UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CÍNTIA CARLA AVALHÃES

Avaliação da matéria orgânica de solos tratados com lodo de esgoto: uso de ferramentas quantitativas e espectroscópicas

Piracicaba
2014

CÍNTIA CARLA AVALHÃES

Avaliação da matéria orgânica de solos tratados com lodo de esgoto: uso de ferramentas quantitativas e espectroscópicas

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior

Coorientador: Dr. Wilson Tadeu Lopes da Silva

Piracicaba

2014

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Avalhães, Cíntia Carla

Avaliação da matéria orgânica de solos tratados com lodo de esgoto: uso de ferramentas quantitativas e espectroscópicas / Cíntia Carla Avalhães; orientador Cassio Hamilton Abreu Junior; coorientador Wilson Tadeu Lopes da Silva. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

94 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ácido húmico 2. Biossólidos 3. Carbono 4. Espectroscopia 5. Fluorescência 6. Latossolos I. Título

CDU 631.879.2 : 543.42

DEDICO este trabalho ao meu noivo, amigo e companheiro, Bruno, que permaneceu comigo em todos os momentos, fossem eles alegres ou tristes. Tenho muito orgulho de tê-lo ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo cuidado e carinho com que me direcionou até aqui.

Ao Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior pela oportunidade concedida.

Ao Dr. Wilson Tadeu pela generosidade, orientação e amizade. Com certeza, Wilson, você é um dos exemplos no qual procurarei me espelhar. Obrigada!

Aos colegas de pós-graduação, em especial, a Dra. Lúcia pelo apoio, amizade e conhecimento compartilhado.

Aos professores e funcionários do laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA, aos professores da ESALQ e do IQSC, em especial, ao Prof. Dr. José Lavres, Prof. Dr. Antonio Boaretto, Prof. Dr. José Leonardo e à Prof[a]. Dra. Marió pelo conhecimento transmitido e apoio ao longo do curso.

Ao CENA e à Embrapa Instrumentação pela estrutura fornecida para que a pesquisa fosse realizada, e à CAPES pelo apoio financeiro.

À Dra. Maria Diva, do Instituto de Química de São Carlos, pela disponibilidade em nos auxiliar nas atividades de laboratório.

Aos pesquisadores, técnicos de laboratório, funcionários e colegas de trabalho da Embrapa Instrumentação, em especial à Silviane, Joana, Viviane, Dr. Marcelo, Dra. Débora, Dr. Colnago, Adriana, Cléber, Camila, Márcio e todos aqueles que colaboraram para que eu concluísse este trabalho.

Ao Dr. Cristiano Alberto, à MSc. Rimena e ao amigo Victor, pelo apoio durante a execução do experimento e fornecimento do material para a pesquisa.

Aos funcionários da PG do Cena, em especial, ao amigo Fábio, pelo apoio nas horas difíceis e pelas palavras de incentivo.

À Marília, pelo amor por seu trabalho e empenho nas correções finais da tese.

Aos amigos, Fernando, Samantha, Fernanda e, em especial, à Thays, por terem compartilhado momentos tão especiais, nesses últimos 4 anos.

Por fim, a minha família amada, Diva, Cibeli e Julinha, pelo incentivo, carinho e compreensão, e ao Bruno Zancheta, pelo amor, paciência e companheirismo. Por vocês, luto a cada dia.

Muito obrigada!

RESUMO

AVALHÃES, C. C. **Avaliação da matéria orgânica de solos tratados com lodo de esgoto**: uso de ferramentas quantitativas e espectroscópicas. 2014. 94 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A reciclagem agrícola do lodo de esgoto devidamente tratado é uma boa opção, pois transforma o resíduo orgânico em um importante insumo agrícola. Entretanto, a aplicação do lodo de esgoto pode alterar a quantidade e a estabilidade da matéria orgânica do solo. Com a presente pesquisa, objetivou-se avaliar os efeitos de doses de lodo de esgoto na matéria orgânica de dois solos (um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto e um Latossolo Vermelho distroférrico sob cultivo de milho) por meio de técnicas quantitativas e espectroscópicas. O experimento I, sob cultivo de milho, foi instalado em Jaguariúna-SP, constituiu-se de 5 doses acumuladas de lodo de esgoto da ETE de Barueri, aplicadas de 1999 a 2005: 0; 30; 60; 120 e 240 t ha^{-1} (em base seca). O experimento II, sob floresta de eucalipto, foi instalado em dezembro de 2004, em área comercial da empresa da Suzano Papel e Celulose, em Angatuba – SP. Aplicou-se, uma única vez, 4 doses de lodo de esgoto da ETE de Jundiaí (0; 7,7; 15,4 e 23,1 t ha^{-1} em base seca). Nas amostras de solo foram determinados os conteúdos de carbono, por meio de análise elementar (CHN), e então, calculou-se o grau de humificação da matéria orgânica utilizando a Fluorescência Induzida por Laser (FIL). Com base nesses resultados, foram selecionadas algumas amostras para o fracionamento químico da matéria orgânica do solo e, por meio de técnicas espectroscópicas (FTIR, UV-vis, RMN e Fluorescência de UV-vis), foi realizado um estudo aprofundado da influência do lodo de esgoto nas substâncias húmicas do solo, bem como, em seu estágio de humificação. Pode-se verificar um aumento na concentração de carbono no solo com a aplicação do lodo de esgoto em ambos experimentos, bem como um aumento da alifaticidade e, conseqüentemente, diminuição da aromaticidade das substâncias húmicas, resultado da incorporação de matéria orgânica fresca, não compostada.

Palavras-chave: Biossólido. FIL. FTIR. RMN. Fluorescência. Latossolo.

ABSTRACT

AVALHÃES, C. C. **Evaluation of organic matter from soils treated with sewage sludge: use of quantitative and spectroscopic tools**. 2014. 94 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Agricultural recycling of sewage sludge treated properly is a good option, since it transforms organic waste into a major agricultural input. However, the application of sewage sludge can alter the amount and stability of soil organic matter. The present work aimed to evaluate the effects of sewage sludge levels on organic matter from two different soils (an Oxisol under eucalyptus forest and an Oxisol under corn) through quantitative and spectroscopy techniques. The experiment, under corn, was installed in Jaguariuna-SP, consisted of 5 accumulated levels of sewage sludge from ETE Barueri, implemented from 1999 to 2005: 0, 30, 60, 120 and 240 t ha^{-1}. Experiment II, in eucalyptus forest, was installed in December 2004, the commercial company Suzano Papel e Celulose, in Angatuba - SP. Applied only once, 4 doses of sewage sludge from Seawater Sewage Treatment from Jundiai (0, 7.7, 15.4 and 23.1 t ha^{-1} on a dry basis). Soil samples were determined carbon content by means of elemental analysis (CHN), and then calculated the degree of humification of organic matter using Laser Induced Fluorescence (LIF). Based on these results, we selected some samples for chemical fractionation of soil organic matter, and by means of spectroscopic techniques (FTIR, UV-vis, NMR and Fluorescence UV-vis), was conducted a detailed study of the influence of sludge sewage humic substances on the ground as well as on their stage of humification. One can observe an increase in the amount of carbon in the soil application of sewage sludge in both experiments, as well as an increase in aliphaticity and consequently decreased aromaticity of humic substances, resulting from the incorporation of fresh organic matter, non-composted.

Keywords: Biosolids. LIF. FTIR. NMR. Fluorescence. Oxisols.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 15
3. REVISÃO DA LITERATURA 16
3.1. Uso agrícola do lodo de esgoto 16
3.2. Matéria orgânica do solo 18
3.3. Análise química do carbono do solo 20
3.4. Fluorescência Induzida por Laser (FIL) na caracterização da matéria orgânica do solo intacto 22
3.5. Espectroscopia na caracterização das substâncias húmicas extraídas do solo 25
3.5.1. Absorção de radiação na região do Ultravioleta e do Visível (UV-Vis) na caracterização das substâncias húmicas 25
3.5.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier na caracterização das substâncias húmicas 28
3.5.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 30
3.5.4. Fluorescência de Luz UV-vis 31
4. MATERIAL E MÉTODOS 36
4.1. Experimento I 36
4.1.1. Caracterização do lodo de esgoto da ETE de Barueri 37
4.1.2. Caracterização do solo 37
4.1.3. Amostragem do solo 38
4.2. Experimentos II 38
4.2.1. Caracterização do lodo de esgoto da ETE de Jundiaí 39
4.2.2. Caracterização do solo 40
4.2.3. Amostragem do solo 40
4.3. Análise da matéria orgânica do solo 41
4.3.1. Solo inteiro: Análises rápidas para avaliação global 41
4.3.1.1. Determinação de carbono do solo (análise elementar) 41
4.3.1.2. Determinação de Fluorescência Induzida por Laser (FIL) 41
4.3.2. Substâncias Húmicas 42
4.3.2.1. Extração das SH 42

4.3.2.2. Caracterização das Substâncias Húmicas 43
4.3.2.3. Teste de Cinzas do ácido húmico 44
4.3.2.4. Análise de C, H, N e O do ácido húmico 44
4.3.2.5. Análises das SH por espectroscopia 45
4.3.2.5.1. Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis 45
4.3.2.5.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio 45
4.3.2.5.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 46
4.3.2.5.4. Espectroscopia Fluorescência de Luz UV-Vis 47
4.4. Análise dos dados 48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
5.3. Solo Inteiro 49
5.3.2. Carbono e Fluorescência Induzida por Laser 49
5.4. Substâncias Húmicas 54
5.4.2. CHN e O 54
5.4.3. UV-vis 58
5.4.4. FTIR 62
5.4.5. RMN 67
5.4.6. Fluorescência de Luz UV-Vis 76
6. CONCLUSÕES 84
REFERÊNCIAS 85

1. INTRODUÇÃO

A matéria orgânica (MO) é um componente que influencia diretamente a qualidade dos solos (GLATZELA et al., 2003; BAYER et al., 2000). Em regiões de Cerrado, esta corresponde a aproximadamente 2% do volume de solo da camada arável e representa 80% da capacidade de troca catiônica (CTC) destes solos (SOUZA; LOBATO, 2004).

Partindo deste princípio, e no intuito de destinar corretamente rejeitos orgânicos oriundos da atividade humana, tem-se avaliado o potencial de aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas, visando fornecimento de nutrientes e MO.

As características químicas da MO do solo indicam a sua qualidade e estabilidade, bem como as transformações que ocorrem devido ao manejo do solo, por exemplo, quando da aplicação de uma MO fresca, não compostada – o lodo de esgoto.

Assim, conhecer a qualidade (composição, natureza, estrutura, etc) da MO do solo e de suas frações é uma forma de melhor entender as funções que a mesma exerce. Por exemplo, por meio do grau de aromaticidade da MO é possível inferir sobre sua recalcitrância no ambiente; ou a proporção de grupos carboxílicos ou fenólicos pode ser relacionada com a CTC do solo; e até mesmo sua hidrofobicidade pode ser relacionada com a capacidade de retenção de água do solo (DIEKOW, 2003).

Deste modo, a adição dessa MO no solo, proveniente da aplicação do lodo de esgoto, necessita ser monitorada a fim de se compreender a sua dinâmica, influência, bem como sua estabilidade no sistema. Nos últimos anos, técnicas espectroscópicas vêm demonstrando grande potencial para auxiliar no entendimento dos processos relacionados com a dinâmica da MO do solo (MARTIN-NETO et al., 2009).

Neste contexto, destaca-se a Fluorescência Induzida por Laser (FIL), que tem se mostrado uma técnica eficiente e precisa para avaliar o grau de humificação da MO de solos intactos, sem o uso de qualquer procedimento de fracionamento químico ou físico, reduzindo riscos de eventuais erros analíticos, bem como resíduos tóxicos originados no processo de análise. Essa técnica exige

que seja levantada uma curva de correlação entre o teor de carbono orgânico e a índice de fluorescência para que seja calculado o grau de humificação (H_{FIL}) (MILORI et al., 2002).

Pelo fato de a MO estar presente, geralmente, em pequena quantidade e associada às demais frações do solo, para a realização de estudos mais aprofundados são necessários procedimentos especiais, e que normalmente requerem sua extração do solo e o fracionamento por meio de métodos químicos. Pelo fracionamento químico, baseado em características de solubilidade, obtêm-se as substâncias húmicas que geralmente representam em torno de 70 % da MO do solo (SCHNITZER, 1991).

A partir das substâncias húmicas, métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Absorção de radiação no UV-visível e Fluorescência de Luz UV-visível podem viabilizar análises das mudanças estruturais e reatividade da MO do solo, proporcionando resultados mais específicos a respeito do grau de humificação dessa MO.

Diante disso, estabeleceu-se a hipótese de que a aplicação do lodo de esgoto provocará incremento na quantidade de carbono e aumentará o grau de alifaticidade da MO do solo, bem como, influenciará a quantidade de carbono contida em diferentes tamanhos de partículas do solo.

2. OBJETIVOS

- Avaliar as características da MO de dois sistemas, um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto e um Latossolo Vermelho distroférrico sob monocultura de milho, após a aplicação do lodo de esgoto no solo, utilizando a técnica da FIL;
- Verificar a influência da aplicação do lodo de esgoto sobre o carbono contido em diferentes tamanhos de partículas do solo por meio da FIL;
- Analisar o efeito do lodo de esgoto na estrutura dos ácidos húmicos e fúlvicos de solos agrícolas, por meio de técnicas espectroscópicas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Uso agrícola do lodo de esgoto

O lodo de esgoto é um resíduo semi-sólido e heterogêneo, resultante do tratamento de água servida, cuja composição varia quanto: percentual de umidade, nutrientes, MO, microrganismos, elementos inorgânicos e compostos orgânicos potencialmente tóxicos ao ambiente (ABREU JUNIOR et al., 2005). Essa variação se dá em função do material que deu origem ao resíduo e o tratamento que este recebeu (MELO et al., 1994).

Com objetivo de amparar o uso agrícola de lodo de esgoto no Estado de São Paulo, em 1999, foi elaborada a norma P 4.230 (CETESB, 1999), com base na norma da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996). Os principais aspectos relacionados ao ambiente e abordados nesta norma e em norma de outros países são: declividade da área a ser tratada, distância mínima de nascentes de água e leitos de rio, profundidade do lençol freático e espécie vegetal de interesse.

Contudo, em de 29 de agosto de 2006, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução 375, definiu critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, visando benefícios à agricultura e evitando riscos à saúde e ao ambiente. Baseada nesta Resolução, a aplicação do lodo de esgoto é realizada conforme a necessidade de nitrogênio da cultura, levando em consideração a quantidade de N disponível (fração de mineralização) conforme o processo em que foi gerado o resíduo: lodo não digerido, 40%; digerido aerobicamente, 30%; digerido anaerobicamente, 20%; e lodo compostado, 10%.

O uso agrícola do lodo de esgoto pode proporcionar benefícios agronômicos como: elevação dos valores de pH do solo (SILVA et al., 2002), teor de C orgânico e da CTC (MELO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2002), redução da acidez potencial (RAISON et al., 1987), aumento na disponibilidade de nutrientes (BERTON et al.,1997; DA ROS et al., 1993; OLIVEIRA et al., 1995; OLIVEIRA, 2000), maior retorno econômico em relação à aplicação de fertilizante mineral (DOU et al., 1997),

melhorias nas propriedades físicas do solo (JORGE et al., 1991), além de representar benefício de ordem social pela disposição final com menor impacto negativo do resíduo no ambiente.

Em solos sob clima Tropical, os efeitos da adição de lodo de esgoto no carbono orgânico do solo podem ser temporários e/ou duradouros (MELO et al., 1994; MARQUES, 1996; OLIVEIRA et al., 2002), tendo sido verificado, em longo prazo, aumentos lineares nos teores de C orgânico, com a aplicação de doses de lodo (DIAS et al., 2007).

Estudos demonstram que ocorre aumento acentuado dos teores de C orgânico pela aplicação de lodo de esgoto, uma vez que a aplicação acumulada de 240 Mg ha^{-1} praticamente dobrou a concentração de carbono armazenado no solo, em relação à área sem utilização do resíduo; sendo que as áreas cultivadas com aplicação de lodo de esgoto apresentam maiores teores de C orgânico do que a área sob mata nativa adjacente ao experimento e, do que aquela com uso exclusivo de adubo mineral (SOARES et al., 2008). Os mesmos autores observaram ainda que a aplicação de doses acumuladas de até 120 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto aumenta a biodisponibilidade da MO do solo, pela maior presença da fração leve no solo e de carbono associado a esta fração. Esses dados foram obtidos após a sexta aplicação de lodo de esgoto com doses acumuladas em base seca de 0, 30, 60, 120 e 240 Mg ha^{-1}, após seis cultivos subseqüentes de milho.

Contudo, esses aumentos nos teores de carbono do solo dependem das taxas de decomposição do lodo no solo e dos fatores que a condicionam (OLIVEIRA et al., 2002), como o manejo e o clima. De acordo com Fernandes et al. (2005), a aplicação de lodo de esgoto aumenta o fluxo de CO_2, N_2O e CH_4 para a atmosfera, contudo isso não implica em menor estoque de carbono orgânico no solo. Esses resultados foram obtidos utilizando dose de até oito vezes a dose recomendada de lodo, com quatro aplicações e, em quatro cultivos de milho consecutivos, num Latossolo Vermelho-Escuro distrófico, sob condições de campo e clima Tropical.

Além de alterar o teor da MO, o lodo pode exercer influência sobre sua composição química, pois os solos tratados com esse resíduo podem apresentar menor quantidade de C lábil (C-carboidrato) e maior presença de óleos e graxas, em relação aos solos que não receberam lodo (HOHLA et al., 1978).

Alguns trabalhos têm comprovado o efeito positivo da aplicação desse resíduo também em sistemas florestais (FIRME; MALDONADO, 2009), porém, informações a respeito de sua influência na estabilidade da MO do solo são incipientes.

3.2. Matéria Orgânica do Solo

A MO do solo é resultado da mistura de componentes em vários estágios de decomposição, provenientes da degradação de plantas e animais e da atividade de microrganismos (STEVENSON, 1994).

