com uma constante diferença no comprimento de onda. O espalhamento Raman pode ser visto como uma linha diagonal com um sistemático aumento no desvio entre este e a linha do espalhamento Rayleigh.

Os AH do solo são caracterizados por apresentarem máxima emissão em típicos comprimentos de onda mais longos, e pequenos valores de intensidade de fluorescência dependentes da concentração da amostra, os principais picos observados nos MEE são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 — Principais picos encontrados nos espectros de MEE obtidos nos estudos das SHs.

Pico	Características	λ_{ex} máximo	λ_{em} máximo
A	Tipo ácido fúlvico	250-260	380-460
C	SHs provenientes de ambientes terrestres	330-350	420-480
	Tipo ácido húmico	260-380	>500
T	Semelhante à proteína (triptofano)	270-280	320-350
B	Semelhante à proteína (tirosina)	270-280	300-320

Fonte: Adaptada de COBLE (21)

A espectroscopia de fluorescência MEE tem sido usada com sucesso para avaliar as características da matéria orgânica natural e substâncias húmicas de diversas origens e tem provado ser uma técnica útil para diferenciar as mudanças e transformação da matéria orgânica em ambientes naturais (79).

3.3.1.2.3 Fluorescência Induzida por Laser

A utilização de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL) aplicada a avaliação da estabilidade da MOS proposta por (49) é uma metodologia nova com resultados importantes e eficientes (84,26,32). Suas vantagens são agilidade, não é destrutiva, limpa já que não utiliza reagentes químicos na preparação da amostra, e as análises de solo podem ser feitas *in situ*, dado a portabilidade do equipamento. O FIL de bancada foi um sistema pioneiro utilizado para obter a humificação da MO de amostras de solo sem tratamento químico (48). Esta técnica tinha como princípio básico excitar a amostra de solo com a emissão de um laser na região do azul ou violeta, o que verificava a fluorescência de grupos funcionais mais complexos da MOS.

Milori et al. (48) estudando AH dissolvidos encontraram que o comprimento de onda na região do azul (465 nm) era mais eficiente em excitar estruturas as quais aumentavam no processo de humificação. Neste trabalho é proposto que a área total do espectro de emissão de fluorescência com excitação em 465 nm, o índice A_{465} , era proporcional ao grau de humificação da MOS (figura 17).

Figura 17 - Espectro de emissão de fluorescência com excitação em 465 nm do AH do solo, demonstrando que a área embaixo do espectro é dependente do tipo de tratamento do solo, fato que reflete na humificação da MOS.

Fonte: MILORI et al.(48)

A espectroscopia de FIL é utilizada para avaliar o grau de humificação da MOS através do índice H_{FIL} . Na figura 18 temos o espectro de FIL típico do solo. O primeiro pico, ao redor de 405 nm, é o espalhamento da luz por reflexão, a região de emissão da MOS é a banda mais alargada.

Figura 18 - Espectro de emissão de FIL típico do solo com excitação em 405 nm.

Fonte: SANTOS (67)

O índice H_{FIL} proposto por Milori et al. (49) é obtido através do cálculo da razão entre o valor da área sob o espectro de emissão de fluorescência (ACF) (figura 18) e o valor da porcentagem de carbono total presente na amostra de solo inteiro (% CT) (equação 1). A razão ACF/CT é uma proposta de deixar as amostras de solo em uma mesma concentração de fluoróforos, já que neste tipo de análise se interessa mais por carbonos que estão ligados a anéis aromáticos e não os sinais de fluorescência de carbonos em cadeias abertas que também podem emitir, mas com menor eficiência e maior número na MOS.

$$H_{FIL} = \frac{ACF}{\% CT} \quad (4)$$

3.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear⁹

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) se aplica ao estudo de núcleos atômicos com momento magnético total não nulo, número de prótons ímpar e de nêutrons também ímpar, estes núcleos se comportam como pequenos ímãs. A aplicação de um campo magnético externo afetam os níveis de energia de spin, permitindo observar, em ressonância, o espectro resultante das transições entre estes níveis.

⁹ DONOSO, J. P. Espectroscopia Física. Disponível em: <www.ifsc.usp.br/~donoso/espectroscopia/RMN.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2015.

Níveis de energia num campo magnético

A interação do momento magnético μ com um campo magnético $\mathbf{H}_0$ é descrita pelo hamiltoniano:

$$H = -\mu H_0 \quad (5)$$

com o campo magnético na direção z : $H = -\mu_z H_0 = -\gamma I_z H_0$, onde μ_z é o momento magnético ao longo do eixo z , I_z é o spin nuclear na direção z e γ é o fator giromagnético característico de cada núcleo. O operador I_z tem autovalores $m\hbar$ ($m = l, l-1, \dots, -l$).

Aplicando o hamiltoniano aos estados de spin (l, m)

$$H|l, m\rangle = -\gamma\hbar H_0 I_z|l, m\rangle = -\gamma\hbar H_0 m|l, m\rangle \quad (6)$$

Através da equação 6 vemos que as energias que resultam tem $(2l + 1)$ componentes:

$$E_m = -\gamma\hbar H_0 m \quad (7)$$

Um spin nuclear $I = 1/2$ fornece $m = +\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$ e portanto a separação entre dois níveis é:

$$\Delta E = -\gamma\hbar H_0 \quad (8).$$

Se a amostra é exposta a radiação de frequência ω_0 de forma que:

$$E = \hbar\omega_0 = \gamma\hbar H_0 \quad (9)$$

A absorção de energia correspondente à transição entre os níveis de spin $+1/2$ e $-1/2$ quando se satisfaz a condição de ressonância: $\omega_0 = \gamma H_0$, e esta é a frequência de precessão dos spins do campo, ou frequência de Larmor, quando isso ocorre há o fenômeno da ressonância magnética nuclear (RMN).

Figura 19 - a) interação entre os estados m_s do elétron e um campo magnético externo pode ser visualizada como a precessão do vetor representando o momento angular e b) os níveis nucleares de energia de um núcleo de spin $-1/2$ com uma razão giromagnética positiva em um campo magnético, a ressonância acontece quando a separação de energia dos níveis corresponde a energia dos fótons no campo eletromagnético.

Fonte: ATKINS; DE PAULA (6).

Na figura 19 b) vemos que a degenerescência dos estados de spins foi removida pela ação do campo magnético, sendo a separação de energia ΔE entre os dois níveis chamada de separação Zeeman. Esta separação aumenta linearmente com o aumento do campo magnético. Transições de dipolo magnético entre os dois estados de spins ocorrem quando se faz incidir, perpendicularmente ao campo magnético, radiação eletromagnética cujos fótons possuem energia $\hbar\omega_0$ igual a ΔE .

Em um conjunto macroscópico de spins submetido a um campo magnético externo em equilíbrio térmico e sem a aplicação de radiação eletromagnética que promova as transições de spins, a razão entre as populações de spins dos níveis energéticos, pode ser satisfatoriamente descrita pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{n_1}{n_0} = \exp^{-\Delta E/k_B T} \approx 1 - \frac{\hbar \omega_0}{k_B T} \quad (10)$$

onde n_1 e n_0 são as populações dos níveis de maior e menor energia, k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura da amostra em estudo. Assim, a diminuição da temperatura da amostra ou aumento do campo magnético leva a um aumento da população de spins de maior energia e consequentemente a um aumento da intensidade do sinal.

As frequências de Larmor dos núcleos nos campos normalmente empregados nos laboratórios localizam-se na região de radiofrequência (RF). A absorção ressonante ocorre quando a condição de ressonância $\omega = \gamma H_0$ é satisfeita. Ou seja, a transição entre os dois níveis de spin ($m_l: +\frac{1}{2} \rightarrow -\frac{1}{2}$) ocorre exatamente na frequência de Larmor $\omega = \omega_L$.

O pulso de radiofrequência gera um campo rotante (B_1) com frequência ω_0 . A interação entre B_1 e o momento magnético total M ($M = \sum \mu$) desloca este vetor da direção z de um pequeno ângulo θ . O desvio de M e sua precessão em torno da direção z determina o aparecimento de uma magnetização no plano xy , com componentes M_x e M_y , que induzem uma corrente elétrica numa bobina orientada no plano xy . Que resulta num sinal elétrico quando a condição de ressonância é atingida, na temos figura 20 temos a geração do sinal de RMN:

Figura 20 - a) Um pulso de radiofrequência incidindo na amostra de momento magnético total M gera um campo magnético B_1 com frequência ω_0 , M é deslocado da direção z com ângulo θ , b) amostra dentro da bobina receptora do sinal elétrico de ressonância.

Fonte: ATKINS; DE PAULA. (6)

O deslocamento químico

O fenômeno de deslocamento químico se dá pelo fato de núcleos da mesma espécie terem diferentes linhas no espectro de RMN, o que foi observado pela primeira vez em 1950 pelos físicos Proctor e Yu (10) da Universidade de Harvard, ao estudarem a RMN do ^{14}N em vários compostos. A ocorrência do mesmo núcleo γ fornecer sinais de frequências é uma indicação de que o campo magnético experimentado por cada núcleo depende da situação (da vizinhança) desse núcleo na molécula ou do sólido, sendo os elétrons a principal razão para a ocorrência de desvios químicos em RMN.

Uma amostra ao ser colocada num campo magnético se magnetiza, modificando o campo. O campo magnético na posição do núcleo será inferior ao campo aplicado, pois os elétrons blindam o núcleo. Com a melhoria na resolução dos espectrômetros de RMN possível detectar as estruturas fina e hiperfina dos espectros atribuídas aos deslocamentos químicos e as interações entre os spins nucleares.

O campo externo (B_0) induz momentos angulares orbitais dos elétrons (a circulação de correntes de elétrons). A intensidade do campo local (B_{loc}) que atua sobre o núcleo depende da estrutura eletrônica na vizinhança do núcleo, núcleos que estejam em grupos químicos diferentes têm constantes de blindagem diferentes. O campo local se descreve:

$$B_{loc} = (1 - \sigma)B_0 \quad (11)$$

com a frequência de Larmor $\nu_L = \frac{\gamma B_{loc}}{2\pi} = \frac{\gamma (1-\sigma)B_0}{2\pi}$, que varia conforme o ambiente em que está o núcleo. A expressão deslocamento químico passou a dar uma dimensão quantitativa, na qual se relaciona a frequência de ressonância ν do núcleo a de um padrão de referência ν^0 (equação 12)

$$\delta \equiv \frac{\nu - \nu^0}{\nu^0} \times 10^6 \quad (12)$$

O padrão para o ^1H e para o ^{13}C é a ressonância do próton e a do carbono no tetrametilsilano $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, TMS, que se dissolve, sem reação química em muitos solventes. A vantagem desta escala δ é a dos deslocamentos serem independentes do campo aplicado (ou seja, independentes do espectrômetro RMN utilizado). Tanto a ^{13}C RMN como de ^1H têm sido aplicadas em estudos relativos a conformações e estruturas moleculares da MO com grande sucesso. A ^{13}C RMN é atualmente a técnica instrumental mais usada para caracterização da MOS, que permite identificar possíveis mudanças estruturais sobre os compostos húmicos e frações organo-minerais do solo, que refletem em alterações de suas propriedades nos solos. As informações obtidas para as SH se relacionam ao grau de alifaticidade e aromaticidade das amostras, identificação de compostos como ligninas, taninos, carboidratos, grupos carboxílicos e outros. A técnica não é destrutiva, preservando a amostra para outras análises.