É formada basicamente por carbono (52 - 58%), oxigênio (34 - 39%), hidrogênio (3,3 - 4,8%) e nitrogênio (3,7 - 4,15%) (SILVA et al., 2004), sendo que o oxigênio e o hidrogênio, assim como o carbono são obtidos da água e da fotossíntese; o nitrogênio, como não faz parte do material de origem do solo, é proveniente da adição de fertilizantes ou de transformações de N-orgânico em inorgânico por meio da mineralização de material orgânico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2003).

Kelleher e Simpson (2006) determinaram os resíduos de proteínas, carboidratos, biopolímeros alifáticos e ligninas como componentes majoritários das substâncias húmicas e mostraram que estas são predominantemente misturas de resíduos de plantas e de derivados de síntese microbiana.

A fração mais facilmente degradável da MO, representada pelas substâncias não húmicas (aminoácidos, proteínas, carboidratos, ácidos orgânicos, etc.) é biodegradável, lábil e apresenta característica química bem definida e curto período de permanência nos solos; enquanto que a outra fração, representada pelas substâncias húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina) é mais recalcitrante e pode permanecer no solo por séculos ou até milênios (SHNITZER; KHAN, 1978). Essas possuem alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio na forma de carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas (JORDÃO et al., 1993).

A avaliação da composição química da MO do solo baseia-se no seu fracionamento, por meio do método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), a partir da solubilidade do material orgânico em meio ácido ou

alcalino (SWIFT, 1996). A MO é extraída do solo, com extratores a base de NaOH ou $Na_4P_2O_7$, e a fração não extraível é denominada humina. O extrato é fracionado em ácidos húmicos (fração solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido) e ácidos fúlvicos (fração solúvel em meio ácido e alcalino).

Apesar de ainda não existir modelo único e consensual da estrutura das substâncias húmicas, várias pesquisas tendo sido realizadas, bem como modelos tem sidos propostos (SWIFT, 1989; SCHULTEN; SCHNITZER, 1993; SIMPSON, 2002; PICCOLO et al., 1996). Essas substâncias podem apresentar estruturas bastante complexas, macromoleculares (SCHULTEN; SCHNITZER, 1997) ou estruturas supramoleculares (CONTE; PICCOLO, 1999), com massa molecular e estruturas variáveis; possuem grupos ácidos (carboxílicos e fenólicos), aromáticos e alifáticos com cadeia hidrofílica e hidrofóbica (STEVENSON, 1994).

As substâncias húmicas podem compor mais de 80% da MO do solo e são formadas por meio do processo de humificação. Durante a humificação, de modo geral, ocorre aumento de C-carboxilico, C-alquil e C-aromático (principalmente grupos fenólicos) e decréscimo na concentração de CO-alquil (proveniente de polissacarídeos) (ZECH et al., 1997), provocando aumento da recalcitrância da MO (SOLLINS et al., 1996).

Existem quatro mecanismos principais para a formação das substâncias húmicas durante a decomposição de resíduos no solo. Eles podem ocorrer simultaneamente no solo, porém não com a mesma extensão e importância.

Um primeiro mecanismo considera a formação das substâncias húmicas via polimerização não enzimática por condensação entre aminoácidos e açúcares, formados como subprodutos da atividade microbiana. Outros dois mecanismos envolvem a participação de quinonas (via da degradação da lignina, principalmente em solos mal drenados e em áreas hidromórficas; e via síntese de polifenóis, predominante em solos sob florestas). Um último mecanismo representa uma teoria clássica, no qual as substâncias húmicas seriam derivadas de ligninas modificadas (ROCHA; ROSA, 2003).

A incorporação de substâncias húmicas no solo exerce efeitos diretos sobre suas características, pois influencia fatores físicos, químicos e biológicos, proporcionando maior eficiência na assimilação de nutrientes pelas plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2003), uma melhor agregação, evitando assim a erosão do solo (PICCOLO, 1996). Atua também na adsorção de compostos orgânicos

poluentes, o que reduz a possibilidade de carreamento dessas substâncias e consequentemente, previne a contaminação e degradação do ambiente (PIERZYNSKI et al., 1994).

A forma de se manejar os solos tem proporcionado consequente efeito na quantidade das emissões de gases de efeito estufa, uma vez que as atividades agrícolas podem ocasionar aumento ou não da MO do solo. Desta forma, é extremamente importante quantificar as frações que a compõem, para a compreensão dos processos que determinam as propriedades do solo (PEIXOTO, 1997).

Portanto, conhecer a qualidade (composição, natureza, estrutura, etc) da MO do solo e de suas frações é uma forma de melhor entender as funções que a mesma exerce. Por exemplo, por meio do grau de aromaticidade da MO é possível inferir sobre seu grau de recalcitrância; ou a proporção de grupos carboxílicos ou fenólicos pode estar relacionada com a CTC do solo; e até mesmo a hidrofobicidade pode ser relacionada com a capacidade de retenção de água do solo (DIEKOW, 2003), bem como a capacidade de retenção de substâncias hidrofóbicas, como pesticidas, por exemplo (SIMÕES, 2005).

Neste contexto, a presença dos grupos funcionais que compõem a MO do solo, formados em função do seu grau de humificação, tem sido objeto de estudo para se diagnosticar sua qualidade e/ou estabilidade em sistemas agrícolas, com uso de técnicas espectroscópicas promissoras. Contudo, algumas dessas técnicas necessitam ser comparadas e ajustadas a um banco de dados, cujas calibrações são obtidas a partir de análises químicas. Neste contexto, será feita uma breve abordagem a respeito de técnicas de análise química de carbono do solo para, posteriormente, tratar as técnicas espectroscópicas.

3.3. Análise química do carbono do solo

O carbono do solo provém da MO e dos minerais carbonatados em alguns solos de origem calcárias e sua quantificação tem sido realizada empregando-se métodos que podem determinar sua forma total ou forma orgânica, porém esses

métodos tem sido modificados e/ou adaptados à rotina dos laboratórios de análises de solo (GATTO et al., 2009).

Os métodos de quantificação do carbono total geralmente recuperam todas as formas de carbono orgânico e baseiam-se na conversão de todas as formas de carbono para CO_2 por meio de combustão seca ou úmida. Posteriormente, a quantificação do CO_2 extraído na oxidação por dicromato é realizada com a utilização de técnicas gravimétricas, titulométricas, volumétricas, espectrométricas ou cromatográficas.

O método de Walkley-Black (oxidação ácida) exige aquecimento para que ocorram as reações. Esse calor pode ser interno, oriundo da energia liberada pela diluição de H_2SO_4 concentrado, ou externo, proveniente de uma fonte externa doadora de calor (NELSON; SOMMERS, 1996). Este é o método rotineiro de determinação da MO do solo utilizado no Brasil, modificado por Silva (1999), e não apresenta 100% de correlação com o método do Analisador Elementar, considerado como padrão mundial de determinação da MO do solo (SEGNINI et al., 2008).

Já a calcinação, que utiliza a gravimetria para determinar o carbono orgânico, possui problemas inerentes ao seu princípio. A alta temperatura pode provocar perdas de água estrutural dos minerais do solo, que pode superestimar o carbono orgânico do solo; e perdas de compostos inorgânicos, como por exemplo, da gibsita, que também pode proporcionar a superestimação do carbono, em maior ou menor escala, dependendo da mineralogia do solo. Estudos testam as temperaturas ideais para a calcinação (DAVIES, 1974), estas variam de 375ºC a 1000ºC, uma amplitude de valores que justifica a necessidade de novos estudos para adaptar esta metodologia aos solos de regiões tropicais (CARVALHO JÚNIOR et al., 1997; SEGNINI et al., 2008).

Enquanto os métodos de calcinação (mufla 250 e 500ºC) tendem a superestimar os teores de MO do solo, o método Walkley-Black subestima estes teores, já que não oxida o carbono de origem pirogênica, e possui problemas quanto a tempos de execução e segurança laboral e ambiental. O método de pirofosfato se mostra adequado para amostras com teores de MO acima de 29,5 g kg^{-1}, porém, para amostras com teores de MO mais baixos, este método tende a superestimar os resultados (SILVA et al., 1999).

Neste contexto, destaca-se a Análise Elementar (CNH), técnica que permite a quantificação da MO do solo a partir de amostras sólidas, sem a utilização de qualquer tipo de extrator, o que elimina possíveis influências destas substâncias no processo. Para tanto, a amostra de solo é finamente moída e acondicionada em cápsula de platina, que é oxidada com O_2 numa temperatura aproximada de 900 ºC, em tubo de combustão. Após a combustão um fluxo de He ou Ar é iniciado e o CO_2, H_2O e NO_2 produzidos pela combustão são passados por CuO/Vanadato de Ag, para converter C orgânico em CO_2 e assim, remover o enxofre e gases halogênicos. Esse método possibilita a quantificação do C, H, N e S e, conseqüentemente, das razões H/C, C/N e O/C. Essas relações têm sido indicativos do grau de alifaticidade e aromaticidade da MO dos solos. Quanto mais alifática, por exemplo, maior a relação H/C, e quanto mais aromático, menor a relação H/C da matéria orgânica do solo.

3.4. Fluorescência Induzida por Laser (FIL) na caracterização da matéria orgânica do solo intacto

Em geral, as técnicas espectroscópicas exigem extração e fracionamento químico das substâncias húmicas do solo, resultando em resíduos químicos e tornando a análise de solos um processo lento e trabalhoso. Além disso, os produtos desse tratamento (AH, AF e humina) podem sofrer modificações em relação a sua forma *in situ* (FELLER; BEARE, 1997). No sentido de viabilizar a análise da MO num estado o mais próximo possível do natural, tem-se utilizado a espectroscopia de FIL.

A FIL é uma metodologia nova, de preparo simples da amostra, eficiente na análise da MO de solos inteiros, sem fracionamento químico, e pode ser aplicado em solos com alto teor de ferro, como os Latossolos, o que interferia nos estudos qualitativos da MO, principalmente em técnicas como ressonância magnética nuclear e ressonância paramagnética eletrônica (MILORI et al., 2003).

A fluorescência resulta da luminescência, que é a emissão de luz por uma substância quando submetida a algum tipo de estímulo. Caso a energia absorvida pela molécula não seja suficiente para a ionização ou dissociação da molécula, ela permanecerá no estado excitado por determinado tempo, chamado de tempo de

vida do estado excitado. Logo em seguida, ela emite energia na forma de calor e/ou luz. Estados excitados com tempos de vida curtos (10^{-7}-10^{-9}s) são chamados de fluorescentes (ABREU-JUNIOR et al., 2009).

A espectroscopia de fluorescência é aplicada para estudo seletivo de fluoróforos, ou grupos que apresentam fluorescência em comprimentos de ondas específicos, assim os espectros de fluorescência das substâncias húmicas são constituídos pela soma desses fluoróforos, como aromáticos condensados com vários grupos funcionais e cadeias alifáticas insaturadas presentes nos materiais húmicos (SENESI et al., 1991).

A FIL baseia-se na análise de pastilhas de solo, amostras de solos prensadas em molde de aço (1 cm de diâmetro e 2 mm de espessura). A amostra de solo é excitada com laser de argônio sintonizado na linha de 458 nm com potência de 300mW, onde em seguida a fluorescência emitida é coletada com uma lente convergente com foco sobre um monocromador. A detecção é realizada com uma fotomultiplicadora com pico de resposta espectral em 530 nm. O sinal da fotomultiplicadora é amplificado e retificado por um amplificador “lock-in” e em seguida enviado para um sistema de aquisição controlado por um computador. A resolução espectral deste sistema para fluorescência de solos é de aproximadamente 4 nm (MILORI et al., 2006).

A fluorescência total (área sob a curva) correlaciona-se com características estruturais do carbono do solo e quando ponderada a partir dos teores de C orgânico da amostra, traz informações a respeito do grau de humificação da MO (MILORI et al., 2002).

A determinação do grau de humificação (H_{FIL}) é realizada a partir da razão entre a área do espectro de emissão da fluorescência com excitação em 458 nm (ACF) e a concentração de carbono orgânico total (COT) [9], ou seja:

$$H_{FIL} = \frac{ACF}{COT}$$

Vários trabalhos têm sido realizados a fim de verificar a qualidade da MO do solo utilizando a FIL. Fuentes et al. (2006), ao utilizarem fluorescência para avaliar o grau de humificação de diferentes extratos orgânicos alcalinos de substâncias húmicas, de acordo com a metodologia de Milori et al. (2002), sugeriram que a humificação está relacionada ao caráter aromático das moléculas, pela presença de

anéis aromáticos ou estruturas poliaromáticas condensadas. Além do maior grau de conjugação em cadeias alifáticas insaturadas.

Santos et al. (2009) verificaram que a FIL mostrou-se eficiente na determinação do grau de humificação da MO de Argissolos irrigados com efluente de esgoto tratado. Os resultados obtidos pelos autores mostram variações no teor de carbono e no grau de humificação para os solos irrigados com o efluente de esgoto tratado, decorrentes do aumento da atividade de decomposição da MO, estimulada pelo aumento de água no solo com quantidade significativa de nitrogênio nas formas amoniacal e orgânica.

Milori et al. (2006), observando resultados da correlação entre o grau de humificação da MO de solos inteiros, sem fracionamento químico, medido utilizando a FIL, e o grau de humificação dos ácidos húmicos extraídos dos mesmos solos, utilizando método de fluorescência em solução em espectrômetros comerciais, verificaram que a correlação entre as técnicas em geral é positiva e altamente significativa, dando respaldo à aplicação da FIL para análises da MO do solo.

González Pérez et al. (2006) avaliaram a influência da aplicação de lodo de esgoto na MO de um Latossolo Vermelho Amarelo utilizando a FIL e notaram que esta é uma técnica promissora para caracterizar a MO de solos intactos, permitindo estudar sua distribuição na matriz mineral do solo, inclusive nos Latossolos. Esses autores observaram grande contribuição da fração humina à fluorescência do solo intacto, destacando a importância de estudar a MO associada à matriz mineral do solo.

Segnini et al. (2013), ao estudar a camada superficial de solos sob pastagem, utilizando a FIL, observaram uma MO menos humificada comparada com as camadas mais profundas, já que os resíduos orgânicos presentes são maiores que a capacidade dos organismos em metabolizá-los. Portanto, em camadas mais profundas observou um aumento gradual na humificação e uma maior estabilização da MO devido à presença de carbono mais recalcitrante. Os autores concluíram ainda, que o uso da FIL em amostras de solo não fracionadas permite avaliar a MO total do solo e não apenas a sua fração mais humificada.

3.5. Espectroscopia na caracterização das substâncias húmicas extraídas do solo

Uma informação extremamente importante sobre a MO e que infere na qualidade do solo é seu o estágio de transformação, maturação ou ainda humificação. A MO humificada, em diferentes estágios, contribui para a capacidade de troca de cátions (CTC), para a retenção de água e agregação do solo (DIEKOW, 2003).

Neste contexto, métodos espectroscópicos podem viabilizar análises mais específicas, por meio de observações das substâncias húmicas, permitindo análise das mudanças estruturais e da reatividade da MO.

3.5.1. Absorção de radiação na região do Ultravioleta e do Visível (UV-Vis) na caracterização das substâncias húmicas

A espectroscopia do UV-Visível (200-800 nm) permite a identificação de transições de elétrons dos orbitais σ-, π-, η- de seu estado energético fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado (NIEMAN, 2002), conforme a Figura 1.

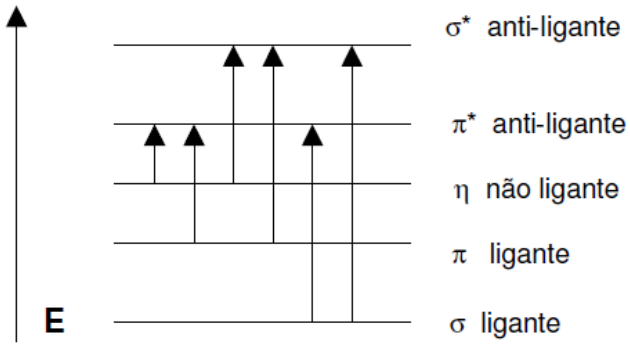

Figura 1 - Diagrama dos níveis de energia relativa de orbitais moleculares e possíveis transições entre os orbitais

A absorção UV-Vis possibilita observar essas transições na forma de picos, sendo que as intensidades são proporcionais à probabilidade de ocorrência da transição e à concentração da molécula na amostra estudada.

Sistemas contendo duplas ligações conjugadas, bem como compostos com elétrons desemparelhados nos átomos de O e S mostram absorção de energia na faixa UV-Vis. Esses elétrons emitem a cor característica da molécula e são chamados de cromóforos, por exemplo, NO_2, C=C ou C=O. Nas SH, os principais cromóforos são estruturas aromáticas, substituídas por com grupos carboxila e hidroxila, e não aromáticos, como cetonas e carbonilas (NARIMOTO, 2006).

A razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm (E4/E6) tem sido amplamente usada para caracterização de substâncias húmicas como indicador do grau de humificação. Razão E4/E6 alta indica maior presença de estruturas alifáticas menos humificadas, e razão E4/E6 baixa significa constituintes aromáticos mais humificados, com maior grau de condensação da amostra (MARTIN-NETO et al., 2009; STEVENSON, 1994). Outros autores (CHEN et al., 1997) preferem relacionar a razão E4/E6 ao tamanho e peso molecular das SH e não à concentração de anéis aromáticos condensados. Relações da razão E4/E6 com apenas a absorção de fótons por grupos cromóforos e quantidades destes também foram descritas na literatura (BAES; BLOOM, 1990). Apesar de bastante usada na caracterização das SH, a razão E4/E6 é controversa, já que outros fatores, como interações intermoleculares, podem alterar significativamente os valores, sendo então esta técnica utilizada somente para comparar resultados obtidos de experimentos nas mesmas condições de solo e clima (MARTIN-NETO et al., 2009).

Com objetivo de caracterizar qualitativamente os ácidos húmico e fúlvico purificados de cinco substratos orgânicos, Silva et al. (2012) observaram que as razões E4/E6 dos ácidos fúlvicos foram maiores que as dos ácidos húmicos. Alta E4/E6 é característica de AF, uma vez que ela prediz a existência de estruturas alifáticas menos condensadas e uma diminuição das conjugações de ligações duplas e simples (PRIMO et al., 2011). Baixa E4/E6 relaciona-se ao aumento do peso molecular, condensação de carbonos aromáticos, aumento da humificação de estruturas aromáticas e maior conjugação de ligações duplas e simples características de AH, o que leva os AH a terem uma maior estabilidade e permanência no solo (DOBBSS et al., 2009).

Estudos em Latossolos tratados com lodo permitiram observar que valores da razão E4/E6 variaram de 5,34 a 10,03 para solos sem adição de lodo e de 5,41 a 9,43 para solos tratados com lodo, concluindo que não houve variação da razão em função da adição de lodo. A razão E4/E6 para o lodo de esgoto foi igual a 5,54 (SANTOS, 2006).

Já, em um solo que recebeu até 12 t de lodo de esgoto no solo, em 3 anos consecutivos, não foi possível observar significância para a razão E4/E6 dos ácidos húmicos. Porém, tanto para ácidos húmicos do solo quanto para o do lodo de esgoto, observou-se absorção crescente com o aumento do comprimento de onda, sendo os espectros formados pela sobreposição de bandas, sem máximos definidos (NARIMOTO, 2006).

Observações realizadas num experimento com leiras de compostagem sugeriram que ocorram reações de oxidação e aumento de estruturas aromáticas com grupos funcionais oxigenados, visto que notou-se aumento nos valores da razão E4/E6 (variando em média de 5,5 a 9,1) (FIALHO, 2007). Observou-se ainda, nos espectros, na região de 277 nm, um ombro que pode ser atribuído ao anel aromático o-substituido (AMALFITANO et al., 1992) e às moléculas de lignina e quinona (ZBYTNIEWSKI; BUSZEWSKI, 2005). Já as relações E2/E3 (razões entre as absorbâncias 250 e 350 nm) revelaram uma tendência de degradação de estruturas mais simples, menos humificadas. Esta relação pode dar uma indicação da aromaticidade da molécula (PEURAVUORI; PIHLAJA, 1997), quanto maior a razão E2/E3, menor a aromaticidade.

Estudos sobre a estabilidade da MO de um Neossolo Flúvico adubado com esterco bovino e gliricídia, realizado por Primo (2012), utilizando UV-vis para análise do extrato de ácidos fúlvicos, comprovaram o aparecimento de bandas em 235 nm nas amostras onde houve a incorporação de adubo no solo. A banda em 205 nm é característica de carbonilas (aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres). A banda em 235 nm é característica da presença de dienos e, mais provavelmente, à presença de grupos carboxílicos ligados a anéis aromáticos não conjugados, característico de AF e de MO fresca. Já o ombro em 285 nm é característico da presença de fenóis, muito típico de substâncias húmicas, sendo mais pronunciado nos AH.

3.5.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier na caracterização das substâncias húmicas

A espectroscopia de FTIR baseia-se no fato de que diversos tipos de ligações químicas e de estruturas moleculares existentes numa molécula absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho, em comprimentos de ondas característicos e, consequentemente, esses átomos entram em vibração. Essa vibração ocorre na forma de estiramento, onde os átomos vibram no mesmo eixo, variando a distancia entre eles; ou de deformação, átomos mudam de direção em relação ao eixo da ligação (STEVENSON, 1994). Do ponto de vista da análise estrutural, a região de maior interesse para esta espectroscopia é de 4000-400 cm^{-1}.

O espectro de infravermelho contém uma série de bandas que podem indicar diferentes grupos funcionais presentes nas amostras de substâncias húmicas, como observados por Silva et al. (2008), Outmane et al. (2002), Santos (2006), Fialho (2007), Benites (1999). Essas informações são úteis pois permitem identificar possíveis processos de oxidação e alteração de grupos como carboxilas, aminas, hidroxilas, carbonilas, que podem estar associados ao manejo, mudança de pH (Santos, 2006), ou pela adição de MO não compostada, como o lodo de esgoto.

Os principais grupos de absorção no infravermelho nas SH são:

- 3100-3400 cm^{-1} (estiramento OH ligado e estiramento N-H);
- 2930 cm^{-1} (estiramento alifático);
- 1705-1716 cm^{-1} (estiramento C=O de cetonas e de ácidos COOH);
- 1630-1650 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O dos íons carboxilato, COO-, estiramento C=C dos anéis aromáticos, estiramento C=O e deformação N=H das amidas primárias);
- 1510 cm^{-1} (deformação N-H de amida II e estiramento C=C dos aminoácidos);
- 1450 cm^{-1} (deformação C-H dos $-CH_2$ e $-CH_3$);
- 1420 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O, deformação O-H, deformação C-O-H dos COOH e estiramento simétrico dos íons COO-);
- 1230 cm^{-1}(estiramento simétrico C-O e deformação OH dos COOH);
- 1125 cm^{-1} (estiramento C-O de alcoóis, éteres, ésteres e COOH);
- 1035 cm^{-1} (estiramento C-O de polissacarídeos).

Os principais sinais das impurezas inorgânicas encontradas são:

- 3700 cm-1 (estiramento axial de OH externo da caulinita);
- 3620 cm^{-1} (estiramento axial de OH interno da caulinita);
- 3520, 3445 e 3390 cm^{-1} (estiramento OH da gibsita);
- 1100-1090 cm^{-1} (estiramento Si-O-Si do quartzo);
- 800-700 cm^{-1} (caulinita, glauconita, montmorilonita e quartzo).

A interpretação dos espectros de FTIR baseia-se fundamentalmente na correlação, pico a pico, entre espectro gerado e as bandas funcionais identificadas na literatura.

Santos (2008) ao avaliar a MO de solos sob aplicação de águas residuárias por meio de FTIR não observou diferenças entre os espectros de AH, de maneira geral, os espectros apresentaram banda larga e intensa em 3370 cm^{-1}, associada a estiramentos de O-H de fenóis e alcoóis. O autor observou ainda, bandas relacionadas a cadeias alifáticas de grupos metileno e também, bandas características de grupos carboxílicos, amidas, quinonas, e cetonas conjugadas com ligações de hidrogênio. Assim, pode concluir que os AH são formados por hidroxilas, aminas, alquilas, carbonilas e carboxilas, ligados tanto a cadeias alifáticas como a anéis aromáticos.

Avaliações realizadas em processos de compostagem de resíduos orgânicos mostraram que houve redução da banda correspondente às cadeias alifáticas com o tempo, relacionado com as transformações dos constituintes facilmente degradáveis da MO, como polissacarídeos e proteínas (FIALHO, 2007).

Observou-se nos espectros de FTIR, gerados a partir de um experimento sob pomar tratado com lodo de esgoto, banda característica de absorção assimétrica de grupos metileno e metil, indicando a presença de cadeias alifáticas nos AH, revelando o baixo grau de humificação do AH extraído do lodo (NARIMOTO, 2006), corroborando resultados observados por Santos (2006). De modo geral, os espectros de FTIR mostraram-se semelhantes em função das diferentes doses de lodo de esgoto.

3.5.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN permite que grupos de um dado elemento, ocupando configurações diferentes numa molécula, possam ser distinguidos em regiões diferentes do espectro, o que possibilita estudos estruturais e identificações das substâncias húmicas.

Esta técnica consiste na absorção ressonante de radiação eletromagnética na região de radiofreqüência por núcleos com spin nuclear diferente de zero e que estejam sujeitos a um campo magnético. A RMN é muito sensível na caracterização da estrutura da matéria (ABREU JUNIOR et al., 2009). As análises das SH por RMN envolvem a identificação e quantificação dos grupos funcionais presentes na amostra. Os principais grupos funcionais detectados no espectro gerado por ^{13}C RMN, em substâncias húmicas são: grupos alifáticos (0-46 ppm), N-alifáticos e metoxílicos (46-67 ppm), o-alifáticos (67-94 ppm), di-alifáticos (94-110 ppm), aromáticos (110-144 ppm), o-aromáticos (144-164 ppm), carboxílicos (64-188 ppm) e carbonílicos (188-230 ppm).

A técnica da RMN tem sido utilizada no Brasil, principalmente na avaliação qualitativa da MO em diferentes solos e sistemas de manejo.

Estudos realizados por Santos (2008), avaliando a qualidade da MO de solos sob aplicação de águas residuárias, verificaram que não houve alteração na distribuição dos grupos funcionais e as substâncias húmicas apresentaram maior percentual de grupos alifáticos do que de aromáticos.

Ao avaliar a dinâmica da MO em dois solos tratados com lodo de esgoto, Latossolo Vermelho eutoroférrico e Latossolo Vermelho distrófico, Santos (2006) observou, nos espectros de RMN, bandas características de grupos alifáticos, com alto conteúdo de O-Alquil e Alquil C, sendo que as amostras superficiais do LVd (0-10 e 10-20 cm) apresentaram valores mais acentuados. Esse aumento de carbono alifático durante a humificação deve-se ao incremento de lipídeos extraíveis ou derivados de plantas e biomacromoléculas alifáticas não saponificáveis da planta, e de microrganismo, encontrados em maior concentração na superfície do solo (SANTOS, 2006). A autora conclui que a adição de lodo de esgoto promoveu decréscimo na quantidade de carbonos aromáticos no solo.

Observações realizadas por Narimoto (2006), num experimento com Argissolo Vermelho Amarelo distrófico tratado com lodo, demonstram a partir de espectros de RMN que os ácidos húmicos extraído do lodo de esgoto é menos humificado que o extraído do solo, incluindo altas porcentagens de grupos alifáticos. A autora observa ainda, que não houve alteração nos espectros de RMN com relação às doses de lodo.

A RMN permitiu evidenciar, em estudos de caracterização da MO em processo de compostagem, a decomposição de estruturas como carboidratos, polissacarídeos e grupos alquil, assim como um aumento das estruturas aromáticas e diminuição de carbono alifático durante o processo de humificação de resíduos orgânicos (FIALHO, 2007). Segundo Chen (2003), alguns dos produtos de quebra dos polissacarídeos são transformados em cadeias alquílicas simples e produtos da decomposição dos carboidratos resultam no acúmulo de lignina rica em aromáticos e fenólicos.

Canellas et al. (2001) observaram, por meio da técnica de RMN, que houve transformações na distribuição de C na estrutura dos ácidos húmicos extraídos dos solos com a adição de resíduos decorrentes da alteração do processo de humificação com diminuição no conteúdo de C alquílico em grupos metilas e metilenos, e aumento de C, atribuído a polissacarídeos.

3.5.4. Fluorescência de Luz UV-vis

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

O fenômeno de luminescência tem sido classificado de acordo com a duração do tempo de decaimento para o estado fundamental: a fluorescência, onde o tempo de relaxação é de 10^{-8} segundos; e a fosforescência, que pode durar vários segundos.

Na espectroscopia de fluorescência os elétrons na molécula de interesse são excitados e transferidos de orbitais moleculares do estado fundamental para orbitais moleculares ligantes e antiligantes do estado excitado. Transições desse tipo envolvem a promoção de elétrons não ligantes (n) ou ligantes (π) para orbitais antiligantes (π*). Normalmente uma molécula excitada eletronicamente volta ao seu estado excitado mais baixo por uma série de relaxações vibracionais rápidas e conversões internas que não produzem emissão de radiação. Esses processos são altamente prováveis em sistemas moleculares contendo átomos com pares de elétrons desemparelhados como nitrogênio e oxigênio ou sistemas aromáticos e ou alifáticos insaturados capaz de um elevado grau de ressonância, como, deslocalização de elétrons, como é o caso das SH (SENESI et al., 1991).

A fluorescência dos compostos orgânicos envolve transições singleto-singleto onde não há mudanças de spin, entretanto, na fosforescência é necessário um estado intermediário tripleto, devido à reversão do spin entre o estado fundamental e o excitado, que retarda a emissão, devido as regras de seleção de spin (Figura 2).

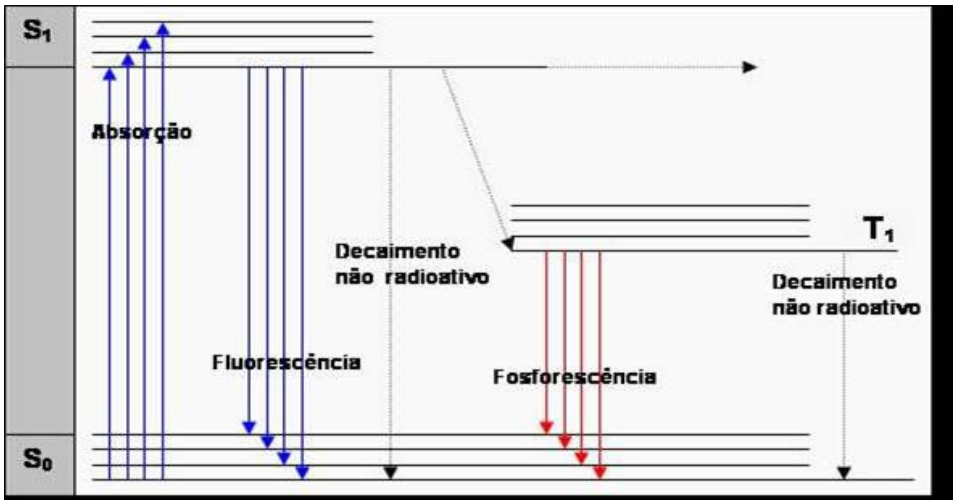

Figura 2 - Diagrama de transição eletrônica de fluorescência molecular

A alta sensibilidade e seletividade são as principais vantagens desta técnica, pois somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados. Estas estruturas fluorescentes, denominadas de ¨fluoróforos¨ (grupos cromóforos que apresentam fluorescência em comprimento de onda específico) na macromolécula húmica, incluem desde estruturas aromáticas condensadas a cadeias alifáticas insaturadas. Assim, as propriedades fluorescentes dos AHs

dependem de diversos parâmetros, tais como sua origem, sua concentração e massa molecular, temperatura, pH e potencial redox do meio, bem como suas interações com íons metálicos e compostos orgânicos (SENESI, 1990).

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

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

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

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

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

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

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

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

Na metodologia proposta por Zsolnay et al. (1999), o índice de humificação é baseado na localização do espectro de fluorescência adquirido no modo de emissão. O espectro de emissão total é dividido em quatro partes e o índice de humificação é

calculado através da razão entre as áreas do último quarto (570–641 nm) e primeiro quarto (356–432 nm), denominado A_4/A_1. A idéia básica de Zsolnay e colaboradores, é que se as moléculas fluorescentes tornam-se mais condensadas, seus espectros de emissão (com excitação em 240nm) tenderão a exibir um deslocamento sobre maiores comprimentos de onda.

Na metodologia proposta por Kalbitz et al. (1999) mede-se o espectro de varredura sincronizada. De acordo com esta metodologia, o espectro de varredura sincronizada das SHs apresenta dois picos ao redor de 360 e 400 nm e um ombro em torno de 470nm. Esses perfis mudam dependendo do grau de humificação, e isto pode ser medido através da razão entre os picos de fluorescência. A região do espectro com comprimentos de onda mais para o vermelho (maior comprimento de onda) é associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados. A região mais para o azul (menor comprimento de onda) é associada a compostos mais simples. Assim, a razão entre a intensidade de fluorescência em 400 e 360 nm, ou 470 e 360 nm, pode ser utilizada para medir o grau de humificação das SHs dissolvidas.

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

O método proposto por Kalbitz et al (1999) é mais seletivo que o de Zsolnay et al. (1999), por mostrar ressonâncias específicas quando a diferença entre o comprimento de onda da excitação e da emissão é igual a 55 nm; e também difere do método proposto por Milori, pois interage com dois grupos, um com excitação em 399 nm e emissão em 520 nm, associado a grupos mais humificados. Em complemento, enquanto Zsolnay et al. (1999) usa excitação no ultravioleta, onde vários fluoróforos são excitados, o método de Milori et al. (2002) exclui grande parte deles, atuando em grupos específicos de fluoróforos, mostrando-se assim, mais seletivo.

Segnini (2007), ao avaliar a MO de solo sob pastagens, relata que diferenças na caracterização do solo inteiro, sem fracionamento químico, por FIL e do AH por Fluorescência de luz UV-Vis podem estar relacionadas com o tipo de amostra. Por

exemplo, amostras de solo não fracionadas permitem avaliar a MO total do solo e não apenas sua fração humificada, sendo que a MO não humificada provoca um efeito de diluição. Assim, o carbono presente não contribui para o sinal de fluorescência e para o grau de humificação. Por outro lado, no AH é medido somente as frações mais recalcitrantes com um alto percentual de carbono que contribui para a fluorescência.

Santos et al. (2009), ao avaliarem a estabilidade da MO do solo em função da irrigação com águas residuárias, verificaram que a mesma não afetou os AH das camadas superficiais, mas causou um ligeiro aumento no grau de humificação em profundidade. Esta tendência foi observada através dos três índices de humificação calculados, os quais mostraram uma correlação significativa acima de 95%. Os autores concluem que a irrigação com águas residuárias favorece a formação de SH solúveis que tendem a se acumular em profundidade.

Estudos que utilizaram a Fluorescência de luz UV-vis, visando monitorar a adição de lodo de esgoto em solos sob pomar, comprovaram que as três metodologias citadas acima apontaram o AH extraído do solo tratado com lodo de esgoto menos humificado que o AH extraído do solo sem lodo, devido à diluição dos compostos aromáticos mais condensados em conseqüência da incorporação do resíduo menos humificado (NARIMOTO, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para verificar o efeito da aplicação do lodo de esgoto na estabilidade da MO do solo utilizou-se de técnicas quantitativas e espectroscópicas e amostras de solos de dois experimentos distintos: **Experimento I**: efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto num Latossolo Vermelho distroférrico sob cultivo de milho; e **Experimento II**: efeito do lodo de esgoto num Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto.

4.1. Experimento I

O experimento foi instalado no Campo Experimental da Embrapa Meio Ambiente, localizado na cidade de Jaguariúna-SP (latitude 22°43'6.059'' S, longitude 47°01'9.523'' W e 570 m de altitude), em solo classificado como Latossolo Vermelho distroférrico de textura argilosa (EMPRAPA, 2006).