No entanto, a RMN apresenta algumas limitações, tais, como, baixa sensibilidade devido à pequena abundância natural da maioria dos núcleos, entre eles o ^{13}C (~1,1%), chamado de núcleo raro, e os tempos de relaxação muito longos que exigem experimentos com longa duração. No caso de medidas de estado sólido para a obtenção de espectros de alta resolução, devem ser resolvidos os três problemas a seguir (18):

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

Estas dificuldades podem ser superadas por meio de uma combinação de técnicas:

1. Desacoplamento
2. Polarização cruzada (CP = cross polarization)
3. Rotação segundo o ângulo mágico (MAS = *magic angle spinning*)

Nas últimas décadas com o desenvolvimento de técnicas novas e sofisticadas, tais como: desacoplamento de alta potência, técnica de rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP), houve um grande avanço e melhoria destas limitações da ^{13}C RMN de estado sólido. A grande maioria dos trabalhos envolvendo SH tem sido desenvolvida com amostras no estado sólido (utilizando-se polarização cruzada e rotação no ângulo mágico: CP/MAS ^{13}C RMN), devido ao menor tempo requerido para a obtenção dos espectros.

A técnica de desacoplamento de alta potência permite eliminar o alargamento das linhas no espectro de ^{13}C provocado principalmente pelas interações dipolares entre os núcleos de ^{13}C e ^1H . O campo local que surge sobre os núcleos raros de ^{13}C é devido à presença de núcleos abundantes, como exemplo, prótons. O desacoplamento é feito via redução do momento magnético dos núcleos de ^1H que são abundantes, pela aplicação de um campo de radiofrequência que mantém o momento de dipolo magnético do mesmo em alta rotação (18).

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

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

amostra segundo um determinado ângulo, denominado ângulo mágico ($54^{\circ}44'$) em relação ao campo magnético aplicado. A utilização destas três técnicas combinadas simultaneamente conduz a obtenção de espectros de alta resolução em sólidos.

Os principais grupos funcionais detectados por ^{13}C RMN no estado sólido em AH são (figura 21) (83):

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

Figura 21 - Espectro de ^{13}C RMN típico de AH mostrando os grupos funcionais associados às bandas.

Fonte: Adaptada de SKJEMSTAD; JANIĆ; TAYLOR (83).

A área sob a linha da ressonância será proporcional a concentração da espécie responsável por esta linha, quantificando os diferentes grupos químicos relativamente uns aos outros.

3.3.3 Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzido por Laser

A espectroscopia de emissão ótica com plasma induzido por laser, mais conhecida pelo acrônimo em inglês LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*), é uma técnica analítica emergente baseada em emissões atômicas e iônicas de constituintes elementares da amostra. As vantagens mais importantes do LIBS é que a técnica dispensa qualquer tipo de pré-tratamento da amostra ou uso de reagentes, a rapidez das medições, o baixo custo das análises e tem potencial para ser utilizada *in situ* (72).

Um pulso de laser muito intenso é focado na superfície da amostra sólida, o que causa vaporização, atomização e ionização, fazendo com que haja emissão de radiação característica dos elementos presentes no material estudado. A luz emitida é coletada e as intensidades de emissão dos elementos da amostra são detectadas via uma assinatura única no espectro. O LIBS tem sido bem sucedido em análises qualitativas e quantitativas de amostras de diversas naturezas e origens, como solo, determinando seu conteúdo de carbono, vários elementos e poluentes. (22,25) Algumas técnicas têm sido utilizadas para melhorar a sensibilidade e resolução espectral do LIBS. (11)

Abaixo é descrito o funcionamento do LIBS e os processos envolvidos até a obtenção do espectro da amostra estudada.

1) A ablação por laser

Quando um pulso de laser é focado na superfície da amostra um pequeno volume de sua massa sofre ablação (é removida por mecanismos térmicos e não térmicos) como visto na figura 22:

Figura 22 - Ablação por laser: a remoção de uma pequena quantidade de massa da superfície da amostra usando um feixe de laser pulsado.

Fonte: APPLIED ... (2).

2) O plasma altamente energético

Esta massa interage com a uma porção do pulso de laser para formar um plasma altamente energético que contém elétrons livres, átomos excitados e íons. Pesquisadores tem mostrado que a temperatura do plasma pode exceder 30.000 K nesta breve fase.

Figura 23 - Início do plasma de alta temperatura sobre a superfície da amostra e uma rápida expansão do plasma no meio ambiente.

Fonte: APPLIED ... (2).

3) Resfriamento do plasma

Quando o pulso de laser termina, o plasma começa a resfriar (figura 24).

Figura 24 - Emissão de luz contínua durante o estágio inicial (< 200 ~ 300 nsec) do plasma no processo de resfriamento

Fonte: APPLIED ... (2).

4) Emissão de linhas atômicas discretas pela amostra

Durante o processo de resfriamento do plasma, os elétrons dos átomos e íons que estão no estado excitado decaem para o estado fundamental de menor energia, fazendo com que o plasma emita luz que pode ser separada em linhas espectrais discretas (figura 25).

Figura 25 - Emissão de linhas atômicas discretas em tempos mais longos ($> 1 \mu\text{sec}$).

Fonte: APPLIED ... (2).

5) Luz coletada

A luz emitida do plasma é coletada e levada a um espectrômetro, monocromador mais detector CCD (charge-coupled device) para analisar o espectro LIBS (figura 26).

Figura 26 - Luz coletada pelo conjunto ótico de lente e fibras óticas.

Fonte: APPLIED ... (2).

6) Espectro obtido no LIBS

Cada pico no espectro LIBS é associado a algum elemento na tabela periódica (figura 27). Identificando diferentes picos no espectro podemos determinar rapidamente a composição química da amostra.

Figura 27 - Espectro LIBS.

Fonte: APPLIED ... (2).

O espectro LIBS tem um número pequeno de sinais representativos de C que são intensos e tem alta probabilidade de transição, no caso da matriz de solo, as linhas espectrais mais intensas são interferidas por emissões de elementos mais comuns em solos brasileiros, principalmente o Fe, interferindo na linha de emissão de C em 247,86 nm e Al, que interfere na linha de emissão de C em 193,03 nm. É difícil a quantificação de carbono usando a linha em 247,86 nm sem correções apropriadas para eliminar ou reduzir a interferência por Fe. (54) A linha espectral em 193,03 nm, a qual é interferida por Al, foi escolhida para a quantificação de C devido a possibilidade da interferência ser removida, de acordo com a metodologia proposta por Nicolodelli et al. (54) Considerando a resolução espectral de 0,1 nm, esperamos que a emissão de C em 193,03 seja afetada pela interferência das linhas de Al: Al (II) (iônica) em 193,04 nm e Al (I) (atômica) em 193,16 nm e 193,58 (atômica) (50), como visto na figura 28.

Figura 28 - Região espectral próxima ao pico $\lambda=193$ nm, onde há contribuição de C, Al II, e Al I.

Fonte: NICOLODELLI et al. (54)

A linha Al I (193,58 nm) é usada para corrigir a interferência da transição de Al II (193,04 nm) com a linha do pico de C I (193,03 nm). Devido à baixa resolução do espectrômetro, foi necessário utilizar uma função de ajuste. A função escolhida aqui foi logarítmica, a qual eficientemente ajusta os dados de LIBS com os dados de C obtidos no analisador elementar. A área 1 (A_{C+Al}) correspondendo a transição em 193,03 nm (C I + Al II + Al I) e a área 2 (A_{Al}) em 193,58 nm (Al I) foram extrapoladas depois do ajuste duplo da função Gaussiana no intervalo espectral. As áreas foram plotadas de acordo com a equação 13:

$$A_{C+Al} - \alpha_2 A_{Al} = \ln \Omega \quad (13)$$

onde Ω corresponde a concentração de C medida por análise elementar e o parâmetro α_2 é otimizado para o melhor ajuste linear em relação ao coeficiente de Person.

Depois da correção, um quarto das amostras foi separado para construir o modelo de calibração da área do C I obtida pelo LIBS. A partir desse modelo, foi determinada a concentração de carbono predita pela técnica LIBS para as demais amostras.

3.4 Método Quimiométrico - PARAFAC¹⁰

Não existe limite aparente para o máximo de dimensões em que um dado pode ser gerado, mas é convencional denominarmos “dados de ordens superiores” para todos aqueles conjuntos com ordens iguais ou maiores a dois. Um claro exemplo é a obtenção de dados de terceira ordem através de técnicas instrumentais como fluorimetria de excitação-emissão com decaimento no tempo, onde neste caso as dimensões dos dados são três: comprimento de onda de excitação – comprimento de onda de emissão – tempo, e são denominados métodos multi-modos ou *N-way*. Assim como existe uma diversidade de métodos quimiométricos aplicados a conjuntos de dados de primeira ordem, para dados multi-modos ou *multi-way* ocorre o mesmo.

Métodos empregados para análise exploratória existem em maior número que métodos de regressão, no entanto a possibilidade de inserir restrições nestes modelos é muito grande, possibilitando criar modelos bastante específicos e com grande performance analítica. O mais importante e abrangente destes métodos são os modelos tridimensionais criados nos anos 60

¹⁰ Texto baseado de TREVISAN (90).

pelo psicometrista Layard R. Tucker, que possibilitam a decomposição de um tensor de dados em matrizes de *loadings*, facilitando a interpretação dos resultados.

A grande importância dada ao modelo de Tucker3 ocorre devido à possibilidade de inserir certas restrições ao modelo, de forma que a maioria dos métodos quimiométricos de ordem superior podem ser descritos como um modelo restrito de Tucker3. O modelo de Análise de Fatores Paralelos ou PARAFAC do termo em inglês *Parallel Factor Analysis*, não foge a regra e também pode ser descrito como um modelo restrito de Tucker3. Desta forma, para entender a lógica dos modelos multidimensionais é necessário compreender a estrutura do modelo de Tucker3.

Como foi citado anteriormente, utilizando-se a técnica de fluorescência de excitação-emissão, a medida de uma única amostra gera uma superfície ou uma matriz de intensidades de fluorescência. Extrapolando para um conjunto de amostras, temos a formação de um tensor tridimensional, definido por três dimensões (amostras – comprimento de onda de excitação – comprimento de onda de emissão), com a formação de um sólido tridimensional ou cubo. Graficamente o modelo de Tucker3 pode ser descrito através da figura 29.

Figura 29 - Representação da decomposição efetuada pelo método de Tucker

Fonte: TREVISAN (90)

Os componentes da figura 29 **A**, **B** e **C** são as matrizes de *loadings* geradas pelo modelo, **E** é a matriz de erros do modelo. O modelo PARAFAC pode ser considerado como apenas mais um destes casos particulares de restrição.