O experimento foi instalado em 1999 e conduzido até o ano de 2005, em delineamento de blocos casualizados. Da implantação até o ano de 2005 foram efetuadas seis aplicações sucessivas de lodo de esgoto no solo, sob cultivo do milho e, no final de 2011 iniciaram-se as avaliações de efeito residual na MO do solo (BETTIOL; GHINI, 2011), objeto da presente pesquisa.

Foram aplicadas, anualmente, 5 doses de lodo de esgoto, proveniente da estação de tratamento de esgoto (ETE) de Barueri, correspondendo a: 0; 1 vez; 2 vezes; 4 vezes e 8 vezes a dose de N recomendada para a cultura do milho, de 1999 a 2005. A dose de N recomendada para a cultura do milho foi de 90 kg ha^{-1}, considerando a taxa de mineralização de nitrogênio de 30% (CETESB, 1999; CONAMA, 2006). As doses de lodo de esgoto acumuladas, de 1999 a 2005, ou seja, ao final das seis aplicações sucessivas, foram: 0; 30; 60; 120 e 240 t ha^{-1}. Os tratamentos foram distribuídos em três blocos ao acaso, em parcelas de 10 x 20 m, totalizando 15 parcelas. O lodo foi aplicado em área total e incorporado com enxada rotativa na camada 0-20 cm, sendo que a aplicação antecedia o cultivo de milho no verão (BETTIOL; GHINI, 2011; DOMINGUES, 2013).

4.1.1 Caracterização do lodo de esgoto da ETE de Barueri

O lodo de esgoto utilizado no experimento do milho foi obtido da ETE de Barueri. O tratamento do esgoto proveniente de águas residuárias urbano-industriais na ETE Barueri era realizado na época por meio do processo de lodos ativados e reator anaeróbio, com adição de CaO para higienização (elevação do pH até 12,0), gerando um lodo de reação alcalina com as seguintes características: umidade de 76 % (m/m) e valor de pH em água de 7,4. Os teores médios totais (base seca) de C orgânico: 335 g kg^{-1}; e N de 48 g kg^{-1}. O carbono orgânico foi determinado por digestão com dicromato; e o nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl (RAIJ et al., 2001). Apresentou ainda os seguintes teores de macronutrientes: P = 20,9; K = 1,3; Ca = 27,3; Mg = 3,6; S= 13,3 g kg^{-1}; e de micronutrientes: Fe = 37955; Mn = 319; Cu = 902; Zn = 3012 mg kg^{-1}; e elementos potencialmente tóxicos: Al = 19759; Cd = 12,6; Cr = 858; Pb = 227; Ni = 410 mg kg^{-1}. Essas características são baseadas nos valores médios dos atributos dos lotes de lodo que foram aplicados sucessivamente no solo durante seis anos sob cultivo do milho (BETTIOL; GHINI, 2011; DOMINGUES, 2013).

4.1.2 Caracterização do solo

O solo foi caracterizado como um Latossolo Vermelho distroférrico de textura argilosa. Foi realizada uma amostragem na camada de 0-20 cm de profundidade para fins de caracterização física e química do solo antes da instalação do experimento.

As características físicas e químicas do solo na camada 0-20 cm, antes da instalação do experimento são: argila = 450 g kg^{-1}; pH em água = 5,8; MO = 25,5 g kg^{-1}; P (Mehlich) = 3,5 mg kg^{-1}; Ca = 27,5 mmolc dm^{-3}; Mg = 8,5 $mmol_c$ dm^{-3}; K = 1,5 $mmol_c$ dm^{-3}; Al = 1 $mmol_c$ dm^{-3}, CTC = 73,5 $mmol_c$ dm^{-3} e saturação por bases= 50,8% (BETTIOL & GHINI, 2011; DOMINGUES, 2013).

4.1.3 Amostragem de solo

Amostras de solo das áreas experimentais do milho foram obtidas no final de 2011 e início de 2012 das camadas 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade. Durante nove anos da última aplicação de lodo de esgoto, a área foi mantida cultivada com milho no verão e pousio no outono/inverno, sem adubação mineral. Em cada parcela foram coletadas amostras de 10 pontos, para obtenção de amostra composta representativa, totalizando 45 amostras (DOMINGUES, 2013). Essas amostras foram agrupadas eliminando as 3 repetições (total de15 amostras) e foram utilizadas para extração das substâncias húmicas, visando à caracterização dos ácidos húmicos e dos ácidos fúlvicos por meio de técnicas espectroscópicas (RMN, FTIR, UV-vis e Fluorescência).

Ressalta-se que no experimento do milho, além da coleta realizada em 3 profundidades citadas acima, também foi feita uma coleta para verificar o efeito residual do lodo de esgoto na quantidade e estabilidade da MO do solo, relacionando-o ao tamanho de partículas do solo, por meio da FIL.

Para isto, abriram-se 3 minitrincheiras em cada parcela (para compor uma amostra composta), nas quais foram coletados blocos de solo intactos nas profundidades 0-5 e 5-10 cm de profundidade, totalizando 150 amostras (5 tratamentos x 5 classes de agregados x 3 repetições x 2 profundidades). Todo o solo amostrado foi seco em temperatura ambiente, destorroado e passado em peneira com malha de 9,52 mm de abertura. As amostras (com tamanho de partícula < 9,52 mm) foram fracionadas em classes de agregado pelo método de peneiramento a seco, no qual um conjunto de peneiras com malhas de 4,00; 2,00; 0,25 e 0,053 mm foram colocados em agitador vibratório da marca Produtest, com frequência de 60 Hz por 15 minutos. Após o fracionamento, quantificou-se a massa dos agregados de dimensões entre 9,52 - 4,00 mm, entre 4,00 - 2,00 mm, entre 2,00 - 0,250 mm, entre 0,250 - 0,053 mm e < 0,053 mm (DOMINGUES, 2013). Nessas amostras foi realizada análise de carbono (Analisador Elementar) e FIL (MILORI, 2004).

4.2. Experimentos II

O experimento de campo foi instalado em dezembro de 2004, em área de produção comercial da Companhia Suzano Papel e Celulose, na fazenda Entre Rios, da empresa Suzano Papel e Celulose S.A., no município de Angatuba, SP (22º 59' S e 48º41' O). A altitude é 624 metros em relação ao nível do mar, com precipitação média anual de 1350 mm, temperatura média anual de 19,4 ºC e umidade relativa de 83,3%, podendo ocorrer geadas leves nos meses de inverno (FIRME, 2009).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados e o lodo de esgoto foi aplicado uma única vez, em dezembro de 2004. A taxa de aplicação do lodo de esgoto foi calculada com base no critério do nitrogênio, conforme descrito na Norma P4.230 da CETESB. Portanto, foram definidos quatro tratamentos distribuídos em seis blocos: 0,0 t ha^{-1} (testemunha); 15,4 t ha^{-1} (dose recomendada); 7,7 t ha^{-1} (metade da dose); e 23,1 t ha^{-1} (uma vez e meia a dose recomendada) de lodo de esgoto (base seca) (FIRME, 2009), totalizando 24 parcelas.

O lodo de esgoto foi distribuído superficialmente no solo, em faixa de aproximadamente 0,3 m de largura, a 0,5 m do sulco de plantio das mudas de eucalipto, e não foi incorporado (FIRME, 2009).

4.2.1 Caracterização do lodo de esgoto da ETE de Jundiaí

O lodo de esgoto utilizado no experimento do eucalipto foi obtido da ETE de Jundiaí, operada sob regime de concessão pela Companhia Saneamento de Jundiaí, em Jundiaí, SP. O lodo foi gerado em sistema biológico de lagoas aeradas, de mistura completa, seguidas de lagoas de sedimentação. O lodo biológico foi estabilizado nas lagoas de sedimentação por cerca de 12 meses, resultando em lodo com teor de MO em sólidos secos menor que 70%. Na seqüência, o lodo foi condicionado com polímeros, centrifugado e seco ao ar por 120 dias, com revolvimento mecânico periódico das pilhas, para redução significativa de agentes patogênicos e obtenção de material com até 25% de sólidos. O lodo foi caracterizado conforme recomendado pela Resolução n° 375 (CONAMA, 2006), apresentando umidade de 79 % (m/m) e valor de pH, medido em água, de 6,2. Os

teores totais (base seca) de C orgânico: 340 g kg^{-1}; e N de 33g kg^{-1}. O carbono orgânico foi determinado por digestão com dicromato; e o nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl, conforme RAIJ et al., (2001). Apresentou os seguintes teores de macronutrientes: P = 8,1; K = 1; Ca = 8,1; Mg = 1,6; S= 16,4 g kg^{-1}; e de micronutrientes: Fe = 16062; Mn = 483; Cu = 881; Zn = 989 mg kg^{-1}; e elementos potencialmente tóxicos: Cd = 11; Cr = 111; Pb = 85; Ni =26 mg kg^{-1} (FIRME, 2009).

4.2.2 Caracterização do solo

Em outubro de 2004, foi realizada a amostragem de solo, para caracterização da área experimental antes da instalação do experimento, obtendo-se três amostras compostas a partir de 10 subamostras, na camada de 0-20 cm de profundidade (FIRME, 2009).

O solo da área experimental foi caracterizado como sendo um Latossolo Vermelho distrófico, homogêneo quanto às suas propriedades físicas e químicas da camada superficial. De acordo com os critérios estabelecidos por Raij et al. (1996), as características físicas e químicas do solo na camada 0-20 cm, antes da instalação do experimento eram: argila = 150 g kg^{-1}; pH em $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}= 3,6; matéria orgânica = 20,2 g dm^{-3}; P (resina) = 6,5 mg dm^{-3}; Ca = 1,25 mmolc dm^{-3}; Mg = 1,0 $mmol_c$ dm^{-3}; K = 0,25 $mmol_c$ dm^{-3}; H+Al = 40 $mmol_c$ dm^{-3}; Fe = 91 mg dm^{-3}; CTC = 42,5 $mmol_c$ dm^{-3} e saturação por bases= 5,8% (FIRME, 2009).

4.2.3 Amostragem de solo

Foram realizadas amostragem de solo nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, em dezembro de 2011, sete anos após a aplicação do lodo. Essas amostras foram comparadas com a amostragem realizada em agosto de 2005, aos 8 meses após a aplicação do lodo.

A coleta das amostras de solo ocorreu na faixa de aplicação do lodo, retirando-se 6 amostras simples em cada parcela experimental. As amostras simples foram misturadas, constituindo uma única amostra composta por parcela, totalizando 96 amostras compostas (4 tratamentos x 6 repetições x 2 profundidades x 2 épocas de amostragem).

4.3. Análise da matéria orgânica do solo

A MO do solo proveniente do Experimento I e II foi avaliada por meio de estudos quantitativos (Análise Elementar) e qualitativos (FIL, RMN, FTIR, UV-vis e Fluorescência). As análises elementares (CHN) e FIL foram realizadas com as amostras contendo todas as repetições (total de . Porém, as análises das SH foram realizadas com as repetições agrupadas, compondo apenas uma amostra por tratamento, devido ao moroso processo de extração das mesmas e ainda, o alto custo das análises.

4.3.1 Solo: Análises rápidas para avaliação global

4.3.1.1 Determinação de carbono do solo (análise elementar)

Para análise elementar, foi pesado 1 g de amostra de solo seco, macerado e peneirado em malha de 100 mesh. Alíquotas de 10 mg foram utilizadas para cada determinação. O carbono do solo foi quantificado no Analisador Elementar (CHNS/O, Perkin 2400), por combustão a 1000°C.

4.3.1.2 Determinação de Fluorescência Induzida por Laser (FIL)

Já para análise por FIL, pesaram-se 0,5 g de amostra solo seco e passado em peneira de 100 mesh. Confeccionaram-se duas pastilhas para cada amostra, realizando 5 medidas por amostra, resultando num total de dez espectros de FIL para cada amostra de solo. Essa amostra foi atingida por um laser de argônio

(Coherent – modelo Innova 90C) sintonizado na linha de 458 nm e potência de 300mW. Na saída do laser foi colocado um prisma para remover a fluorescência de fundo do gás. A fluorescência das amostras foi coletada por uma lente convergente e focalizada sobre a fenda do monocromador. A detecção foi realizada por meio de uma fotomultiplicadora e então, o sinal elétrico passou por um amplificador Lock-in e enviado para um software. Nesse sistema, a emissão de fluorescência espalhada foi medida promovendo informações sobre estruturas presentes na amostra de solo. As análises foram realizadas no instrumento de FIL projetado e construído na Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP.

Após a obtenção desses dados, foi calculado o índice de humificação das amostras de solo calculando-se a razão entre a área total do espectro de fluorescência pela porcentagem de carbono determinada por CHN, conforme Milori et al. (2002).

4.3.2 Substâncias Húmicas

4.3.2.1 Extração das SH

A extração das SH foi realizada com base no método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas - IHSS (SWIFT, 1996). Para isso, foram pesados 200 g de amostra de solo seco, passado em peneira de 2 mm. Em seguida, realizou-se uma extração com HCl 0,1 mol L^{-1} em proporção de 1 g solo: 10 mL de solução, ou seja, 200 g de solo em 2 L de solução. A solução foi agitada manualmente durante 1 hora e, após deixar a solução em repouso, separou-se o sobrenadante do resíduo por meio da sifonação. O sobrenadante separado foi neutralizado e descartado.

Do material sólido, foi realizada uma extração com NaOH 0,1 mol L^{-1}, resultando no final, também, uma relação solo-solução 1:10. A solução sofreu agitação manual intermitente durante 4 horas (50 min agitando e 10 min descansando). A seguir, a suspensão ficou em repouso por 16 horas e o sobrenadante foi isolado através de uma centrifugação (10.000 rpm – 15 minutos) e reservado para posterior acidificação. O material insolúvel foi descartado.

O sobrenadante isolado foi acidificado com HCl 6 mol L^{-1}, com agitação simultânea até atingir pH 1 e mantido novamente em repouso por 16 horas. Na seqüência, a solução foi centrifugada (10.000 rpm – 15 minutos) para separar o AH (precipitado) e as frações de AF (sobrenadante). O extrato contendo AF foi reservado e congelado para posteriormente ser dialisado.

A fração de AH foi redissolvida através da adição de solução de KOH 0,1 mol L^{-1}, no menor volume possível para dissolução do AH. A seguir, adicionou-se cloreto de potássio (KCl) na forma sólida, para atingir uma concentração de 0,3 mol L^{-1} [K^+]. Centrifugou-se a solução sob alta velocidade (12.000 rpm – 15 minutos) para que os sólidos suspensos fossem removidos.

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

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

A seguir, a solução foi centrifugada (10.000 rpm – 15minutos) e após descartar o sobrenadante, o precipitado foi suspenso em um pequeno volume de água MilliQ e assim, transferido para uma membrana de diálise (Spectra/Por 6000 – 8000 D) de 25 cm de comprimento e 5 cm de largura, preparada segundo a metodologia de McPhie (1971). Procedeu-se a diálise contra água MilliQ até que a mesma apresentasse teste negativo de cloreto (Cl^-) com nitrato de prata ($AgNO_3$). Para isso, o procedimento foi mantido durante aproximadamente seis dias, realizando a troca da água duas vezes ao dia. Esse mesmo procedimento de diálise foi realizado com o extrato de AF. Após a purificação, as amostras de AH foram congeladas, liofilizadas e mantidas em dessecador.

4.3.2.2 Caracterização das Substâncias Húmicas

Primeiramente, foi realizado um teste de cinzas dos ácidos húmicos, seguida da análise elementar (CHN) e então, utilizou-se as técnicas espectroscópicas para

caracterização dos ácidos húmicos (RMN, UV-vis, FTIR e a Fluorescência de Luz Uv-vis) e dos ácidos fúlvicos (Uv-vis e Fluorescência de Luz UV-vis).

4.3.2.3 Teste de Cinzas dos ácidos húmicos

Para verificação da presença de impureza e também para realização do cálculo de oxigênio, foi realizada a calcinação dos cadinhos de platina na mufla, com a seguinte programação: rampa inicial de 30° C/min, com patamar de 600° C, por 120 min. Posteriormente, os cadinhos foram reservados em dessecador até atingirem temperatura ambiente, para em seguida, serem quantificadas suas respectivas massas.

Feito isso, foi pesado cerca de 10 mg de amostra de ácidos húmicos nos cadinhos e, os mesmos foram levados à mufla com a seguinte programação: rampa inicial de 5° C/min, com patamar de 600° C, por 120 min. Em seguida, a amostra calcinada foi pesada e calculado o teor de cinzas por diferença de massa.

O teor de cinzas foi calculado segundo a equação:

$$C = 100\frac{m}{m_0}$$

onde: C = teor de cinzas (em %); m = massa (mg) da amostra calcinada; m_0 = massa (mg) da amostra não calcinada.

4.3.2.4 Análise de C, H, N e O dos ácidos húmicos

Foi pesado cerca de 20 mg de amostra de ácidos húmicos seco e macerado em almofariz de ágata. As concentrações de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram quantificadas no Analisador Elementar (CHNS/O, Perkin 2400), por combustão a 1000°C.

O teor de Oxigênio foi obtido por diferença utilizando o teor de cinzas, da seguinte forma:

%O = 100% - (C+H+N) - % teor de cinzas

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

4.3.2.5 Análises das SH por espectroscopia

4.3.2.5.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Os espectros de absorbância na região da luz ultravioleta e do visível (UV/Vis) de AH, foram obtidos em duplicatas, com concentração de 20 mg L^{-1} da amostra em solução de $NaHCO_3$ 0,05 mol L^{-1}, ajustadas para pH 8. A aquisição dos espectros ocorreu na faixa de 800 a 200 nm, com abertura de fendas de entrada e saída em 10 nm, na velocidade de 200 nm min^{-1}. As medidas foram feitas em espectrômetro da marca Shimadzu, modelo UV1601PC. Os espectros de absorbância de luz ultravioleta visível (UV-Vis) do extrato de AF apenas dialisado foram obtidos em meio com concentração de $NaHCO_3$ 0,05 mol L^{-1}. Para isso, diluiu-se 42 mg de $NaHCO_3$ em 10 mL de extrato de AF dialisado ajustando-se o pH para valor 8. Fez-se diluição do extrato com solução de $NaHCO_3$ 0,05 mol L^{-1}, até que valor de absorbância não ultrapassasse 1, sendo a concentração final de 10 mg L^{-1}. As condições de análise e instrumentação são idênticas àquelas para AH.

4.3.2.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio

As medidas foram realizadas segundo metodologia proposta por Stevenson (1994) utilizando-se pastilhas de 1 mg de amostra de ácidos húmicos para 100 mg de brometo de potássio (KBr). Essa amostra foi macerada junto com o KBr, previamente seco em estufa, e prensada para confecção das pastilhas. Efetuou-se para cada análise, 16 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1}, com resolução espectral de 4 cm^{-1}. No momento da leitura dos espectros de FTIR procedeu-se à correção automática da linha base em 4.000, 2.000 e 400 cm^{-1}, igualando-se a zero.

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

4.3.2.5.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As amostras de ácidos húmicos secos e macerados (aproximadamente 100 mg) foram empacotadas em rotor de zircônia com espessura de 5 mm. Os espectros de ^{13}C RMN em estado sólido foram obtidos utilizando a seqüência de polarização cruzada (CP) com amplitude variável (VA) do ^{13}C e rotação em ângulo mágico (MAS), empregando uma sonda de sólido da Varian. A freqüência de ressonância foi 100,58 MHz (^{13}C), a banda espectral utilizada para a CP foi de 50 kHz, tempo de contato de 1 ms, tempo de espera de relaxação de 1000 ms, tempo de aquisição de 0,02 ms. A velocidade de rotação do rotor foi de 8 kHz. A rampa no canal de ^{1}H foi de 110 a 60% (em KHz) da condição de Hartman-Hahn (NOVOTNY, 2002). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e foi utilizado hexametilbenzeno (HMB) como referência externa. A aquisição de cada espectro de AH em VACP/MAS ocorreu em um período de aproximadamente 2 horas.

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

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

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

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

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

4.3.2.5.4 Espectroscopia Fluorescência de Luz UV-Vis

Os AH foram dissolvidos em uma solução de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) 0,05 mol L^{-1} com concentração de 20 mg L^{-1} e o pH igual a 8 (MILORI et al., 2002). Essa concentração foi utilizada para minimizar o efeito de reabsorção de fluorescência e reduzir interação entre moléculas. Após o preparo das soluções, os espectros de emissão de fluorescência, excitação e varredura sincronizada foram medidos utilizando-se o espectrômetro de luminescência Perkin Elmer modelo LS-50B. A abertura das fendas de entrada e de saída foi 10 nm e a velocidade de varredura foi de 500 nm/min.

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

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

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

Já na metodologia proposta por Kalbitz et al. (1999), foram obtidos espectros de varredura sincronizada entre 300 e 520 nm simultaneamente com excitação e emissão com filtro de 290 nm, tomando como diferença constante de comprimento de onda 55 nm ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex.}$). O índice de humificação (I_{456}/I_{375}) foi determinado a partir da razão entre as intensidades de fluorescência em 400 e 360 nm ou 470 e 360 nm.

4.4 Análise dos dados

Os resultados obtidos por FIL e CHN foram submetidos à análise de variância, teste de Tukey e modelos de regressão para estudo do efeito das doses de lodo (experimento I e II) e das classes de agregados (no experimento I), com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2003). Para os resultados espectroscópicos, como não haviam repetições, foram calculados apenas os desvios padrões das duplicatas e acrescentadas barras de erros nos gráficos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Solo Intacto

5.1.1. Carbono e Fluorescência Induzida por Laser

Estudos para fins de avaliação global do grau de humificação da MO do solo, como a análise de carbono total e a Fluorescência Induzida por Laser, foram realizados para ambos os experimentos e são apresentados a seguir. Para o experimento I, os resultados de HFIL, além de serem relacionados com as doses de lodo aplicadas, esses foram relacionados com as classes de agregados (tamanhos de partículas e agregados). Na camada de 0-5 cm de profundidade do solo não houve interação entre as doses de lodo de esgoto e as classes de agregados (Figura 3). Contudo, pode-se observar um aumento linear no conteúdo de carbono em função da aplicação das doses de lodo de esgoto. Com relação ao H_{FIL}, observou-se um efeito inverso (Figura 4).

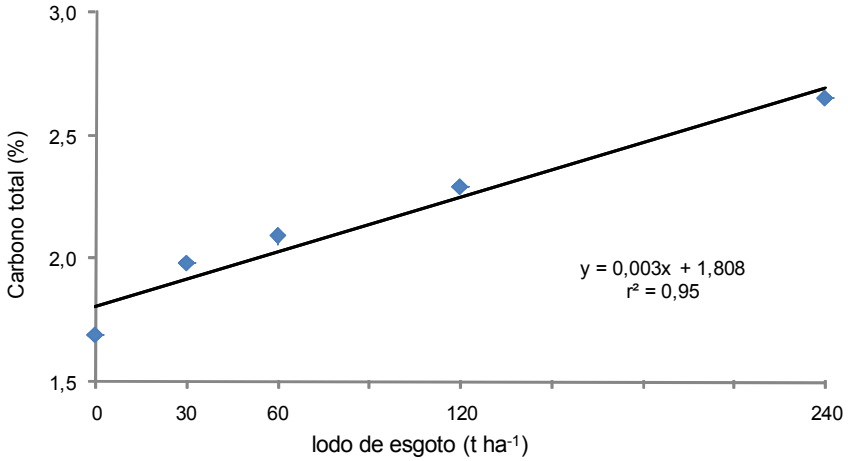

Figura 3 - Concentração de carbono total em um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho, em função do efeito residual da aplicação de doses acumuladas de lodo de esgoto, na camada de 0-5 cm de profundidade do solo

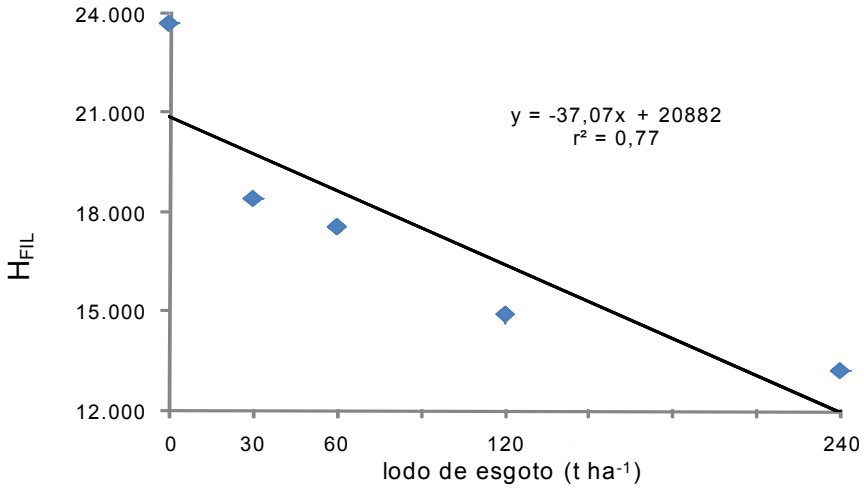

Figura 4 – Índice de humificação (H_{FIL}) de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual da aplicação de doses acumuladas de lodo de esgoto, na camada de 0-5 cm de profundidade

A diminuição dos valores de H_{FIL} indica a incorporação de MO menos humificada ao solo, que poderá continuar armazenada no solo ou não, dependendo do manejo adotado.

Com relação às classes de agregado, pode-se verificar que aqueles de menor tamanho (<0,053 e 0,25-0,053 mm) diferem entre si e das demais, apresentando maior conteúdo de carbono e menor H_{FIL} (Tabela 1). Esses agregados de menor tamanho provavelmente são formados a partir da aplicação do lodo de esgoto, em que a MO menos recalcitrante, a princípio de maior biodegrabilidade, é ligada à fração mineral do solo. Isto está de acordo com Maio et al. (2011), os quais verificaram que a aplicação de lodo de esgoto ao solo diminui o grau de dispersão de argilas e, aumenta a porosidade total do solo e o grau de floculação de argilas, bem como o índice de estabilidade de agregados. Esses resultados corroboram ainda, os encontrados por García-Orenes et al. (2005). Os autores observaram uma redução da densidade do solo pela aplicação de lodo de esgoto, correlacionada com o carbono orgânico do solo. De acordo com esses autores, a diminuição da densidade do solo deve-se, provavelmente, não só ao efeito de diluição da adição de MO ao material mineral, mas principalmente, à agregação das partículas do solo.

Tabela 1 - Concentração de carbono total e H_{FIL} de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho, na camada de 0-5 cm de profundidade em função das classes de agregados

Classes de agregados (mm)	Carbono (%)	H_{FIL}
< 0,053	3,00 a	9055 c
0,25 - 0,053	2,41 b	13108 b
2,00 - 0,25	1,70 c	23124 a
4,00 - 2,00	1,83 c	20954 a
9,52 - 4,00	1,77 c	21485 a
Teste F	64,09*	40,12*
CV (%)	12,60	21,34

* Significativo a 5% pelo teste de Tukey, sendo que médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

Na camada de 5-10 cm de profundidade do solo houve interação entre as doses de lodo de esgoto aplicadas e as classes de agregados. Assim, desdobrou-se as doses de lodo dentro de cada classe de agregados.

Verificou-se um aumento linear no conteúdo de carbono no solo em função da aplicação do lodo de esgoto, sendo que as menores classes de agregados (<0,053 e 0,25-0,053 mm) apresentaram maior conteúdo de carbono quando comparada às demais (Figura 5).

Corroborando os resultados encontrados para a profundidade de 0-5 cm, o grau de humificação nesta camada de solo também diminuiu com o aumento das doses de lodo de esgoto, sendo que as menores classes de agregados (<0,053 e 0,25-0,053 mm) apresentaram um menor grau de humificação (Figura 6).

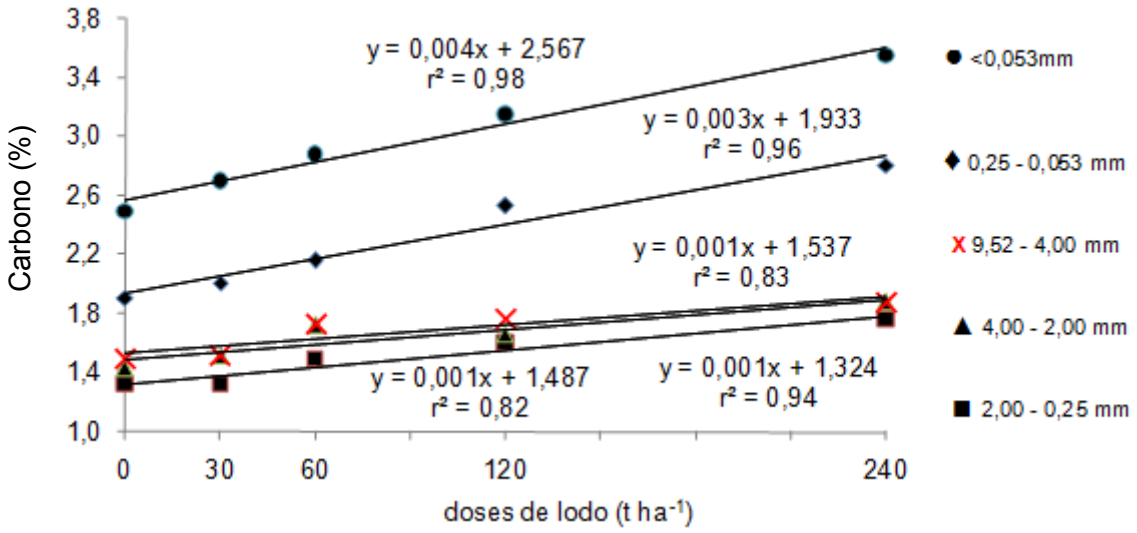

Figura 5 - Concentração de carbono total em um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual das doses acumuladas de lodo de esgoto, dentro de cada classe de agregados, na camada de 5-10 cm de profundidade do solo

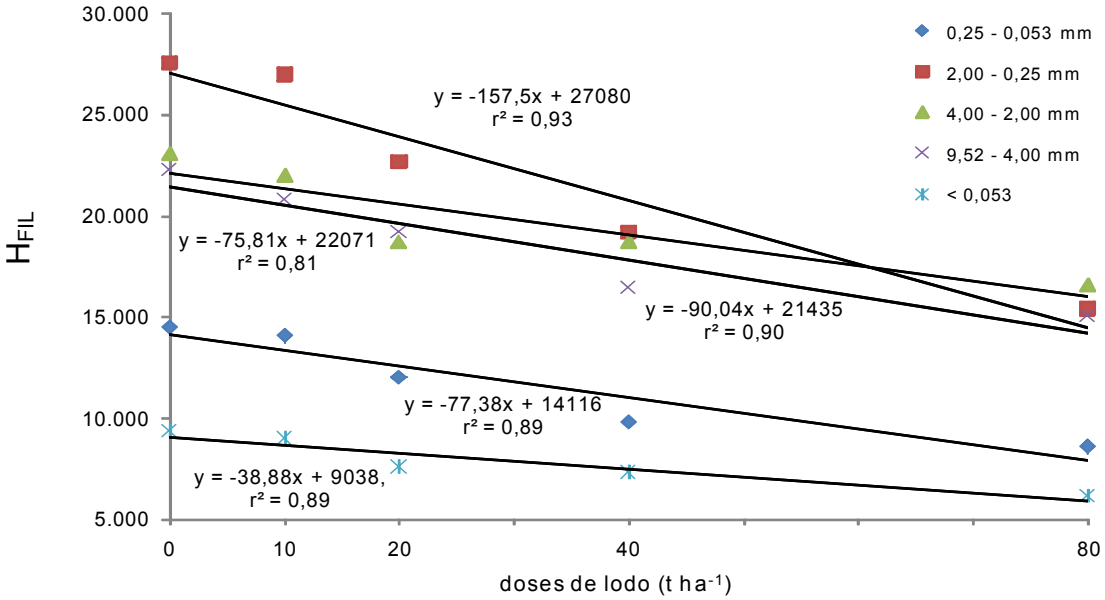

Figura 6 – Índice de humificação (H_{FIL}) do Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual da aplicação das doses acumuladas de lodo de esgoto e das classes de agregados, na camada de 5-10 cm de profundidade.

Já no experimento II (povoamentos de eucalipto), pode-se verificar efeito das doses de lodo sobre a concentração de carbono no solo e de H_{FIL}, tanto aos 8 meses quanto aos sete anos após sua aplicação, apenas na camada de 0-10 cm de profundidade (Figuras 7a, b e 8a, b).

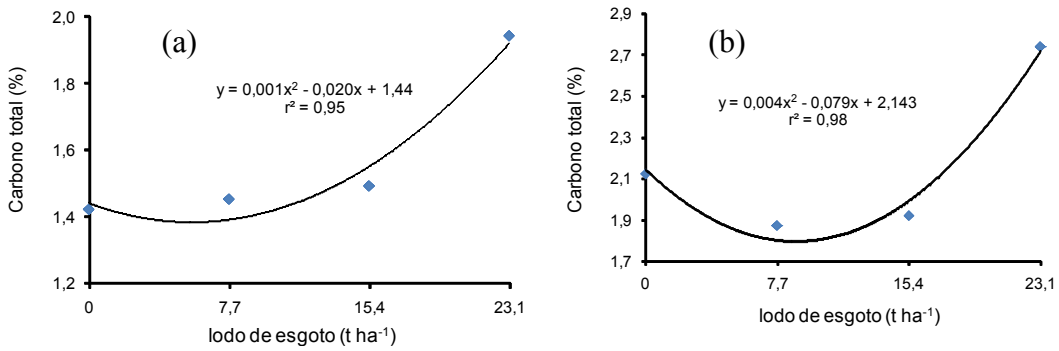

Figura 7 - Concentração de carbono de Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto na camada de 0-10 cm de profundidade em função das doses de lodo de esgoto, após 8 meses (a) e 7 anos (b) da sua aplicação

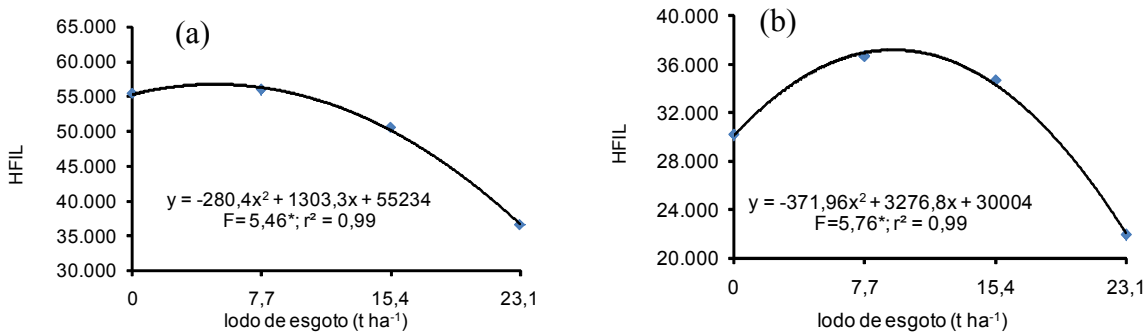

Figura 8 - H_{FIL} do Latossolo Vermelho distrófico sob florestas de eucalipto na camada de 0-10 cm de profundidade em função das doses de lodo de esgoto, após 8 meses (a) e 7 anos (b) da sua aplicação

Observou-se que houve um aumento da concentração de carbono no solo e consequentemente, diminuição do grau de humificação da MO em função do aumento das doses de lodo. Isso se dá devido à incorporação de material menos humificado, o lodo. Porém, as doses intermediárias (7,7 e 15,4 t ha^{-1}) apresentaram-se bastante semelhantes ao tratamento que não recebeu aplicação de lodo

(Figuras 7a, b). Assim, optou-se por trabalhar, a partir daqui, somente com dois tratamentos no Experimento II, ou seja, com adição de 23,1 t ha^{-1} de lodo de esgoto e sem adição de lodo de esgoto.