PCA e PLS bilineares são obrigatoriamente sequenciais, ou seja, cada novo fator adicionado ao modelo é projetado ortogonalmente ao anterior, de modo que a variância explicada total é somada em cada modelo. Assim como o modelo de Tucker3, PARAFAC pode ser considerado como “*not nested*” ou seja, seus componentes não são obrigatoriamente

ortogonais, de modo que a variância somada para cada componente não é igual à variância total do modelo.

O PARAFAC pode ser considerado uma versão restrita do método geral Tucker3, sendo que a matriz do tensor núcleo $\mathbf{G}$ desdobrado é uma matriz super-identidade. Isso torna o modelo menos flexível pois utiliza menos graus de liberdade, o que determina solução única do sistema. Se por um lado esta característica é a grande vantagem na modelagem de dados espectroscópicos, por outro se mostra desvantajosa, pois é necessário um conhecimento *à priori* do sistema, na escolha do número correto de fatores para efetuar a decomposição dos dados.

A estrutura matemática do modelo é constituída por uma matriz peso ou *scores* $\mathbf{A}$, e duas matrizes de peso $\mathbf{B}$ e $\mathbf{C}$, descritas pelos elementos a_{if} , b_{jf} e c_{kf} (equação 14), respectivamente. A otimização do modelo é obtida pela minimização das somas dos erros quadráticos do modelo, e_{ijk} , no modelo:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (14)$$

onde x_{ijk} é um elemento do tensor de dados definido pelas dimensões $I \times J \times K$.

O principal problema enfrentado nas aplicações utilizando PARAFAC é a escolha do número ideal de fatores para a decomposição. Uma escolha errônea pode gerar interpretações falsas do sistema em estudo, inviabilizando totalmente a análise. Em certos sistemas, onde a composição da amostra é desconhecida, somente o conhecimento do analista ou técnicas de validação cruzada, como *split-half*⁵, ou ainda, a estimativa através do diagnóstico do tensor núcleo tem se mostrado eficiente. Embora existam outros métodos para sugestão do número de fatores, como análise de posto, análise de resíduos e validação cruzada, os resultados obtidos por estes métodos são mais tênues, não servindo como resposta única.

Um importante parâmetro na escolha dos fatores é o diagnóstico de consistência do tensor núcleo, ou termo em inglês *Core Consistency Diagnostic* - Corcondia, como indicativo da trilinearidade do modelo, de modo que os elementos da superdiagonal da matriz núcleo de um modelo Tucker3 deverão ser o mais próximo possível do valor unitário e os elementos externos da superdiagonal, ser próximos a zero. O Corcondia é definido pela equação 15 como:

$$Concordia = 100 * \left(1 - \frac{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (t_{def})^2} \right) \quad (15)$$

onde g_{def} é o elemento da matriz núcleo calculado usando o modelo Tucker3 com os *loadings* obtidos pelo PARAFAC e definido pelas dimensões ($d-e-f$), t_{def} é o elemento de um tensor binário com zeros em todos os elementos e uns na superdiagonal (o ideal) e F é o número de fatores do modelo. O modelo PARAFAC ideal é válido se g_{def} é próximo a t_{def} e neste caso, o valor do diagnóstico núcleo deverá ser de 100%.

4 Materiais e Métodos

4.1 Áreas experimentais

O experimento foi conduzido no município de Itajobi-SP em Latossolo Vermelho-Amarelo, apresentando teor de argila de 20 g/kg no horizonte A (0,0 a 0,25 m), 23 g/kg no horizonte B1 (0,25 a 0,50 m) e 25 g/kg no horizonte B2 (0,50 a 1,00 m). Os tratamentos constituíram da aplicação ao solo de doses (0, 5, 10, 20 e 40 t/ha para base seca) de cinza de bagaço de cana-de-açúcar, a cinza foi aplicada em cobertura na linha da cultura, em cana-soca de 2º corte. A aplicação em cobertura na linha da soqueira ocorreu em 03/11/2011 (figura 30). Os tratos culturais (adubação, controle de daninhas) seguiram recomendações técnicas para a cultura A torta foi distribuída superficialmente na entrelinha da cultura, em cana-soca de 2º corte (figura 31) com as mesmas aplicações da cinza.

As parcelas experimentais foram constituídas por oito linhas da cultura de 15 metros de comprimento, espaçadas de 1,5 m, totalizando 180 m². A parcela útil foi constituída por quatro linhas centrais de 10 metros de cada parcela. O experimento foi implantado seguindo delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados, com cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando vinte parcelas para cana-soca.

Após a colheita da cana foram coletadas seis sub-amostras de terra por parcela, com utilização de trado tipo holandês, para produzir uma amostra composta por tratamento nas profundidades de 0-10 e 10-20 cm.

Figura 30 - Aplicação de CBC em cobertura na linha de plantio da cana-de-açúcar

Fonte: BEGA et al. (9)

Figura 31 - Detalhe da parcela que recebeu torta de filtro distribuída superficialmente na entrelinha da cultura.

Fonte: BEGA et al. (10)

4.2 Preparo das amostras de solo

Para as análises em laboratório as amostras coletadas de solo foram secas ao ar, destorroadas e passadas na peneira de 2 mm de abertura de malha, produzindo a terra fina seca ao ar (TFSA). Em seguida parte dessas amostras foi moída e passada em peneira (100 mesh), cerca de 0,5 g de amostra foram submetidas a 10 toneladas de pressão durante 2 minutos para formar pastilhas, resultantes da prensagem em moldes de aço (1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura). Para cada amostra de solo foram preparadas duas pastilhas. A utilização de pastilhas de solo é devido à sua fácil manipulação em laboratório e a superfície plana das suas faces, ideal para a análise de FIL e LIBS.

4.3 Extração das Substâncias Húmicas

Todas as amostras de solo foram submetidas a um processo de extração e fracionamento químico das substâncias húmicas por diferença de solubilidade, seguindo a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), que utiliza solução de NaOH diluída para dissolver o ácido húmico e HCl para sua precipitação.

Inicialmente realizou-se uma extração com HCl 0,1 mol.L⁻¹ em proporção de 200 g solo : 2000 mL de solução para todas as amostras dos solos. A solução foi agitada durante 1 hora e, em seguida deixada em repouso. O sobrenadante (**AF1** - extrato 1 de ácido fúlvico) foi separado por sifonação.

Foi realizada uma extração com NaOH 0,1 mol.L⁻¹ do precipitado. A solução sofreu agitação intermitente durante 4 horas. A seguir, a suspensão ficou em repouso por 16 horas e o sobrenadante foi isolado através de uma centrifugação (10.000 rpm – 10 min) e reservado para posterior acidificação. O material insolúvel resultante da centrifugação, denominado (fração mineral + humina), foi separado para futura purificação. Esta purificação é feita através da lavagem do material insolúvel com água ultra pura (Millipore - Milli-Q), até que o material seja neutralizado (pH = 7,0).

O sobrenadante isolado foi acidificado com HCl 6 mol.L⁻¹, com agitação simultânea até atingir pH 1,0 e mantido novamente em repouso por 16 horas. Na sequência, a solução foi centrifugada (10.000 rpm – 15 min) para separar o ácido húmico (precipitado) e as frações de ácido fúlvico (sobrenadante – **AF2**).

Nesta etapa do fracionamento químico após a acidificação com HCl 6 mol.L⁻¹ e repouso por 16 horas, ocorreu a precipitação dos ácidos húmicos das amostras de solos submetidas à extração. Depois das etapas mencionadas acima seguimos com a purificação dos ácidos húmicos, que tem como finalidade diminuir o teor de cinzas e remover compostos inorgânicos de baixa massa molecular, o qual não é componente estrutural destas substâncias húmicas (83). O AH extraído dos solos de acordo com o procedimento utilizado contém frequentemente íons metálicos que podem interferir em sua caracterização. Alguns AH, dependendo de suas origens, podem apresentar um teor de cinzas de até 30%.

Um método satisfatório de redução nesta quantidade pode ser obtido por repetidas etapas de dissolução – precipitação – centrifugação e utilização da diálise, utilizando-se membranas específicas. A purificação dos AH é feita geralmente com solução mista de HCl e HF, que promove a quebra das ligações Si-O entre a argila e a matéria orgânica, solubilizando dessa forma os argilo-minerais. Sanches e Monedero¹¹ *apud* Santos (71) verificaram que o tratamento com HCl-HF reduz de forma significativa o teor de cinzas dos AH sem grandes alterações na sua estrutura e na sua composição química.

As amostras de AH foram purificadas através de diálise utilizando membranas

¹¹ SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A.; ROIG, A.; CEGARRA, J.; BERNAL, M.P.; PAREDES, C. Effects of HCl-HF purification treatment on the chemical composition and structure of humic acids. **European Journal of Soil Science**, v. 53, p. 375-381, 2002.

Spectra/Port 6000 – 8000 D, durante seis dias, em água desionizada. Antes de serem utilizadas na purificação dos AH, as membranas de diálise foram devidamente tratadas para remoção de glicerina e traços de compostos sulfurosos para remoção dessas impurezas:

1. Separamos a quantidade de tubos de diálise (aproximadamente 25 cm cada) necessária para o experimento e deixamos fervendo por 1 hora em 1 litro de etanol 50%, sempre manuseando os tubos com luvas cirúrgicas limpas.
2. As membranas foram então agitadas por 1 hora a temperatura ambiente em solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA dissódico $0,001 \text{ mol L}^{-1}$.
3. Repetimos o procedimento com água destilada, depois com nova solução de NaHCO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, e, por fim, com água destilada.

Os ácidos húmicos foram transferidos, com o auxílio de água deionizada (Milli-Q) para uma membrana de diálise, com de 25 cm de comprimento e 5 cm de largura. Procedeu-se a diálise contra água deionizada até que a água da diálise apresentasse teste negativo de cloreto (Cl^-) com nitrato de prata (AgNO_3). Para isso, tal procedimento foi mantido durante aproximadamente seis dias, fazendo-se a troca da água deionizada duas vezes por dia. Após esse procedimento obtivemos ácidos húmicos secando o material por liofilização.

Figura 32 - Esquema simplificado da extração e purificação das substâncias húmicas do solo.

4.4 Métodos químicos e Espectroscópicos

4.4.1 Análise Elementar

A análise elementar é o método mais utilizado para a determinação da composição elementar do solo e das SH, se baseia na detecção de quatro componentes (nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre) de uma mistura, eluída e separada por uma coluna cromatográfica, possibilitando a detecção, na sequência de N_2 , CO_2 , H_2O e SO_2 , com oxidação térmica a 900 °C. Com os resultados da análise elementar não é possível se chegar à fórmula molecular, mas podemos ter uma ideia da composição geral da amostra.

As determinações de carbono e nitrogênio foram realizadas em duplicata, utilizando 10 mg das amostras de TFSA passadas em peneira de 100 mesh, que foram pesadas diretamente em cápsulas de estanho, utilizando uma microbalança que é conectada ao CHNS/O para aquisição direta das massas. Em seguida, as cápsulas de estanho foram fechadas e inseridas no interior do forno. Todos os resultados da análise elementar são baseados no valor padrão da acetanilida, um padrão orgânico de composição elementar conhecida. As medidas foram feitas em um analisador elementar da marca Perkin Elmer, modelo 2400, pertencente à Embrapa Instrumentação.

4.4.2 Espectroscopia de Absorção de Radiação UV-Vis e Espectroscopia de Fluorescência de Matriz Excitação-Emissão

Os espectros de absorção de radiação no UV-Vis das amostras de ácidos húmicos, foram obtidos em soluções de 200 mg L^{-1} , preparadas com 2,0 mg de amostra em 10 mL de $NaHCO_3$ 0,05 mol L^{-1} (86), ajustadas para pH em torno de 8, o que confere um pH ótimo para as medidas de absorbância. Por diluição foram preparadas as soluções de concentração 10 mg L^{-1} . As medidas foram feitas na região de 800 a 200 nm. Utilizou-se um Espectrômetro de Absorção UV – Vis SHIMADZU modelo UV-1601PC, pertencente à Embrapa Instrumentação.

A preparação das amostras para medida de fluorescência de MEE foram feitas diluição das soluções de concentração 10 mg L^{-1} em $NaHCO_3$ (0,05 mol L^{-1}), de modo que a absorbância no comprimento de onda em 254 nm fosse menor que 0,1 (14). Nosso objetivo foi minimizar o efeito de reabsorção da luz pela própria amostra, reduzindo o efeito de filtro

interno (41), evitando a reabsorção de fluoróforos que poderia interferir nas análises dos espectros de fluorescência obtidos no modo MEE.

Luciani et al. (43) mostrou em seu trabalho que é possível corrigir o efeito de filtro interno, usando simplesmente uma diluição controlada, demonstrando boa capacidade da diluição controlada com o PARAFAC no caso de misturas padrão de dois fluoróforos e, no caso de amostras de matéria orgânica dissolvida.

As diluições feitas para os AH estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 — Diluição das amostras de AH para análise de fluorescência no modo excitação-emissão (MEE).

Tratamentos	Profundidade (cm)	Número de Diluições (vezes)
D0	0-10	3
	10-20	4
D5	0-10	3
	10-20	3
D10	0-10	3
	10-20	3
D20	0-10	3
	10-20	4
D40	0-10	2
	10-20	3
D0T	0-10	3
	10-20	4
D5T	0-10	3
	10-20	4
D10T	0-10	3
	10-20	3
D20T	0-10	3
	10-20	3
D40T	0-10	3
	10-20	3

Fonte: Elaborada pela autora

4.4.3 Espectroscopia de Fluorescência Bidimensional UV-Vis

Os AH foram dissolvidos em uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,05 mol L⁻¹ com concentração de 10 mg L⁻¹ e o pH igual a 8 (46). Essa concentração foi utilizada

para minimizar o efeito de reabsorção de fluorescência e reduzir interação entre moléculas. Após o preparo das soluções de AH e das suas diluições, os espectros de fluorescência foram obtidos nos modos de emissão, varredura sincronizada e excitação-emissão (MEE), segundo as metodologias proposta por Zsolnay et al. (94), Kalbitz et al. (36) e Luciani et al. (43) As medidas foram feitas em um espectrômetro de luminescência Perkin Elmer modelo LS-50B pertencente à Embrapa Instrumentação (figura 33). A abertura das fendas de entrada e de saída foi de 10 nm e a velocidade de varredura foi de 500 nm/min.

Figura 33 - Equipamento de espectroscopia de fluorescência UV-Vis marca Perkin-Elmer, modelo LS-50B, fonte: Lâmpadas de Xenônio (Embrapa Instrumentação).

Fonte: SANTOS (71)

Na metodologia proposta por Zsolnay et al. (94), mediu-se o espectro de emissão com excitação em 240 nm, intervalo de varredura entre 300 e 700 nm e filtro de 290 nm. A área sobre o maior quarto de emissão A4, entre 530-630 para os tratamentos de CBC e torta, foi dividida pela área sobre o menor quarto A1, entre 330-430 para os tratamentos, denominado A4/A1, foi utilizada como índice de humificação.

Na metodologia proposta por Kalbitz et al. (36), foram obtidos espectros de varredura sincronizada entre 300 e 520 nm simultaneamente com excitação e emissão com filtro aberto, tomando como diferença constante de comprimento de onda 55 nm ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). O índice de humificação foi determinado a partir da razão entre as intensidades de fluorescência entre 400 e 360 nm ou 470 e 360 nm, respectivamente, no caso estudado temos I_{449}/I_{376} para CBC e torta.

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

obtidos com filtro de 290 nm, com um incremento de excitação de 10 nm totalizando 30 varreduras.

4.4.4 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ^{13}C RMN em estado sólido foram obtidos utilizando a sequência de C^{13} RMN, com polarização cruzada (CP), amplitude variável (VA) e rotação segundo o ângulo mágico (MAS) (^{13}C VACP-MAS), utilizando espectrômetro VARIAN, modelo Unity-Inova 400, campo de 9,4 T (figura 4.4.4.1). A frequência de ressonância foi 100,6 MHz para o ^{13}C e 400 MHz para o ^1H , a banda espectral utilizada para a CP foi de 10 kHz, tempo de contato de 1 ms, tempo de relaxação de espera de 1s, tempo de aquisição de 20 ms. A varredura foi de 0-230 ppm. As amostras de AH purificado foram medidas em rotores cilíndricos de zircônia com diâmetro de 5 mm carregados com aproximadamente 100 mg da amostra, com MAS de 6,4 KHz. A rampa no canal de ^1H foi de 25 % (em KHz) da condição de Hartman-Hahn (56). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao tetrametilsilano e foi utilizado hexametilbenzeno (HMB) como referência externa. A aquisição de cada espectro de AH em CP/MAS ocorreu em um período de 4 horas. Foi utilizado hexametilbenzeno (HMB), que apresenta banda de maior intensidade em 17,3 ppm, como referência.

Os espectros foram divididos em 7 regiões: 0 – 45 ppm (alifáticos não substituídos), 45 – 60 ppm (metoxil e N-alifáticos), 60 – 110 ppm (O-alifáticos), 110 – 140 ppm (aromáticos), 140 – 160 ppm (fenólicos), 160 – 185 ppm (carboxílicos) e 185 – 230 ppm (carbonílicos), integrando-se as áreas e calculando-se a intensidade de cada região em relação à área total do espectro.

As porcentagens de aromaticidade e alifaticidade foram calculadas a partir das áreas dos espectros, segundo Stevenson (86):

$$\text{Aromaticidade (\%)} = \frac{\text{área dos sinais de C aromáticos 110–160 ppm}}{\text{área dos sinais de C 0–160 ppm}} \times 100 \quad (16)$$

$$\text{Alifaticidade (\%)} = \frac{\text{área dos sinais de C alifáticos 0–110 ppm}}{\text{área dos sinais de C 0–160 ppm}} \times 100 \quad (17)$$

Os espectros de ^{13}C RMN de estado sólido foram obtidos em um espectrômetro pertencente à Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP.

4.4.5 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser

No presente estudo, uma das técnicas utilizadas para a avaliação do grau de humificação da MOS foi a espectroscopia de FIL. O equipamento de FIL portátil é baseado em um equipamento de FIL de bancada desenvolvido pela Embrapa Instrumentação. O sistema FIL portátil é composto por um laser de diodo (Coherent - Cube) emitindo em 405 nm (50 mW), um shutter ótico, um feixe apertado de 7 fibras óticas numa ponteira de aço inoxidável – 6 fibras de iluminação ao redor e 1 fibra de leitura no centro (Ocean Optics), um miniespectrômetro de alta sensibilidade (US4000 – Ocean Optics) com intervalo de 194-894 nm e um notebook que controla o laser, o shutter e o tempo de aquisição.

Os espectros de emissão de FIL foram obtidos a partir de amostras de solo de TFSA peneiradas em peneira de 100 mesh. Cerca de 0,5 g de amostra foram submetidas a 10 ton de pressão durante 2 minutos para formar pastilhas, resultantes da prensagem em moldes de aço (1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura). Para cada amostra de solo foram preparadas duas pastilhas. A utilização de pastilhas de solo é devido à sua fácil manipulação em laboratório e a superfície plana das suas faces, ideal para a análise de FIL. As medidas foram feitas em triplicata para as amostras pastilhadas de solo inteiro (solo não submetido a tratamento químico), utilizando o espectrômetro FIL portátil (figura 34).

Figura 34 - Sistema de espectroscopia de FIL portátil com excitação em 405 nm: 1 – chave de energia laser; 2 – caixa de controle do laser; 3 – saída para o cabo ótico; 4 – ponta emissora/coletora do cabo ótico.

4.4.6 Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzido por Laser

Em análises de espectroscopia LIBS utilizamos amostras pastilhadas de solo (descrito no capítulo 4.2). Os espectros de emissão das amostras foram obtidos utilizando um sistema LIBS de bancada da “Ocean Optics”, modelo LIBS 2500 plus (figura 35), pertencente à Embrapa Instrumentação.

Figura 35 - Sistema LIBS de bancada da Ocean Optics, modelo LIBS 2500 plus: (1) fonte de energia; (2) laser; (3) câmara de ablação; (4) conjunto de espectrômetros.

Fonte: SILVA et al.(80)

O sistema é equipado com um laser de Nd:YAG pulsado (Q-switched) emitindo em 1064 nm com energia máxima do pulso de 75 mJ, duração de pulso de 8 ns, tempo de integração de 2,1 ms, diâmetro do feixe do laser (laser spot) em torno de 0,5 mm, taxa de repetição de até 500 Hz; detector CCD (charge-coupled device) de 14336 pixels; sete espectrômetros cobrindo a faixa espectral de 188-980 nm e com resolução ótica em torno de 0,1 nm. O tempo de delay (relativo ao delay Qswitch) e o tempo de integração usado foi de 10 μ s e 2 ms respectivamente. A distância fixada entre a lente que coleta a radiação e o plasma formado pela mostra foi de aproximadamente 1 cm. Para cada amostra foram feitas 60 medidas, cada uma dessas em área diferente da pastilha, com 1 tiro de limpeza e 2 tiros para obtenção de média do espectro.

5 Resultados e Discussão

5.1 Análise Elementar (CHNS)

O método analítico de combustão a seco (Análise Elementar) tem sido bastante usado em estudos de determinação de carbono do solo, sendo considerado como método padrão de referência. Sua combustão atinge temperatura de aproximadamente 925 °C oxidando todo o carbono das amostras, tanto as formas orgânicas quanto as inorgânicas. Abaixo temos a porcentagem de carbono total do solo nos tratamentos de CBC e torta de filtro (tabela 3).

Tabela 3 — Porcentagem de carbono total do solo nos tratamentos de CBC e torta de filtro obtidos por Análise Elementar.