A quantidade de MO aplicada via lodo de esgoto, das doses intermediárias, não foi suficiente para promover mudanças nos atributos do solo, principalmente considerando-se uma única aplicação do resíduo ao solo e ainda, as condições de Clima Tropical, cujas altas temperaturas favorecem o desenvolvimento de micro-organismos decompositores, com consequente aceleração da degradação da MO, favorecida, ainda, pelo constante fornecimento de água à cultura. Nessas condições, o lodo de esgoto só deve influenciar os atributos químicos e físicos do solo em aplicações sistemáticas e em prazos mais longos. Essas afirmações evidenciam-se por Melo (2002) que, após três anos de aplicação de doses superiores a 25 t ha^{-1} de lodo de esgoto, na camada de 0-10 cm, em dois Latossolos Vermelhos, um de textura média e outro de textura argilosa, não verificou aumento no teor de MO do solo. Esse aumento só foi verificado, por Melo et al. (2004), no quinto ano do experimento.

5.2. Substâncias Húmicas

5.2.1. CHN e O

Com relação às concentrações de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio dos ácidos húmicos do solo em ambos os experimentos, foram calculados as relações C/N, H/C e O/C, a partir dos valores de carbono, hidrogênio, nitrogênio, cinzas e oxigênio, que foi obtido por diferença (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores percentuais de carbono, nitrogênio, oxigênio e o teor de cinzas das amostras de ácidos húmicos dos solos de ambos os experimentos

Tratamentos	C	H	N	O	Cinzas
Experimento I Doses acumuladas de Lodo de Esgoto	----------%----------				
0 t ha^{-1} (0 a 5 cm)	49,5	4,6	2,9	34,3	8,7
30 t ha^{-1} (0 a 5 cm)	47,2	4,8	3,6	35,2	9,2
60 t ha^{-1} (0 a 5 cm)	47,7	4,7	3,7	35,3	8,6
120 t ha^{-1} (0 a 5 cm)	46,9	5,0	3,7	28,4	16,0
240 t ha^{-1} (0 a 5 cm)	46,2	4,7	3,4	33,7	12,0
0 t ha^{-1} (5 a 10 cm)	50,8	4,9	3,5	33,4	7,4
30 t ha^{-1} (5 a 10 cm)	50,6	5,2	4,0	32,7	7,5
60 t ha^{-1} (5 a 10 cm)	49,6	5,1	3,7	33,2	8,4
120 t ha^{-1} (5 a 10 cm)	46,2	5,1	3,7	33,4	11,6
0 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	48,5	4,6	3,4	35,3	8,2
30 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	48,6	5,1	3,4	32,8	10,1
60 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	50,4	5,4	3,9	31,1	9,2
120 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	46,8	5,1	4,3	32,7	11,1
240 t ha^{-1} (5 a 10 cm)	49,0	5,3	3,9	29,2	12,6
240 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	42,1	4,8	3,3	32,3	17,5
Experimento II					
8 meses					
0 t ha^{-1} (0 a 10 cm)	50,7	5,5	4,2	36,6	3,0
23,1 t ha^{-1} (0 a 10 cm)	54,7	6,1	2,8	33,3	3,1
0 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	53,2	5,9	4,3	35,5	1,1
23,1 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	51,4	5,4	3,4	36,6	3,2
7 anos					
0 t ha^{-1} (0 a 10 cm)	54,8	6,2	3,7	32,3	3,0
23,1 t ha^{-1} (0 a 10 cm)	56,2	6,6	3,9	25,5	7,8
0 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	53,0	5,9	3,9	33,4	3,8
23,1 t ha^{-1} (10 a 20 cm)	49,1	5,2	4,3	37,0	4,4

As relações C/N, H/C e O/C do AH do experimento I, em função do efeito residual das doses de lodo aplicadas são apresentadas nas Figuras 9, 10 e 11. Pode-se observar uma tendência ao decréscimo da relação C/N com o aumento das doses de lodo de esgoto, principalmente na camada de 0-5 cm de profundidade. Nota-se que existe uma diminuição na relação C/N com o aumento da profundidade na ausência do lodo e na dose de 30 t ha^{-1}, porém essa tendência desaparece em função do aumento das doses de lodo. Já para as relações H/C e O/C não se observa tendências de aumento ou diminuição com relação às doses de lodo aplicadas, porém existe um leve decréscimo na profundidade 0-5 cm quando comparada à profundidade de 10-20 cm em todos os tratamentos.

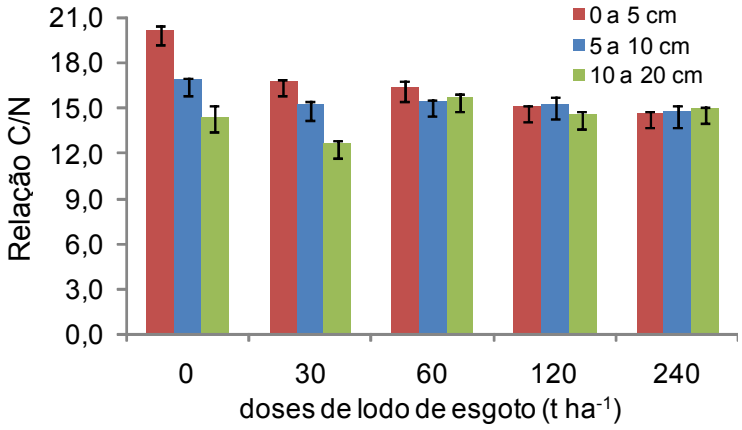

Figura 9 - Relação C/N dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto nas camadas de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade

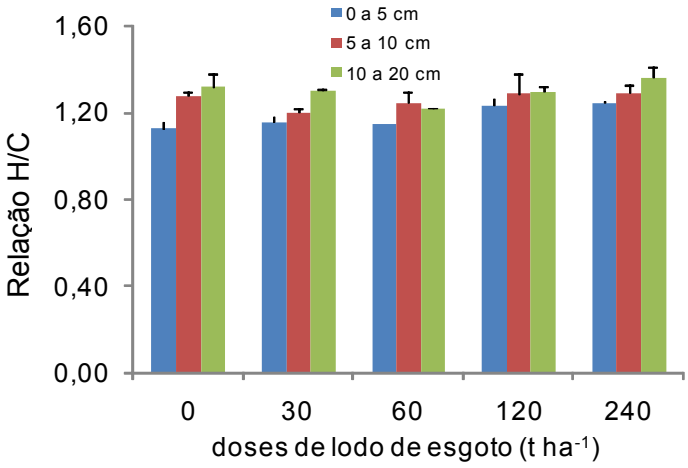

Figura 10 - Relação molar H/C dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto nas camadas de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade.

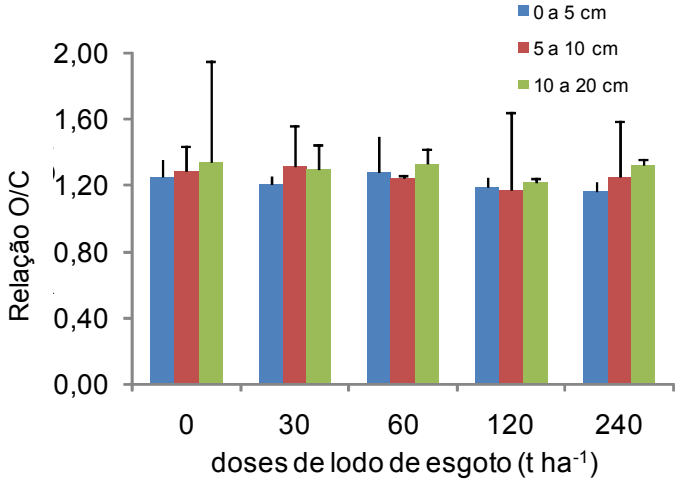

Figura 11 - Relação molar O/C dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses de lodo de esgoto nas camadas de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade

Já para o experimento II, observa-se uma tendência ao decréscimo da relação C/N do AH após os 7 anos da aplicação do lodo de esgoto, tanto na profundidade de 0-10 quanto na de 10-20 cm (Figura 12 b). Isso pode ser explicado devido ao incremento de MO não compostada, o lodo de esgoto, e também um incremento de biomassa fresca das árvores, provocado pela aplicação do lodo e consequentemente, aumento da deposição de serapilheira no solo, material fresco e bastante alifático. Porém, paras as razões H/C e O/C, o tratamento com adição do lodo mostrou-se bastante semelhante ao tratamento sem lodo de esgoto, em ambas as épocas e profundidades analisadas (Figuras 13a, b e 14a, b).

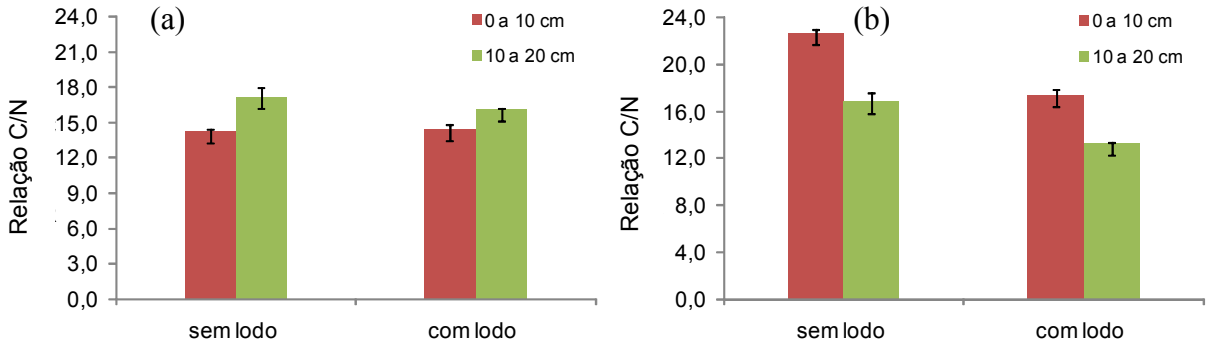

Figura 12 - Relação molar C/N dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) após sua aplicação

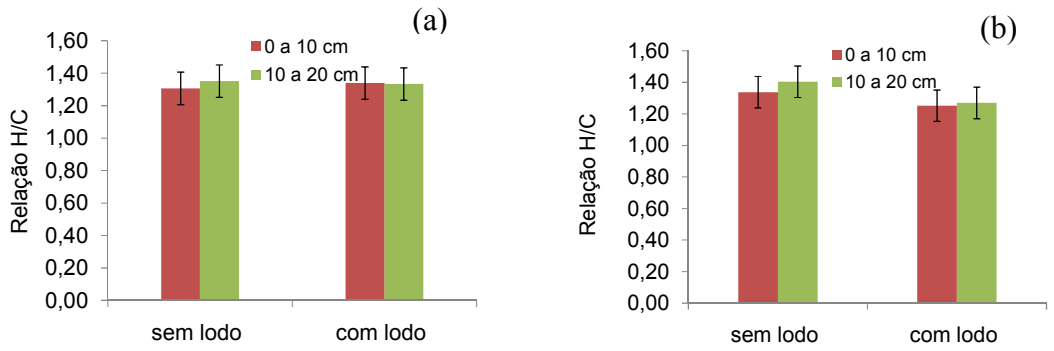

Figura 13 - Relação molar H/C dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) após sua aplicação

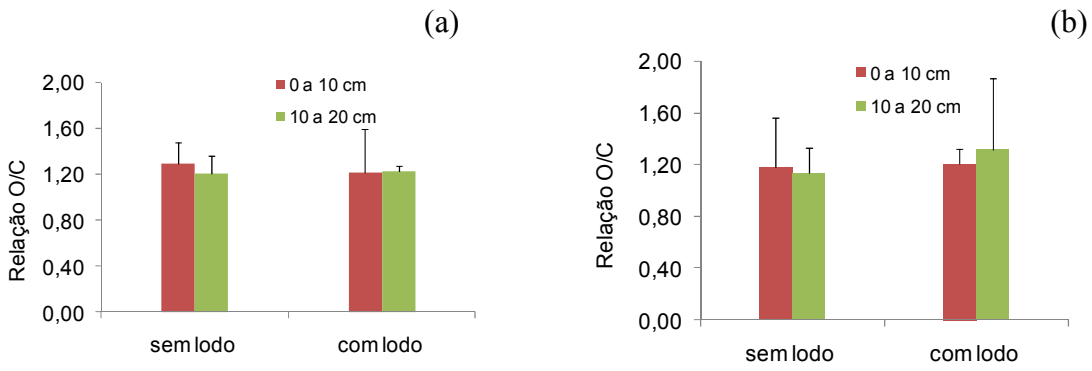

Figura 14 - Relação molar O/C dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) após sua aplicação

5.2.2. UV-vis

Os resultados de UV-vis de ambos os experimentos são demonstrados nas Figuras 15, 16, 17 e 18. Foram calculadas as razões E4/E6 para os ácidos húmicos e E2/E3 para os ácidos fúlvicos.

Não foi possível observar efeito nas razões E4/E6 em função da aplicação do lodo de esgoto para ambos os experimentos (Figuras 15a e 17a), corroborando resultados obtidos por Santos e Narimoto (2006). Entretanto, pode-se observar nos espectros de UV-Vis um ombro na região dos 285 nm (Figura 15 e 17b, c, d) que, segundo Primo (2012) é característico de fenóis presentes nas substâncias húmicas, sendo mais evidente nos ácidos húmicos.

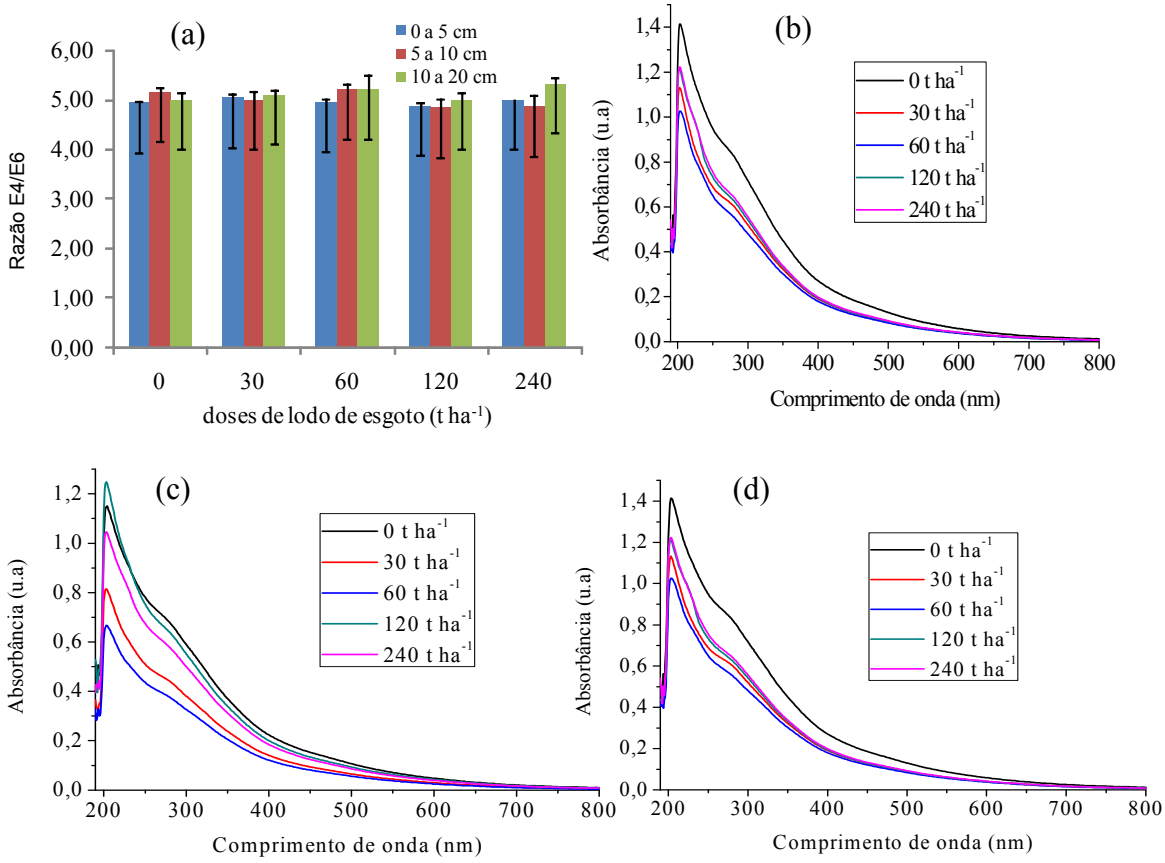

Figura 15 - Razões E4/E6 (a) e os espectros de UV-Vis dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto nas camadas de 0-5 (b), 5-10 (c) e 10-20 (d) cm de profundidade

Já para as razões E2/E3 nota-se nos espectros de UV-Vis dos ácidos fúlvicos, na região de 235 nm, um ombro bastante pronunciado (Figura 16 e 18b, c, d), ligado à presença de grupos carboxílicos ligados a anéis aromáticos não conjugados, confirmando os resultados obtidos por Primo (2012). Essas mudanças são visíveis na camada superficial e é mais intensa nas amostras que receberam uma maior dose de lodo, relacionada assim, à incorporação de material fresco, mais alifático, no solo.

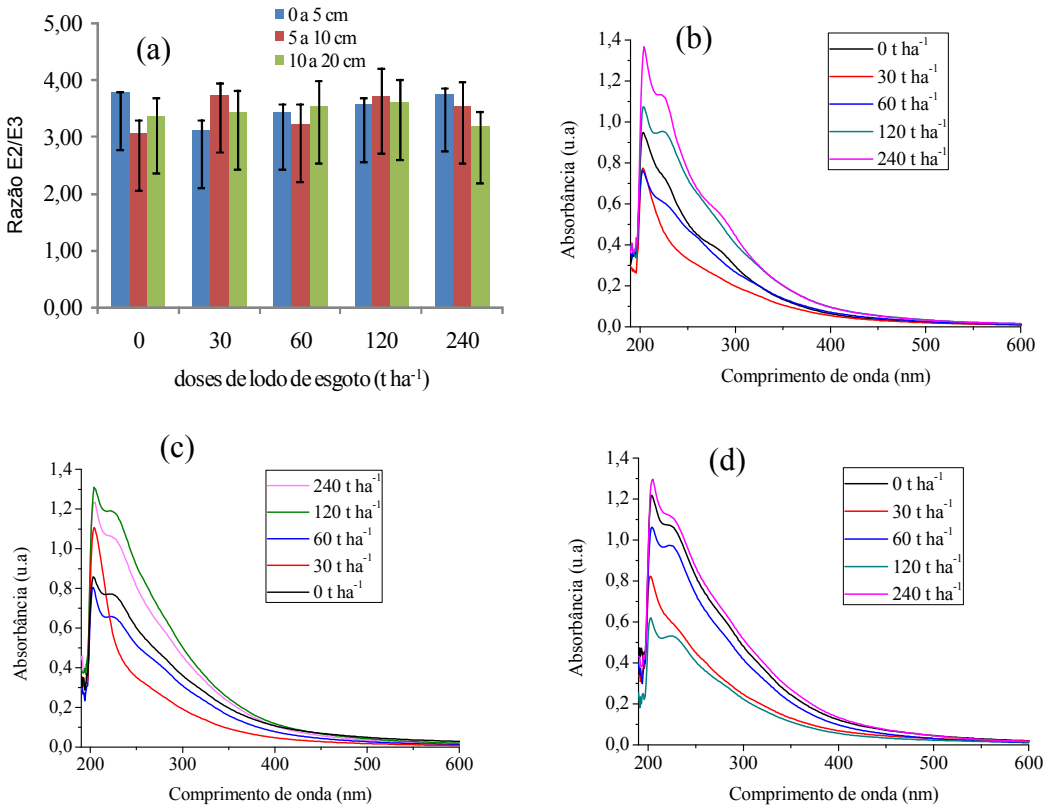

Figura 16 - Razões E2/E3 (a) e os espectros de UV-Vis dos ácidos fúlvicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto nas camadas de 0-5 (b), 5-10 (c) e 10-20 (d) cm de profundidade

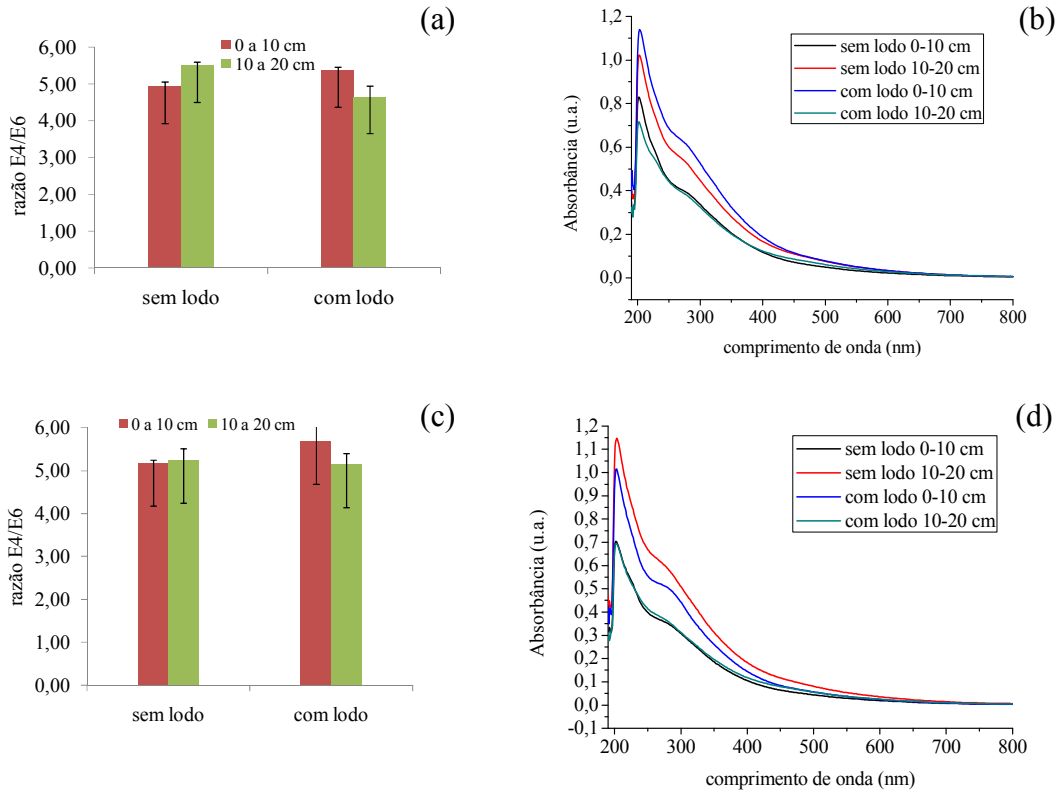

Figura 17 - Razões E4/E6 e os espectros de UV-Vis dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade aos 8 meses (a, b) e aos 7 anos (c, d) após sua aplicação

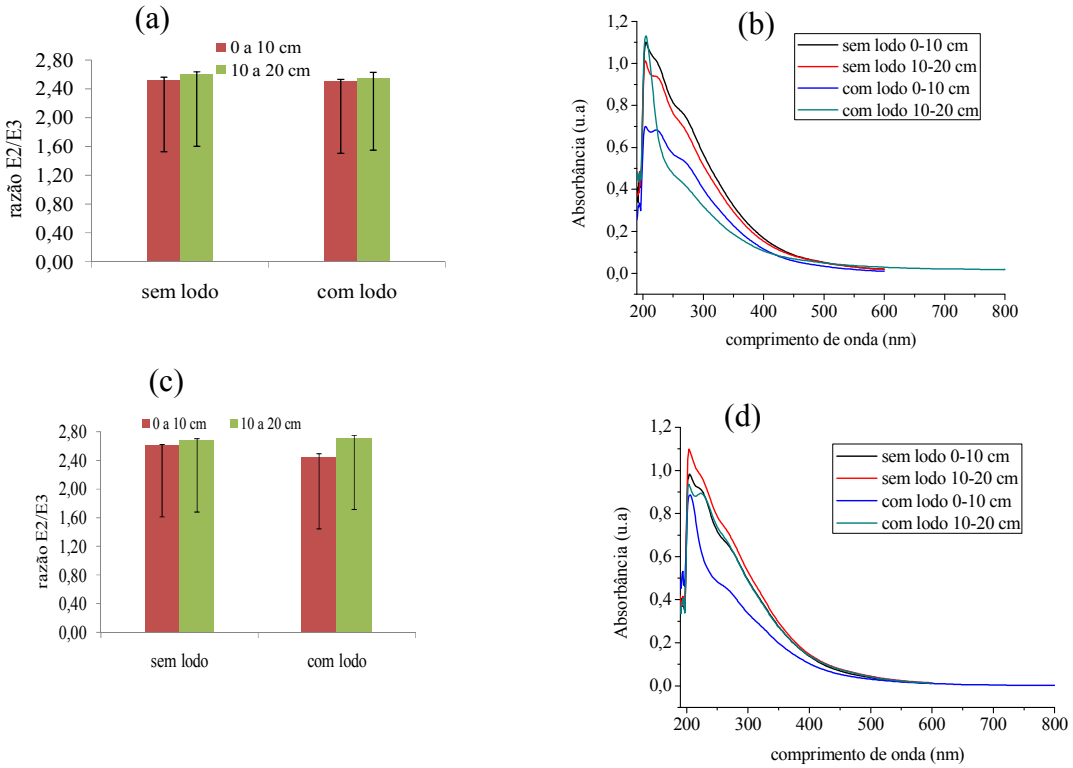

Figura 18 - Razões E2/E3 e os espectros de UV-Vis dos ácidos fúlvicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade aos 8 meses (a,b) e aos 7 anos (c, d) após sua aplicação

5.2.3. FTIR

Os resultados referentes aos espectros de FTIR do experimento I são apresentados nas Figuras 19, 20 e 21.

Podem-se observar bandas características de estiramentos das ligações O-H de alcoóis e fenóis, de estiramentos C-H de estruturas alifáticas, C=O de cetonas e ácidos carboxílicos, bem como estiramentos assimétricos de C-O, geralmente característico de açúcares e polissacarídeos, C=C de anéis aromáticos e estiramentos N-H e C-N, encontrados de amidas primárias e aminoácidos. Esses resultados corroboram os obtidos por Santos (2008), o qual verificou que nas amostras de solos tratadas com águas residuárias, os ácidos húmicos são compostos por hidroxilas, aminas, alquilas, carbonilas e carboxilas, ligados tanto a cadeias alifáticas como a aromáticas. A intensidade das bandas não foi influenciada pelas doses de lodo de esgoto nas três profundidades analisadas.

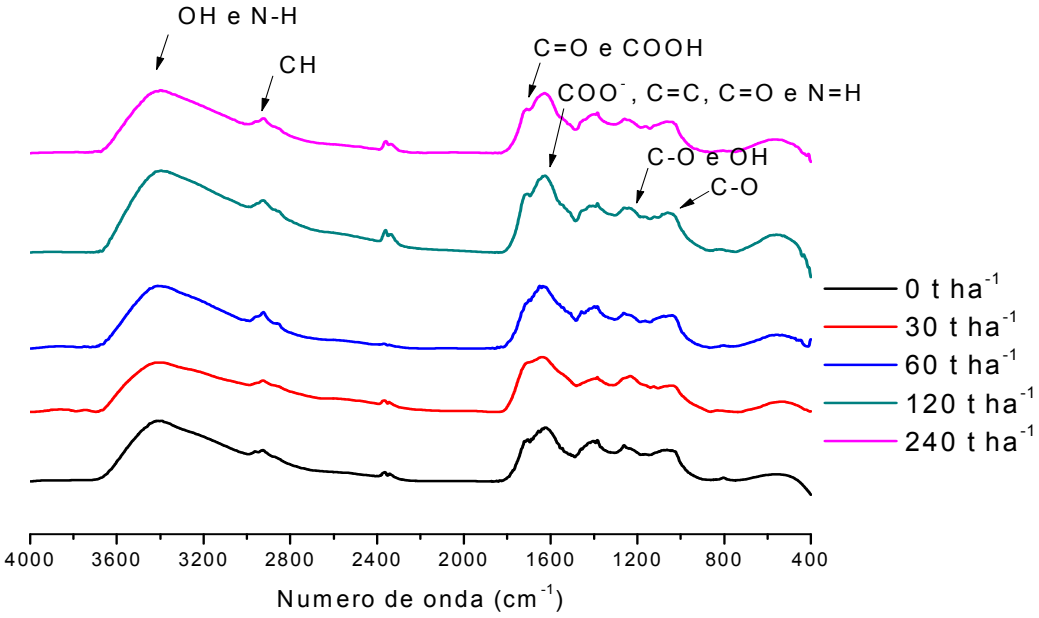

Figura 19 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5 cm de profundidade

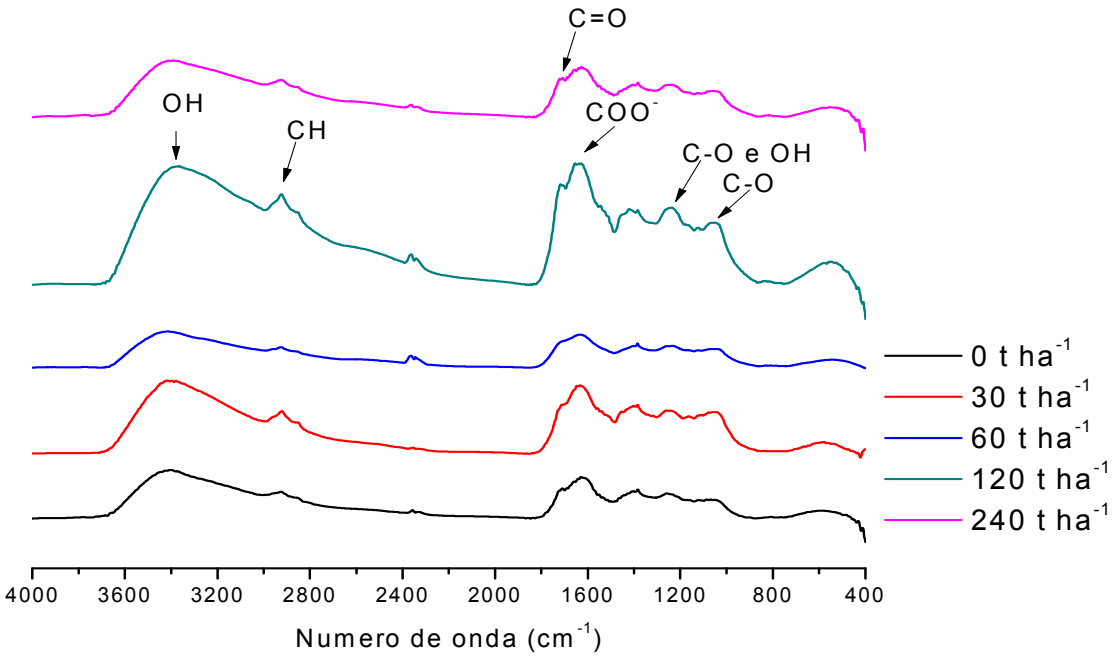

Figura 20 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 5-10 cm de profundidade

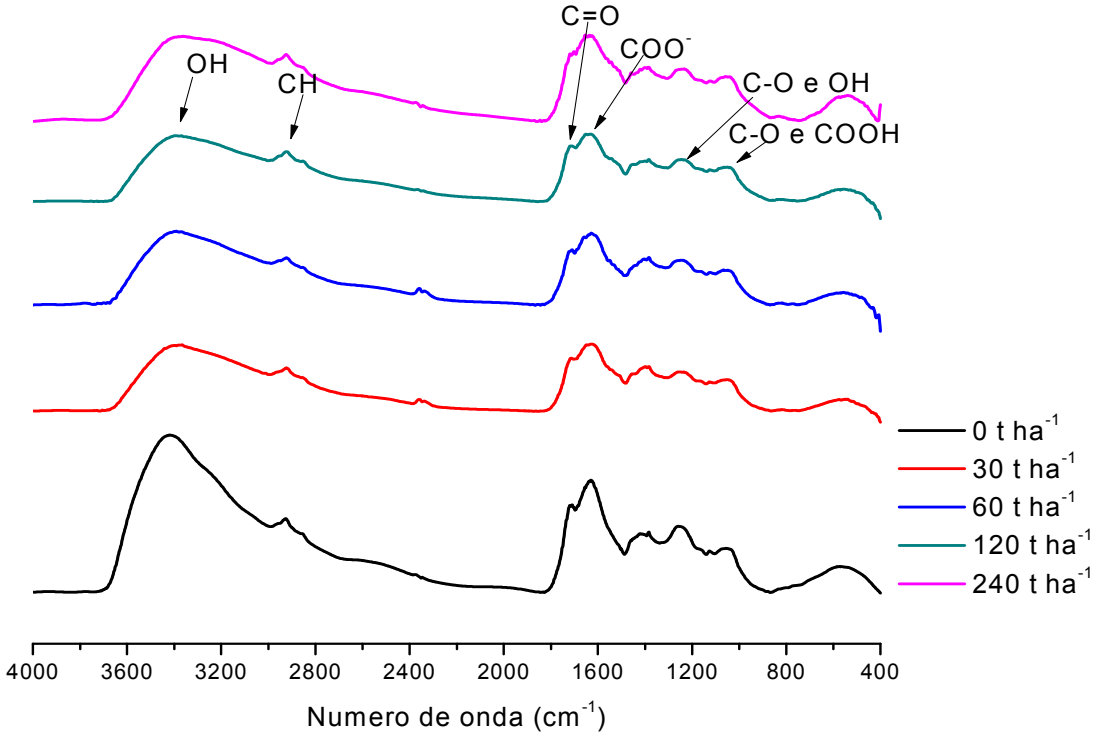

Figura 21 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 10-20 cm de profundidade

Com relação aos espectros de FTIR do experimento II, pode-se verificar bandas mais intensas para os tratamentos que receberam adição de lodo de esgoto após 8 meses da sua aplicação (Figura 22), porém aos 7 anos os picos mostram-se bem menos pronunciados (Figura 23), provavelmente devido à degradação dos polissacarídeos, proteínas e carboidratos que compõem a MO do solo.

Os picos são semelhantes aos observados nos tratamentos do experimento I, e de modo geral indicam a presença de cadeias alifáticas e o baixo grau de humificação do lodo de esgoto.