Tratamento	Profundidade	C total do solo
(t/ha)	(cm)	(%)
CBC – 0	0-10	1,60 ± 0,02 a
	10-20	1,44 ± 0,01 a
CBC – 5	0-10	1,56 ± 0,02 a
	10-20	1,63 ± 0,02 a
CBC – 10	0-10	1,70 ± 0,03 a
	10-20	1,64 ± 0,01 a
CBC – 20	0-10	1,86 ± 0,05 b
	10-20	1,77 ± 0,06 a
CBC – 40	0-10	2,37 ± 0,04 b
	10-20	1,94 ± 0,02 a
TORTA – 0	0-10	1,50 ± 0,09 aa
	10-20	1,5 ± 0,1 aa
TORTA – 5	0-10	1,47 ± 0,05 aa
	10-20	1,45 ± 0,06 aa
TORTA – 10	0-10	1,67 ± 0,08 aa
	10-20	1,6 ± 0,1 aa
TORTA – 20	0-10	1,48 ± 0,05 aa
	10-20	1,52 ± 0,05 aa

continua

continuação

Tabela 3 — Porcentagem de carbono, relação C/N total do solo nos tratamentos de CBC e torta de filtro obtidos por Análise Elementar.

Tratamento (t/ha)	Profundidade (cm)	C total do solo (%)
TORTA – 40	0-10	1,89 ± 0,04 bb
	10-20	1,6 ± 0,1 aa

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Fonte: Elaborada pela autora

Com base na tabela 3 temos incorporação de carbono total no solo na dose 40 t/ha e 20 t/ha em relação a 0 M t/ha na profundidade de 0 a 10 cm na CBC. Na torta de filtro as dose 0 e 40 t/ha tem médias distintas estatisticamente, mas apresentam menor incorporação de carbono em relação a CBC.

Utilizando a seguinte equação para a estimativa de estoque de carbono no solo:

$$\text{Estoque} = \% C \times d \times \text{espessura} \quad (5.1.1)$$

com d sendo a densidade do solo descrita em cada profundidade segundo Bega (9). O cálculo de estoque para a CBC na profundidade de 0 a 10 cm, com a dose 20 e 40 t/ha menos 0 t/ha:

$$E^{40(0-10)} - E^{0(0-10)} = (0,13 \pm 0,05) g \text{ cm}^{-2}. \quad (5.1. 2)$$

$$E^{20(0-10)} - E^{0(0-10)} = (0,03 \pm 0,05) g \text{ cm}^{-2}. \quad (5.1. 3)$$

A massa de carbono total da CBC *in natura* adicionado no solo é de:

$$C = \% C \times m_{CBC} = 0,08 g \text{ cm}^{-2} \quad (5.1.4)$$

com $\% C = 19 \%$ e $m_{CBC} = 40 \text{ t/ha}$

Através dessa estimativa encontramos que o solo no tratamento de 40 t/ha tem potencial de estoque de C, já que incorporou o C da CBC *in natura*, e parece estimular o

aumento de C no solo. Fazendo este mesmo cálculo para a torta de filtro da dosagem 0 para 40 t/ha em 0 a 10 cm temos o estoque igual a zero (equação 5.1.5).

$$E^{40(0-10)} - E^{0(0-10)} = (0,1 \pm 0,1) g\ cm^{-2} \quad (5.1.6),$$

A composição química da torta de filtro é variável, de acordo com Bernardino (12) temos % C = 22,5 % , para Rocha (69) % C = 29,4 % , considerando uma média destes valores, a massa de carbono total da torta *in natura* adicionado no solo é de:

$$C = \% C \times m_T = 0,1\ g\ cm^{-2} \quad (5.1.7)$$

com % C = 26 % e $m_T = 40\ t/ha$.

Nessa estimativa não temos incorporação de C no solo na torta, segundo Rocha (69) a baixa relação C/N da torta *in natura* (17,4) produz alta taxa de mineralização desta. Com base nas respostas das demais técnicas poderemos entender melhor a dinâmica da torta de filtro e CBC quanto à incorporação de carbono no solo.

5.2 Espectroscopia de Absorção de Radiação no UV-Vis

Um espectro típico de absorção de radiação no UV-Vis na região de 200 a 800 nm dos AH extraídos dos solos estudados são apresentados na figura 36.

Figura 36 - Espectro típico de absorção de radiação no UV-Vis obtidos para os AH do solo (concentração 20 mg L⁻¹, pH 8,0).

Fonte: Elaborada pela autora.

A banda em 203 nm é característica de carbonilas (aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres). Na figura 36 observamos um ombro de absorção centrado na região de 270 nm que é atribuído as estruturas do tipo quinonas (34). Na figura 37 apresentamos a relação E_4/E_6 do AH, lembrando que este tem relação inversa com o grau de condensação da MOS.

Figura 37 - Razão E_4/E_6 do AH extraído do solo com tratamento de a) CBC e b) torta de filtro nas doses de 0 a 40 $M\ ha^{-1}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

A incorporação de CBC produz diminuição do índice, portanto o grau de condensação do AH tende a aumentar com as doses. Na torta de filtro não é possível diferenciar o efeito da adição de torta para E_4/E_6 . Como já mencionado, o índice E_4/E_6 é bem controverso e por isso é necessário verificar os resultados obtidos para a humificação do AH do solo nas demais técnicas.

5.3 Espectroscopia de Fluorescência de Luz UV-Vis

A espectroscopia de fluorescência tornou-se popularmente conhecida como uma técnica simples, útil e sensível no estudo de grupos funcionais e de estrutura química de amostras do meio ambiente, tais como, o AH de solos. A espectroscopia de fluorescência uv-visível tem sido amplamente utilizada na determinação do grau de humificação dos AH, os espectros de fluorescência das SH são constituídos pela soma dos espectros dos diferentes tipos de fluoróforos presentes, como consequência da complexidade molecular e heterogeneidade das mesmas.

5.3.1 Espectro de Emissão

Os espectros de emissão para os AH foram medidos com excitação em 240 nm. Através dos espectros calculou-se o grau de humificação das amostras usando a metodologia proposta por Zsolnay et al. (94) Um espectro típico de emissão dos AH obtidos com excitação em 240 nm (ultravioleta) é mostrado na figura 38.

Figura 38 – Espectro típico de emissão de fluorescência obtido para amostra de AH do solo (concentração 10 mg L⁻¹, pH 8,0) com comprimento de onda de excitação (λ_{ex} = 240 nm).

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro apresenta uma banda larga, cujo máximo de intensidade ocorre próximo a 500 nm. A fluorescência de AH em comprimentos de onda longos, como neste caso, é associada a sistemas insaturados conjugados (hidrocarbonetos aromáticos condensados tipo tetraceno, de estrutura cíclica, de estrutura linear ou perileno), e/ou núcleos aromáticos altamente substituídos por grupos carbonila (C=O) e carboxílicos (COOH) (44,78).

Para obtenção do índice A_4/A_1 o espectro de emissão total foi dividido em 4 partes e o grau de humificação foi calculado através da razão entre as áreas do último quarto (500-600 nm) e primeiro quarto (350-430 nm). A área do último quarto corresponde à fluorescência de estruturas mais humificadas e a área do primeiro quarto seriam oriundas de estruturas mais simples. A figura 39 mostra o índice de humificação $\frac{A_4}{A_1}$ para os tratamentos estudados.

Figura 39 - Índice A_4/A_1 do AH extraído do solo com tratamento de a) CBC e b) torta de filtro em diferentes doses.

Fonte: Elaborada pela autora.

No tratamento de CBC não vemos variação relevante do índice A_4/A_1 . A adição de CBC aumentou o carbono no solo, mas não alterou o AH nesta análise. Na torta de filtro (figura 39b) de 0-10 cm o índice apresenta aumento com a dose de 20 t/ha (31%).

5.3.2 Espectros de Varredura Sincronizada

A figura 40 apresenta os espectros de varredura sincronizada dos AH com $\Delta\lambda = 55$ nm. Apesar dos espectros apresentarem bandas largas, a banda de 440 a 480 nm é característica de compostos aromáticos policondensados ou aromáticos ligados a grupos funcionais do tipo hidroxil e metoxil (20). O pico em torno de 370 nm é mais característico de fluoróforos mais simples, com baixo nível de policondensação aromática e poucos cromóforos conjugados.

Figura 40 – Espectro típico de varredura sincronizada de fluorescência obtidos para os AH (amostra diluída, pH 8,0) do solo sob com comprimento de onda de emissão e excitação $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 55$.

Fonte: Elaborada pela autora.

A região do espectro com comprimentos de onda mais longos é associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados, ou sistemas insaturados conjugados com elétrons bastante deslocalizados. A região de menor comprimento de onda é associada a compostos mais simples. Utilizaremos a razão entre a intensidade de fluorescência em 449 e 375 nm nos tratamentos para o índice de humificação segundo Kalbitz et al. (36) (figura 41).

Figura 41 - Índice de humificação dos AH extraídos do solo nas profundidades de 0-10 e 10-20 cm no tratamento de CBC (a) e torta de filtro (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando variações nos índices de humificação por volta de 10%, não houve variação para a CBC no índice I_{449}/I_{376} .

Na torta de filtro de 0-10 cm (figura 41b) também vemos aparente aumento do índice de humificação com a dose (22% em 20 t/ha), e no solo de profundidade 10 a 20 cm o índice I_{449}/I_{376} não varia consideravelmente.

5.3.3 Espectros Tridimensionais de Fluorescência – Matriz Emissão – Excitação (MEE)

Os espectros de fluorescência tridimensionais no modo MEE (apresentados como curvas de nível) dos AH estão representados nas figuras 42-43. Podemos notar nos espectros a presença de duas faixas de luz branca, eles acontecem devido ao espalhamento da luz pela amostra, espalhamento Rayleigh e bandas de difração de segunda ordem geradas pela grade de difração.

Figura 42 - Espectros de intensidade de fluorescência total no modo MEE (ou curvas de nível) obtidos para as amostras de AH (concentração 10 mg L⁻¹, pH 8,0) do solo com diferentes dosagens de CBC na profundidade de 0-10

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 43 - Espectros de intensidade de fluorescência total no modo MEE (ou curvas de nível) obtidos para as amostras de AH (concentração 10 mg L⁻¹, pH 8,0) do solo com diferentes dosagens de CBC na profundidade de 10-20 cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os principais picos observados nos MEEs são apresentados na tabela 1 (Fundamentos Teóricos). Ao analisar a tabela observando a localização dos picos, é possível ver a presença de três regiões características de fluorescência: o Pico A ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 250/450 nm), o Pico C ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 350/450 nm) e os tipos ácidos húmicos ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 260-380/>500 nm) e ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 450-500/>500 nm) (21). Nos tipos ácidos húmicos a excitação mais longa (em torno de 500 nm) pode ser proveniente da emissão de fluoróforos formados por anéis aromáticos condensados e/ou conjugação de anéis aromáticos simples, e a excitação em comprimento mais curto (em torno de 310 nm) pode ser interpretada principalmente pela presença de anéis aromáticos com estruturas mais simples.

No tratamento de CBC temos a presença do pico A, relacionada a ácidos húmicos mais simples. Vê-se que a adição de CBC não modifica o fluoróforo presente no solo. Nas figuras 44-45 apresentamos os espectros de MEE dos ácidos húmicos do solo nos tratamentos de torta. Os espectros não mostram mudança estrutural do AH.

Figura 44 - Espectros de intensidade de fluorescência total no modo MEE (ou curvas de nível) obtidos para as amostras de AH (concentração 10 mg L⁻¹, pH 8,0) do solo com diferentes dosagens de torta na profundidade de 0-10 cm.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 45 - Espectros de intensidade de fluorescência total no modo MEE (ou curvas de nível) obtidos para as amostras de AH (concentração 10 mg L⁻¹, pH 8,0) do solo com diferentes dosagens de CBC na profundidade de 10-20 cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise quantitativa dos dados espectrais de fluorescência MEE pode ser melhor explorada através da aplicação de PARAFAC (3, 85). Com o emprego deste método, foi possível identificar a contribuição das intensidades de dois fluoróforos (figura 46) nos tratamentos de CBC e torta, com diagnóstico de consistência do tensor núcleo (CORCONDIA) de 98,4%.

Figura 46 - Fluoróforos 1 e 2 obtidos pelo método PARAFAC e utilizando os espectros de fluorescência tridimensional (MEE) dos AH extraídos e diluídos, do solo sob tratamento de CBC e torta

Fonte: Elaborada pela autora.

O fluoróforo 1 (250-450 nm) é um componente relacionado a estruturas menos complexas do AH, o fluoróforo 2 é relacionado a estruturas mais complexas do AH (21).

Figura 47 - Contribuição da fluorescência dos fluoróforos 1 e 2, dos AH extraídos do solo sob tratamento de CBC na profundidade 0-10 e 10-20 cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os fluoróforos menos complexos (fluoróforo 1) e mais complexos (fluoróforo 2) aumentam e diminuem com a incorporação de CBC, não sendo possível determinar um comportamento linear entre a adição de destes resíduos com a humificação do AH. Vemos predominância do fluoróforo de estrutura mais simples no AH. E o mesmo se dá com a torta de filtro (figura 48).

Figura 48 - Contribuição da fluorescência dos fluoróforos 1 e 2, dos AH extraídos do solo sob tratamento de torta de filtro na profundidade 0-10 e 10-20 cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises de PARAFAC vieram a confirmar o comportamento observado nas outras técnicas, onde não se observou variação significativa da humificação do AH com a adição de resíduos de torta e CBC no solo. Porém, tivemos contribuições qualitativas das técnicas quanto à presença dos fluoróforos, o PARAFAC observou a presença de um fluoróforo mais complexo no AH que estava em menor quantidade no AH (relação C_1/C_2), que não foi observado na fluorescência de MEE.

5.3.4 Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL)

A espectroscopia de FIL foi aplicada as amostras de solo inteiro, sem tratamento químico prévio, para avaliar o grau de humificação da MOS (H_{FIL}). O índice de humificação H_{FIL} foi obtido através do cálculo da razão entre o valor da área sob o espectro de emissão de fluorescência com excitação em 405 nm (ACF) e o valor da porcentagem de carbono total

(CT) presente na amostra de solo inteiro: $H_{FIL} = \frac{ACF}{CT}$. Na figura 49 temos espectro típico FIL do solo e na figura 50 o índice H_{FIL} nos tratamentos.

Figura 49 - Espectro típico FIL de emissão do solo inteiro com excitação em 405 nm.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 50 - Grau de Humificação H_{FIL} do solo sob tratamento de a) CBC e b) torta de filtro, em 0-10 e 10-20 cm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Vemos na CBC uma tendência de redução do índice de humificação da MOS com incorporação do resíduo, há diferença estatística para o solo em ambas profundidades nas doses 0 e 20 t/ha e 0 e 40 t/ha, com nível de significância de 0,1 segundo o teste Tukey. Para a torta de filtro não foi possível observar mudança no índice H_{FIL} . As amostras de solo são

compostas de repetições de quatro áreas distintas de TFSA, por esta razão o desvio médio das medidas é alto.

Em Bega et al. (9) estudando estas mesmas amostras a cinza do bagaço aplicada em cobertura no solo na linha da cultura se tem um aumento de 18 % na produtividade da cultura, porém o coeficiente de variação (CV) é muito alto. É possível que a CBC induziu efeitos positivos no solo estimulando o desenvolvimento da planta, aumentando o fresco no solo C e por isso é visto diminuição do sinal de fluorescência do solo inteiro medido pelo índice H_{FIL} .

Campos (16) também reportou o índice em H_{FIL} decaindo com a adição crescente de CBC em solos com diferentes texturas, com solos mais arenosos sofrendo maior mudança e mais argilosos menos. Alguns trabalhos com emissão de CO_2 tem apontado para o crescimento da atividade microbológica do solo devido a CBC e tem relacionado isso a questão do aumento do pH do solo devido a CBC (16; 56). Estudos com biocarvão tem indicado que a emissão de CO_2 de um solo arenoso é preferencialmente dado pelo biocarvão, concluindo que o carbono pirogênico reduz a decomposição da MOS, efeito *priming* negativo (91, 68, 93).

Nas análises de aromaticidade o AH do solo apresenta variação negativa de 0 a 20 t/ha e cresce de 0 a 40 t/ha. De La Rosa et al. (23) encontraram maior aromaticidade no solo sob adição de CBC, também maior germinação e produtividade do solo baseado em medidas de RMN do solo todo. Este resultado de aumento da aromaticidade do solo não discorda do encontrado no FIL, já que nosso equipamento não detecta a fluorescência da CBC *in natura*, mas sim da matriz do solo, fato devido a forte reflexão do sinal por causa da estrutura gráfica da CBC com alta aromaticidade (89% no RMN).

Em Rocha (69) no tratamento de torta de 35 t/ha aplicada no sulco de plantio, em seis meses 78,2% de C da torta foi contabilizado como incorporação no solo ou dissipado para a atmosfera. Como a razão de decomposição depende de temperatura, umidade e sazonalidade espera-se que na superfície a torta se decomponha mais rápido fazendo com que o solo apresente baixo potencial de estoque C. Nossos resultados apontam que a humificação do AH do solo não sofre alteração com o tratamento de CBC ou torta de filtro.

5.5 Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de ^{13}C RMN foram realizados em laboratório a fim de se obter informações sobre a composição de grupos funcionais da CBC *in natura* (figura 51) e dos AH extraídos dos solos de 0 a 10 cm sob os tratamentos de CBC e torta de filtro nas doses de 0, 20 e 40 t/ha .

Figura 51 - Espectro de ^{13}C RMN da cinza de bagaço de cana *in natura*.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar que a CBC praticamente só tem uma banda de ^{13}C RMN na região dos grupos aromáticos, como iremos observar na tabela de aromaticidade e alifaticidade (tabela 4).

Figura 52 Espectro de ^{13}C RMN do AH do solo na profundidade de 0 a 10 cm sob tratamento de a) CBC 0 t/ha, b) CBC 20 t/ha, c) CBC 40 t/ha, d) torta 0 t/ha, e) torta 20 t/ha e f) torta 40 t/ha.

Fonte: Elaborada pela autora.

As medidas de ^{13}C RMN VACP/MAS mostraram que os AH como um todo são bastante alifáticos em relação ao conteúdo de aromático. Os espectros do AH vistos na figura 52 são bem semelhantes entre si para o mesmo tratamento de solo.

Tabela 4 — Porcentagem de aromaticidade e alifaticidade das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS de amostras de AH.

Tratamentos	Aromaticidade (%)	Alifaticidade (%)
CBC (<i>in natura</i>)	89	11
CBC-0⁽⁰⁻¹⁰⁾	26,2	73,8
CBC-20⁽⁰⁻¹⁰⁾	25,8	74,2
CBC-40⁽⁰⁻¹⁰⁾	27,7	72,3
Torta-0⁽⁰⁻¹⁰⁾	24,2	75,8
Torta-20⁽⁰⁻¹⁰⁾	29,8	70,1
Torta-40⁽⁰⁻¹⁰⁾	23,7	76,3

Fonte: Elaborada pela autora

A CBC *in natura* é bastante aromática (89%) e pouco alifática (11%), e os AH como um todo são bastante alifáticos. Os percentuais de aromaticidade e alifaticidade indicam que o conteúdo de aromáticos não varia consideravelmente com a adição de CBC no solo. Porém na torta de filtro temos a adição de 20 t/ha com 23% de aromaticidade, o que não acontece em 40 t/ha.

Na tabela 5 temos os percentuais dos grupos funcionais associados às bandas correspondentes de amostras sólidas de AH medidas no RMN com VACP/MAS: grupos alifáticos (0 – 45 ppm), N-alifáticos e metoxílicos (45 – 60 ppm), O-alifáticos (60 – 110 ppm), aromáticos (110 – 140 ppm), O-aromáticos (140 – 160 ppm), carboxílicos (160 – 185 ppm) e carbonílicos (185 – 230 ppm).

Tabela 5 — Intensidades relativas (porcentagem da área total) das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS de amostras sólidas de AH.

Tratamento	0-45	45-60	60-110	110-140	140-160	160-185	185-230
CBC (<i>in natura</i>)	2	2	10	85	8	3	7
CBC-0⁽⁰⁻¹⁰⁾	32,7	10,8	19,0	15,2	7,0	10,9	4,4
CBC-20⁽⁰⁻¹⁰⁾	31,8	11,3	19,7	15,3	6,5	10,5	4,9
CBC-40⁽⁰⁻¹⁰⁾	26,8	10,4	21,4	15,0	7,5	11,3	7,7
Torta-0⁽⁰⁻¹⁰⁾	36,8	11,4	19,8	13,9	5,1	9,6	3,4
Torta-20⁽⁰⁻¹⁰⁾	29,5	11,0	21,4	19,8	6,6	10,2	1,6
Torta-40⁽⁰⁻¹⁰⁾	30,1	12,4	25,8	15,8	5,4	8,4	2,1

Fonte: Elaborada pela autora

Com a adição de CBC vemos a diminuição dos grupos alifáticos (18%) e aumento considerável dos grupos carbonílicos (75%), grupo que pode promover o aumento das interações intermoleculares do AH, favorecendo por exemplo a complexação com metais.

Com adição de torta de filtro observamos diminuição dos grupos alifáticos (18%), aumento dos grupos O-alifáticos (30%), carbonílicos (38%) aromáticos (42% e 14%) e O-aromáticos 29% em 20 t/ha. A dose 20 t/ha parece mostrar um resultado atípico. Como vimos na tabela 4 a torta não teve aumento na aromaticidade, mas temos o aumento de grupos carbonílicos relacionado ao aumento das interações intermoleculares do AH.

O custo operacional de se fazer repetidas extrações químicas do solo é um fator limitante quando trabalhamos com frações da MOS, por isso desconsideramos variações de até 10% nas medidas.

5.6 Espectroscopia de Emissão Ótica com Plasma Induzida por Laser (LIBS)

LIBS é uma técnica espectroanalítica, e a identificação dos átomos presentes na amostra se dá pela identificação das linhas de emissão, que já são bem conhecidas, e a quantificação relativa da concentração das espécies ocorre pela determinação da intensidade das linhas de emissão. Para determinar o valor médio de carbono no solo para cada amostra medimos sessenta espectros, tudo isso para amenizar os problemas de heterogeneidade do solo e a variação do plasma produzido a cada ablação do laser na amostra. O espectro gerado

pela emissão das espécies excitadas é analisado nas regiões UV-VIS, na figura 53 é apresentado um espectro típico LIBS do solo:

Figura 53 - Espectro típico de LIBS do solo sem correção do offset.

Fonte: Elaborada pela autora.

No solo há três linhas de carbono (193,03; 247,86; 658,79 nm). A linha de C em 247,86 nm sofre interferência pela linha atômica de Fe em 247,94 nm, e a linha de C em 193,03 nm tem interferência por três linhas de Al em 193,04 nm (iônica), 193,16 nm (atômica) e 193,58 nm (atômica), não separáveis nos sistemas LIBS de baixa resolução ($\sim 0,1$ nm). É importante enfatizar que o Fe é geralmente encontrado em solos brasileiros (8, 53), e a sua interferência na linha de carbono em 247,86 nm é relevante e, impede a sua utilização em modelos univariados para a quantificação de carbono no solo (22).

Através da intensidade da linha 193,03 nm podemos fazer um estudo comparativo entre materiais quanto à quantidade de carbono, não interferida pelo elemento Fe e com boa intensidade, considerando a influência do alumínio nesta linha.

Realizamos a correção do pico de carbono (193,03 nm) através do ajuste com os dois picos AlIII e AlII, utilizando Nicolodelli et al. (54). O valor do parâmetro α_2 do melhor ajuste linear para o melhor coeficiente de Person no tratamento de CBC e torta foi de $\alpha_2 = 1,2 \pm 0,1$, o que concordou com o valor de α_2 encontrado em (50).

Depois de corrigir a interferência do Al nas áreas de C utilizamos 1/4 das amostras para gerar um modelo de calibração para comprarmos as medidas de C obtidas pelo LIBS e CHNS. A relação entre a área do LIBS e a concentração de carbono pelo CHNS é mostrada na figura 54.

Figura 54 - Correlação e geração da curva de calibração utilizando os teores de carbono de referência (CHNS) e as áreas dos picos de C corrigidas (sem interferência do Al) medidas no LIBS, para os tratamentos de a) CBC e b) torta.

Fonte: Elaborada pela autora.

A concentração de carbono predita pela técnica LIBS para as demais amostras, é vista na figura 55 que apresenta a comparação da concentração predita pelo LIBS com o valor obtido pelo CHNS e o coeficiente de correlação de Pearson (ρ). Os resultados indicam uma forte correlação entre as técnicas ($\rho = 0,99$ para a CBC e $\rho = 0,96$ para a torta).

Figura 55 - Correlação entre os teores de carbono de referência (CHNS) e os preditos por LIBS do solo tratamentos de a) CBC e b) torta.

Fonte: Elaborada pela autora

Os solos com adição de CBC e dosagem de 40 t/ha na profundidade de 0 a 10 cm foram os que tiveram os melhores resultados de carbono no solo, com diferença estatística nas médias de C em relação a dose 0. Na torta não houve diferença estatística relevante para o C

médio. Embora uma incerteza média de predição da ordem 19% e 34% na CBC e torta respectivamente sejam observados, o método LIBS é uma interessante alternativa para determinação do carbono total em amostras de solos.

6 Conclusão

No tratamento de um ano de adição de cinza de bagaço de cana no solo aplicado em cobertura na cultura, tivemos potencial de estoque de carbono da dose 0 para 40 t/ha. Quanto a matéria orgânica do solo, na fração ácido húmico nós não observamos modificação do grau de humificação com o tratamento de CBC, mas houve um aumento de grupos carbonílicos, que estão associados ao aumento das interações intermoleculares favorecendo por exemplo a complexação do ácido húmico com metais. Nossos resultados apontam que solo pode ter tido melhora nas condições de crescimento da cultura, aumentando o C mais lábil.

Quanto à torta de filtro aplicada na entrelinha da cultura, se registrou menor aumento de carbono em relação a cinza, possivelmente muito da torta foi volatilizado para a atmosfera, o que pode contabilizar para a emissão de CO₂ no efeito estufa. Também não observamos impacto na matéria orgânica do solo com a incorporação de torta apesar deste ser um produto rico em matéria orgânica. Neste contexto, concluímos que não houve impacto negativo ao estoque de carbono e qualidade da matéria orgânica do solo sob tratamento de adição de cinza de bagaço de cana e torta de filtro.

Em relação aos tratamentos, a técnica de fluorescência induzida por laser obteve resultados que auxiliaram muito na interpretação do estudo. Isso porque observamos a MOS de uma forma total, onde outras frações da MO puderam ser verificadas, não exclusivamente o ácido húmico. Tais resultados apontam que a principal vantagem da espectroscopia de FIL é, permitir estudar a MOS o mais próximo possível de suas condições naturais, além das vantagens quanto a ser uma análise rápida, sem a necessidade do uso de extração química, e com portabilidade para ser levada a campo. Também o método LIBS se mostrou uma interessante alternativa para determinação do carbono total em amostras de solos.

REFERÊNCIAS

- 1 APPLIED photonics ltda. Disponível em: <www.appliedphotonics.co.uk>. Acesso em: 30 mar. 2015.
- 2 APPLIED spectra. Disponível em: <<http://appliedspectra.com/technology/LIBS.html>> . Acesso em: 30 mar. 2015.
- 3 ANDERSEN, C.M.; BRO, R. Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation–emission data. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 4, p. 200–215, 2003.
- 4 ANDRIESSE, J. P. **Monitoring project of nutrient cycling in soils used for shifting cultivation under various climatic conditions in Asia**. 3rd ed. Amsterdam: Royal Tropical Institute, 1987. p. 141. Text research report.
- 5 ANGUISSOLA, S.; SILVA, S.; BOTTESCHI, G. Effect of fly ash on the availability of Zn, Cu, Ni and Cd to chicory. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.72, n. 2, p. 159–163, 1999.
- 6 ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-química**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 600 p.
- 7 BALDOCK, J. A.; SMERNIK, R. J. Chemical composition and bioavailability of thermally altered *Pinus resinosa* (Red pine) wood. **Organic Geochemistry**, v. 33, n. 1, p. 93-109, 2002.
- 8 BARFORD, C. C.; WOFSY, S. C.; GOULDEN, M. L.; MUNGER, J. W.; PYLE, E. H. URBANSKI, S. P.; HUTYRA, L.; SALESKA, S. R.; FITZJARRALD, D.; MOORE, K. Factors controlling long- and short-term sequestration of atmospheric CO₂ in a mid-latitude forest. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1688–1691, 2001.
- 9 BEGA, R. M.; CORÁ, J. E.; TOLFO, A. L. T.; DA SILVA, L. J. L.; GATTI, J. H. Atributos químicos do solo em decorrência da aplicação de cinza de bagaço de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 34., 2013, Florianópolis . **Anais ...** Florianópolis: CBCS, 2013.
- 10 BEGA, R. M.; CORÁ, J. E.; TOLFO, A. L. T.; DA SILVA, RIBEIRO, O.; MUNHOZ, G. F. L.G. Parâmetros tecnológicos e produtividade de cana-de-açúcar em decorrência da aplicação de cinza de bagaço de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 34., 2013, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CBCS, 2013.
- 11 BELKOV, M. V.; BURAKOV, V. S.; DE GIACOMO, A.; KIRIS, V. V.; RAIKOV, S. N.; TARASENKO, N. V. Comparison of two laser-induced breakdown spectroscopy techniques for total carbon measurement in soils. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, v. 34, n. 9, p. 899-904, 2009.
- 12 BERNARDINO, C. A. R. **Obtenção do carvão de pirólise a partir da torta de filtro proveniente de usinas sucroalcooleiras**. 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Alberto Luis COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

13 BLAIR, N. Impact of cultivation and sugarcane green trash management on carbon fractions and aggregate stability for a Chromic Luvisol in Queensland, Australia. **Soil Tillage Research**, v. 55, p. 183-191, 2000.

14 BORISOVER, M.; LAOR, Y.; PARPAROV, A.; BUKHANOVSKY, N.; LADO, M. Spatial and seasonal patterns of fluorescent organic matter in Lake Kinneret (Sea of Galilee) and its catchment basin. **Water Research**, v. 43, n. 12, p. 3104–3116, 2009.

15 CAMARGO, O.A.; BERTON, R.S.; GERALDI, R. N.; VALADARES, J. M. A. S. Alterações de características químicas em um latossolo roxo distrófico incubado com resíduo da indústria álcool açucareira. **Bragantia**, v. 43, n. 1, p. 125-139, 1984.

16 CAMPOS, L. **Efeito da aplicação de cinza de bagaço de cana-de-açúcar nos atributos químicos, biológicos e nos compartimentos da matéria orgânica do solo**. 2014. 109 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

17 CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. **Humosfera**: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes: UENF, 2005.

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

19 CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. **Journal of Soil Science Society American**, v. 41, n. 2, p. 352-358, 1977.

20 CHEN, J.; GU, B.; ROYER, R. A.; BURGOS, W. D. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric ion. **Science Total Environment**, v. 307, n. 1-3, p. 167-178, 2003.

21 COBLE, P.G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation – emission matrix spectroscopy. **Marine Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 325-346, 1996.

22 CREMERS, D. A.; EBINGER, M. H.; BRESHEARS, D. D.; UNKEFER, P. J.; KAMMERDIENER, S. A.; FERRIS, M. J.; CATLETT, K. M.; BROWN, J. R. Measuring total soil carbon with laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 6, p. 2202-2206, 2001.

23 DE LA ROSA, J. M.; PANEQUE, M.; VELASCO-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; MILLER, H.; KNICKER, H. Biochar induced alterations of soil properties and its organic matter; discerning how it improves crop production. In: THE MEETING OF THE INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY, 17., 2014, Ioannina. **Abstracts...** Ioannina: University of Ioannina, 2014.

24 DEON, D. S. **Mudança de uso da terra e impacto na matéria orgânica do solo em dois locais no leste da Amazônia**. 2013. 154 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

- 25 DIAZ, D., HAHN, D. W.; MOLINAT, A. Evaluation of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) as a measurement technique for evaluation of total elemental concentration in soils. **Applied Spectroscopy**, v. 66, n. 1, p. 99-106, 2012.
- 26 DIECKOW, J.; BAYER, A. C.; CONCEIÇÃO, P. C.; ZANATTA, J. A.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P.; SALTON, J. C.; MACEDO, M. M.; MIELNICZUK, J.; HERNANI, L. C. Land use, tillage, texture and organic matter stock and composition in tropical and subtropical Brazilian soils. **European Journal of Soil Science**, v. 60, n. 2, p. 240-249, 2009.
- 27 DIERICKX, W. R. Soil Physics. 2007. Disponível em:
< <http://www.eolss.net/ebooks/Sample%20Chapters/C19/E1-05-07-05.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2015.
- 28 EMBRAPA soja. Tecnologias de produção de soja região central do Brasil. 2003. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/manejo.htm>>. Acesso em: 16 mar. 2015.
- 29 EMBRAPA solos. Atributos diagnósticos. 2007. Disponível em:
<<http://hotsites.cnps.embrapa.br/blogs/sibcs/wp-content/uploads/2007/03/atributos-diagnosticos-2ed.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2015.
- 30 FERREIRA, E. P. B.; FAGERIA, N. K.; DIDONET, A. D. Propriedades químicas de um Latossolo sob manejo orgânico influenciado pela aplicação de cinzas de bagaço de cana. **Revista Ciência Agronômica**. v. 43, n. 2, p. 228-236, 2012.
- 31 FONTAINE, S.; BAROT, S.; BARRÉ, P.; BDIQUI, N.; MARRY, B.; RUMPEL, C. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. **Nature**. v. 450, n. 8, p. 277- 280, 2007.
- 32 GALDOS, M. V.; CERRI, C. C.; CERRI, C. E. P. Soil carbon stocks under burned and unburned sugarcane in Brazil. **Geoderma**. v. 153, n. 3-4, p. 347-352, 2009.
- 33 GEORGIA state university. Interaction of radiation with the matter. Disponível em:
< <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/mod3.html>> . Acessado em: 30 mar. 2015.
- 34 GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MILORI, D. M. B. P.; COLNAGO, L. A.; MARTIN-NETO, L.; MELO, W. J. A laser-induced fluorescence spectroscopic study of organic matter in a Brazilian oxisol under different tillage systems. **Geoderma**, v. 138, n. 1-2, p. 20-24, 2007.
- 35 GRAHAM, M. H.; HAYNES, R. J.; MEYER, J. H. Soil organic matter content and quality: effects of fertilizer applications, burning and trash retention on a long-term sugarcane experiment in South Africa. **Soil Biology Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 93-102, 2002.
- 36 KALBITZ, K.; GEYER, W.; GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances – a reflection of land use history in a fen area. **Biogeochemistry**, v. 47, n. 2, p. 219-238, 1999.

- 37 KNICKER, H.; ALMENDROS, G.; GONZÁLES-VILLA, F. J.; MARTIN, F.; LUDERMANN, H. D. ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopic examination of the transformation of organic nitrogen in plant biomass during thermal treatment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 8, p. 1053-1060, 1996.
- 38 KONONOVA M.M. **Soil organic matter**. London: Pergamon Press, 1996.
- 39 KUZUYAKOV, Y.; FRIEDEL, J. K.; STAHR, K. Review of mechanisms and quantification of priming effects. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 32, n. 11-12, p. 1485-1498, 2000.
- 40 LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science**, v.304, n. 5677, p. 1623-1627 p. 2004.
- 41 LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. 698 p.
- 42 LEPSCH, I.F. **Formação e conservação dos solos**. São Paulo: Oficina de Textos, 2002. 178p.
- 43 LUCIANI, X.; MOUNIER, S.; REDON, R.; BOIS, A. A simple correction method of inner filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 96, n. 2, p. 227-238, 2009.
- 44 LUMB, M. D. **Luminescence spectroscopy**. New York: Academic Press, 1978.
- 45 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.
- 46 MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. **Química e mineralogia do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p. 601. v. 2
- 47 METZ, B.; DAVIDSON, O. R.; BOSCH, P. R.; DAVE, R.; MEYER, L. A (Ed.). **Climate Change 2007: mitigation of climate change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_wg3_report_mitigation_of_climate_change.htm>. Acesso em: 22 maio 2011.
- 48 MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICKZUK, J.; BAGNATO, V. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, n. 11, p. 739-749, 2004.
- 49 MILORI, D. M. B. P.; GALETI, H. V. A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, n. 1, p. 57-63, 2006.
- 50 MILORI, D. M. B.P. Óptica na agricultura. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15.; ENCONTRO DE PESQUISA DA UEPG, 6., 2006. Ponta Grossa. (Palestra)

- 51 MINISTÉRIO da agricultura. Cana de açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 30 mar. 2015.
- 52 MONTES, C. R.; LUCAS, Y.; PEREIRA, O. J. R.; ACHARD, R.; GRIMALDI, M.; MELFI, A. J. Deep plant-derived carbon storage in Amazonian podzols. **Biogeosciences**, v. 8, p. 113–120, 2011.
- 53 NARDIN, R. R. **Torta de filtro aplicada em Argissolo e seus efeitos agronômicos em duas variedades de cana-de-açúcar colhidas em duas épocas**. 2007. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.
- 54 NICOLODELLI, G.; MARANGONI, B. S.; CABRAL, J. S.; VILLAS-BÔAS, P. R.; SENESI, G. S.; SANTOS, C. H.; ROMANO, R.; SEGNINI, A.; LUCAS, Y.; MONTES, C. R.; MILORI, D. M. B. P. Quantification of total carbon in soil using laser-induced breakdown spectroscopy: a method to correct interference lines. **Applied Optics**, v. 53, n. 10, p. 2170-2176, 2014.
- 55 NÓBREGA, I. P. C. **Efeitos do biochar nas propriedades físicas e químicas do solo: sequestro de carbono no solo**. 2011. 46 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.
- 56 NOVOTNY, E. H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo**. 2002. 231 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- 57 NUNES JUNIOR, D. Torta de filtro: de resíduo a produto nobre. **Revista Idea News**, v. 8, n. 92, p. 22-30, 2008.
- 58 OLIVEIRA, R. F.; FURLAN JÚNIOR, J.; TEIXEIRA, L. B. **Composição química de cinzas de caldeira da agroindústria do dendê**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006, 155 p. Comunicado técnico.
- 59 SANTOS, G.; DA SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais**. 2. ed. rev. e atual. Porto Alegre: Metropole, 2008. 654 p.
- 60 PANDEY, V. C.; SINGH, N. Impact of fly ash incorporation in soil systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 136, n. 1-2, p. 16-27, 2010.
- 61 PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. **European Journal of Soil Science**, v. 47, n. 3, p. 319-328, 1996a.
- 62 PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic acid substances induced by interaction with organic acids. **Chemosphere**, v. 33, p. 595-602, 1996b.
- 63 PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular size of humic substances: supramolecular associations versus macromolecular polymers. **Advances in Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 508-521, 2000.

- 64 PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 810-832, 2001.
- 65 PYKETT, I. L. NMR imaging in medicine. **Science American**, v. 246, n. 1, p. 78-88, 1982.
- 66 RAMAKRISHNAN, P. S. **Shifting agriculture and sustainable development: an interdisciplinary study from North-Eastern India**. New Jersey: Parthenon Publishing Group Inc., 1992. 424 p. (Man and Biosphere Series, v. 10).
- 67 RICHARD, C.; COELHO, C.; GUYOT, G.; SHALOIKO, L.; TRUBETSKOJ, O.; TRUBETSKAYA, O. Fluorescence properties of the b5 kDa molecular size fractions of a soil humic acid. **Geoderma**, v. 163, n. 1, p. 24-29, 2011.
- 68 RITTL, T. F.; NOVOTNY, E. H.; BALIEIRO, F. C.; HOFFLAND, E.; KUYPER, T. W.; ALVES, B. J. R.; RODRIGUES, A. F. Pyrogenic carbon application and native soil organic matter decomposition in a sandy soil matrix. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 10., 2013, Santo Antônio de Goiás. **Anais ... Brasília: EMBRAPA**, 2013.
- 69 ROCHA, K. **Decomposição no solo da torta de filtro derivada do processamento da cana-de-açúcar: emissão de gases do efeito estufa e aspectos microbiológicos**. 2013. 99 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- 70 SANCHEZ, P. A.; VILLACHIA, J. H.; BANDY, D. E. Soil fertility dynamics after clearing tropical rainforest in Peru. **Soil Science Society of America Journal**, v. 47, n. 6, p.1171-1178, 1983. doi:10.2136/sssaj1983.03615995004700060023x.
- 71 SANTOS, C. H. **Estudo da matéria orgânica e composição elementar de solos arenosos de regiões próximas a São Gabriel da Cachoeira no Amazonas**. 2014. 155 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- 72 SANTOS JUNIOR, D.; TARELHO, L. V. G.; KRUG, F. J.; MILORI, D. M. B. P.; MARTINETO, L.; VIEIRA JUNIOR, N. D. Espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS) – fundamentos, aplicações e perspectivas. **Revista Analytica**, v. 24, n. 1, p. 72-81, 2006.
- 73 SANTOS, G.; DA SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais**. 2. ed. rev. e atual. Porto Alegre: Metropole, 2008. 654 p.
- 74 SANTOS, D. H.; SILVA, M. A.; TIRITAN, C. S.; FOLONI, J. S. S.; ECHER, F. R. Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 10, p. 443-449, 2011.

- 75 SCHNITZER, M. Humic substances: chemistry and reactions. In: SCHNITZER; KHAN, S. U. (Ed.) **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- 76 SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, v. 80, n. 1, p. 29-30, 1993.
- 77 SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, v. 162, n. 2, p. 115-130, 1997
- 78 SENESI, N.; NOFFREDO, E. The chemistry of soil organic matter. In: SPARKS, D. L. **Soil physical chemistry**. Boca Raton: RCT, 1999. p. 242-370.
- 79 SHENG, G. P.; YU, H. Q. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. **Water Research**, v.40, n. 6, p. 1233-1239, 2006.
- 80 SILVA, R. M. **Estudo de uma metodologia para estimar a quantidade de carbono em amostras de solo utilizando espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)**. 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 81 SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.; MORRIL, T. C. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994. 387p.
- 82 SIMPSON, A. J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, n. 13, p. S72-S80, 2002.
- 83 SKJEMSTAD, J. O.; JANIK, L. J.; TAYLOR, J. A. Non-living soil organic matter: what do we know about it? **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, n. 7, p. 667-680, 1998.
- 84 SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 277p.
- 85 STEDMON, C.A.; MARKAGER, S. Behaviour of the optical properties of coloured dissolved organic matter under conservative mixing. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 57, n. 5-6, p. 973-979, 2003.
- 86 STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition, reaction**. New York: Wiley Interscience, 1994.
- 87 SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the newview. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 23, p. 9009-9015, 2005.
- 88 SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1996. p. 1011-1069. (Book Series Agronomy, 9).
- 89 TIVET, F.; SÁ, J. C. M.; LAL, R.; MILORI, D. M. B. P.; BRIEDIS, C.; LETOURMY, P.; PINEHIRO, L. A.; BORSZOWSKI, P. R.; HARTMAN, D. C. Assessing humification and

organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. **Geoderma**, v. 207-208, p. 71-81, 2013. doi:10.1016/j.geoderma.2013.05.001.

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

91 WEIWEI, L.; WEIXIN, L.; JUNHUA, Z.; YI, L.; JIAFA, L.; NANTHI, B.; ZUBIN, X. Biochar suppressed the decomposition of organic carbon in a cultivated sandy loam soil: A negative priming effect. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 76, p. 12-21, 2014.

92 WOOD, A. W. Management of crop residues following green harvesting of sugarcane in north Queensland. **Soil Tillage Research**, v. 20, n.1, p. 69-85, 1991.

93 ZIMMERMAN, A. R.; GAO, B.; AHN, M. Positiv and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1169-1179, 2011.

94 ZSOLNAY, A.; BAIGAR, E.; JIMENEZ, M.; STEINWEG, B.; SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**, v. 38, n. 1, p. 45-50, 1999.