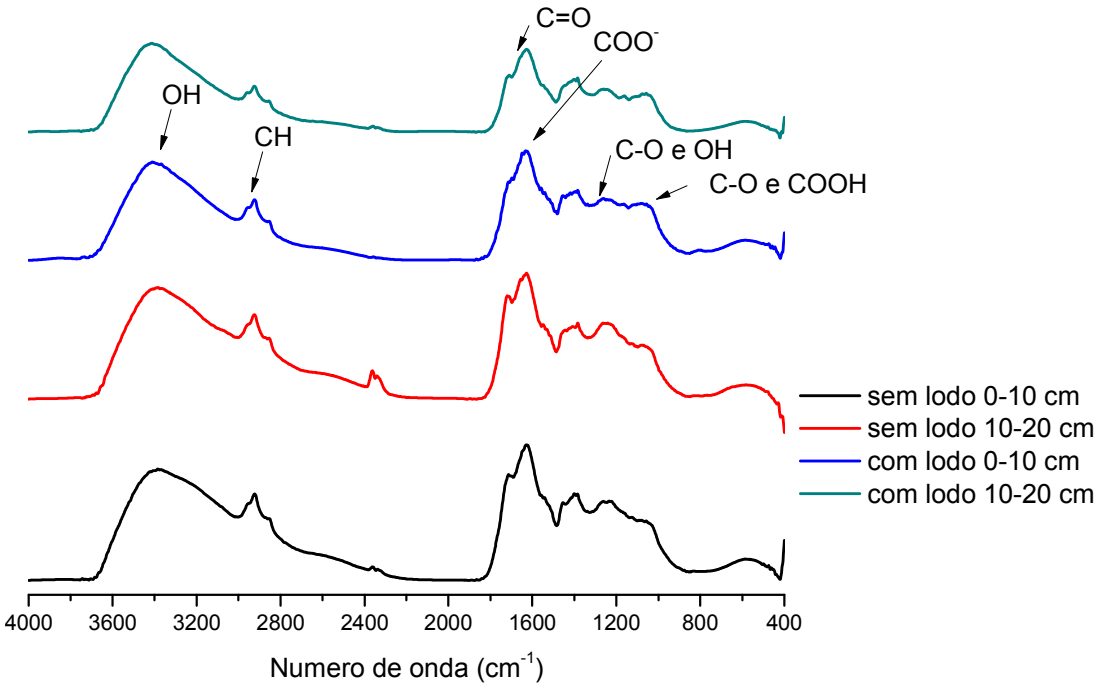

Figura 22. Espectros de FTIR dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses após sua aplicação

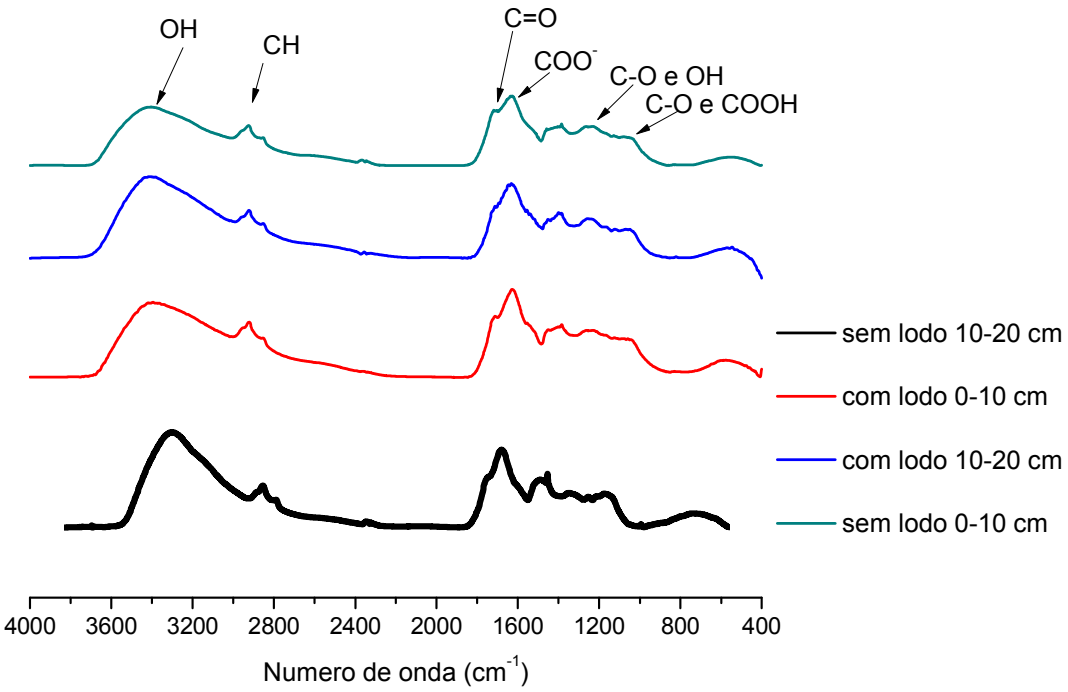

Figura 23 - Espectros de FTIR dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 7 anos (b) após sua aplicação

Contudo, para ambos os experimentos as bandas das regiões de 3395-3400 cm^{-1} (estiramento OH ligado e estiramento N-H); 2930 cm^{-1} (estiramento alifático); 1705-1716 cm^{-1} (estiramento C=O de cetonas e de ácidos COOH); 1630-1650 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O dos íons carboxilato, COO-, estiramento C=C dos anéis aromáticos, estiramento C=O e deformação N=H das amidas primárias); 1420 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O, deformação O-H, deformação C-O-H dos COOH e estiramento simétrico dos íons COO-); 1230 cm^{-1}(estiramento simétrico C-O e deformação OH dos COOH); 1125 cm^{-1} (estiramento C-O de alcoóis, éteres, ésteres e COOH); 1035 cm^{-1} (estiramento C-O de polissacarídeos) são bem definidos, excetos para o experimento II, após 7 anos da aplicação do lodo (Figura 23), onde principalmente os estiramentos de OH na região de 3400 cm^{-1} apresentam-se bastante discretos, bem como os da região de 1800 – 1100 cm^{-1}. Isso pode ocorrer devido ao aumento da humificação, pois existe perda de moléculas mais simples como os carboidratos, conforme já relatado por diversos autores (MIIKKI et al., 1997; GARCIA et al., 1992; GIGLIOTTI et al., 1997 e NARIMOTO, 2006).

Os espectros obtidos a partir de amostra de ácidos húmicos do lodo de esgoto apresentam picos bastante evidentes na região de 2.900 cm^{-1}, que corresponde ao estiramento alifático de grupo C-H, e em 1.033 cm^{-1}, que corresponde ao estiramento C-O de polissacarídeos (DIAS et al., 2009), conforme Figura 24. Assim, se o uso de lodo de esgoto afetar a MOS, é possível que esse resíduo promova mudanças mais pronunciadas nessas regiões espectrais.

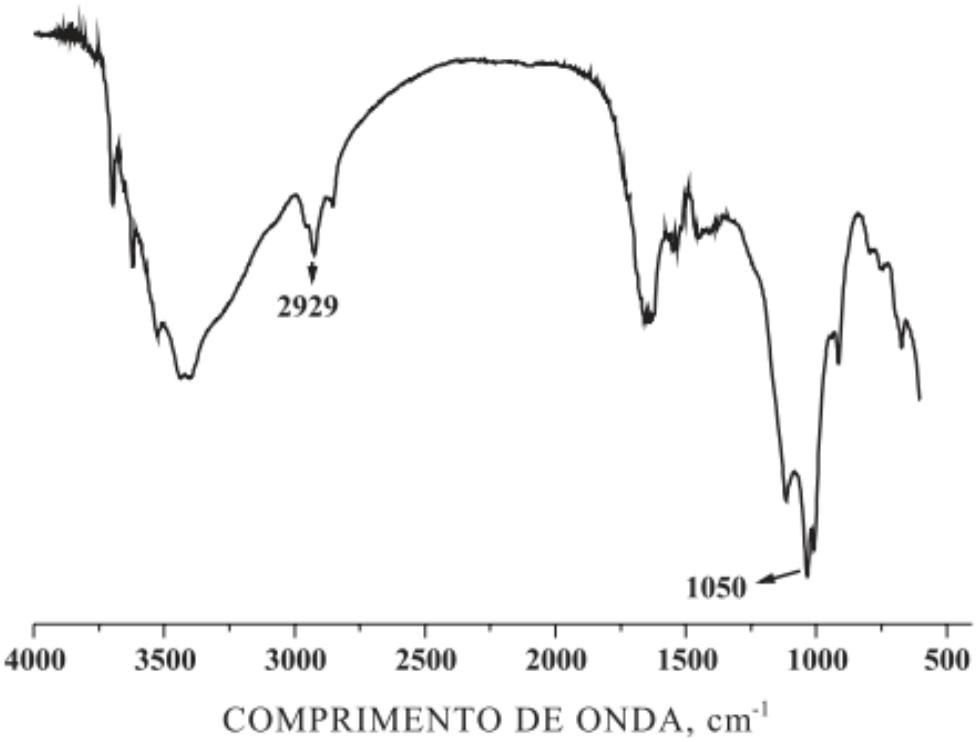

Figura 24 - Espectro de FTIR dos ácidos húmicos do lodo de esgoto da ETE de Barueri (DIAS et al., 2009).

5.2.4. RMN

Na Figura 25, podemos verificar o espectro de ^{13}C RMN do lodo de esgoto da ETE de Jundiaí. Observam-se bandas características de grupos alifáticos bastante pronunciadas (0 a 45 ppm) conforme observados por Santos (2006), que supõe que o aumento do carbono alifático esteja associado ao incremento de lipídeos derivados de plantas e de microrganismos. No espectro do lodo, pode-se observar ainda, bandas menos pronunciadas correspondentes a grupos aromáticos (110 a 160 ppm), formados principalmente pela quebra de polissacarídeos, que são transformados em cadeias alquílicas simples e pela decomposição de carboidratos.

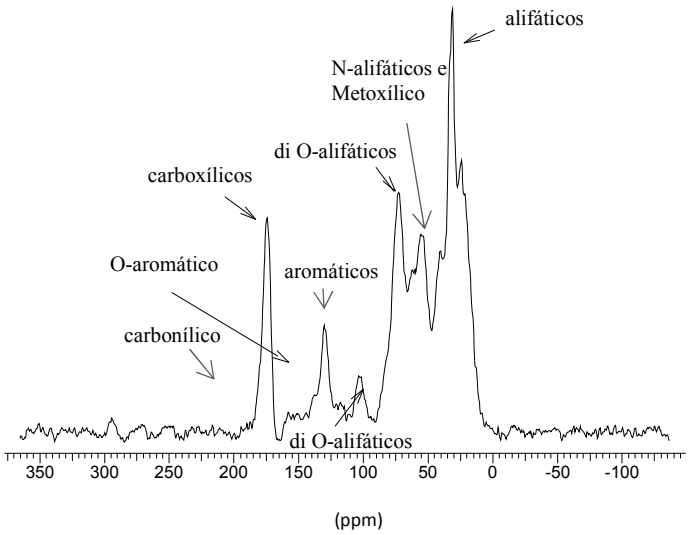

Figura 25 - Espectro de ^{13}C RMN do lodo de esgoto da ETE de Jundiaí aplicado no experimento II

Com relação aos espectros de RMN dos ácidos húmicos de ambos os experimentos, verifica-se bandas relacionadas a grupos carboxílicos, carbonilicos, metoxilicos, aromáticos e alifáticos.

No experimento I, existem evidências de que ocorreu uma redução da banda de aromáticos e aumento da banda de alifáticos com o incremento das doses de lodo de esgoto (Figuras 26 e 27), sendo esse efeito bem mais intenso na profundidade de 10-20 cm de profundidade (Figura 28). Esses resultados corroboram os obtidos por Narimoto (2006) que observou que o AH do solo cultivado com citros tratado com lodo era bastante alifático, enquanto que o solo que não recebeu adição de lodo de esgoto mostrou-se mais aromático.

Já no experimento II, não se observa efeito da adição de lodo sobre os espectros de RMN, porém notam-se sinais de carbono alifático bastante pronunciados, em ambas as épocas analisadas (Figuras 29 e 30). Isso ocorre, provavelmente, em conseqüência do grande volume de serapilheira depositada no solo, material fresco, mais alifático, não decomposto, rico em polissacarídeos e proteínas de fácil decomposição, bem como pela decomposição de raízes finas.

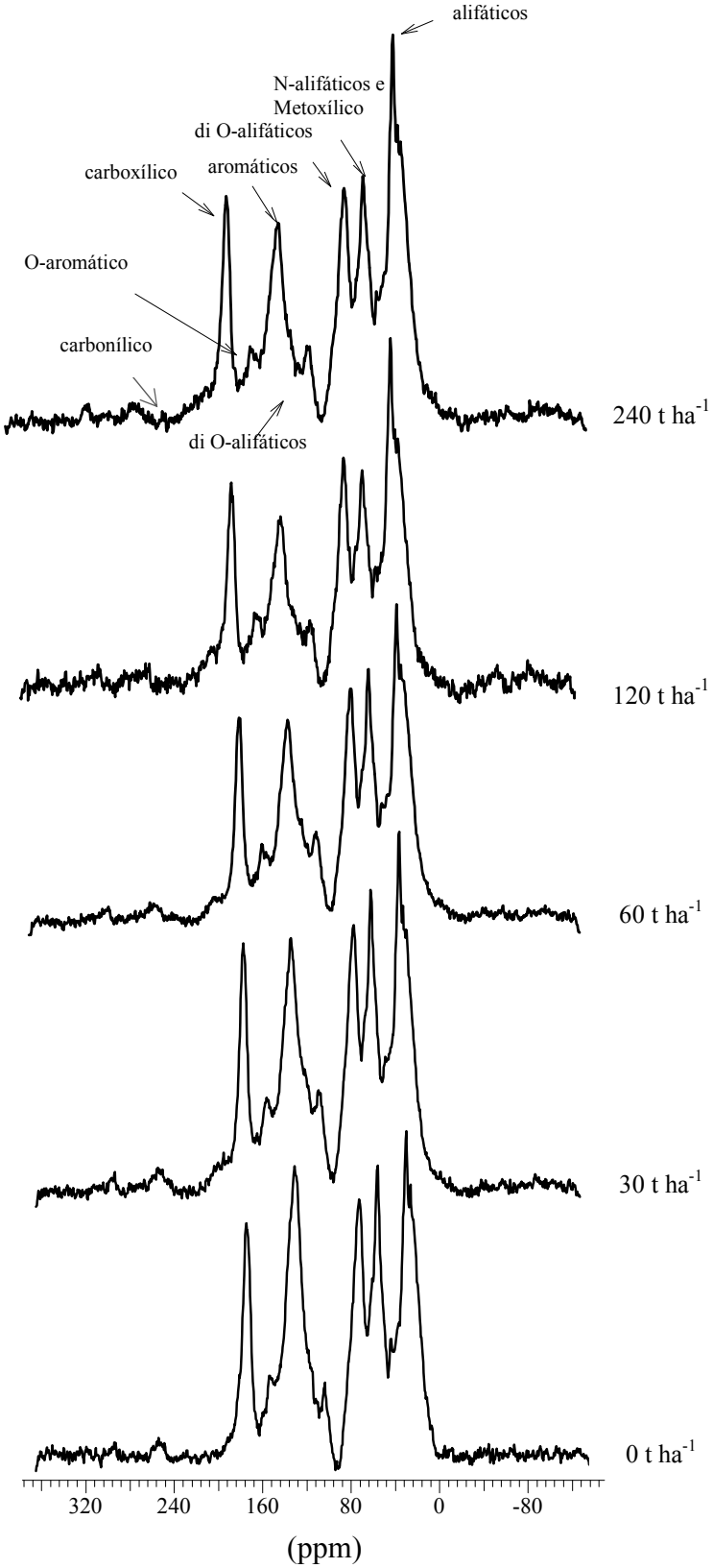

Figura 26 - Espectros de ^{13}C RMN dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5 cm de profundidade

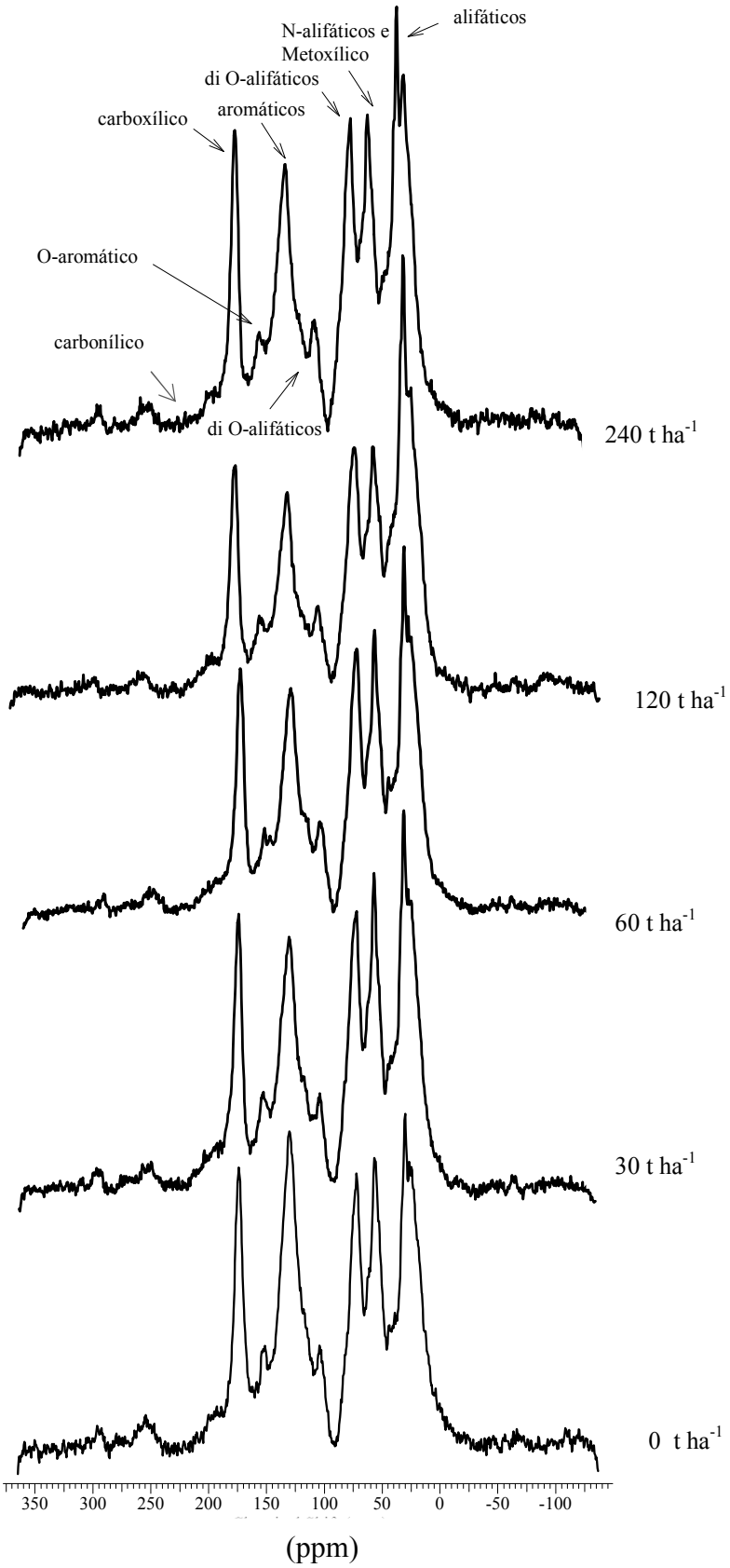

Figura 27 - Espectros de ^{13}C RMN dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 5-10 cm de profundidade

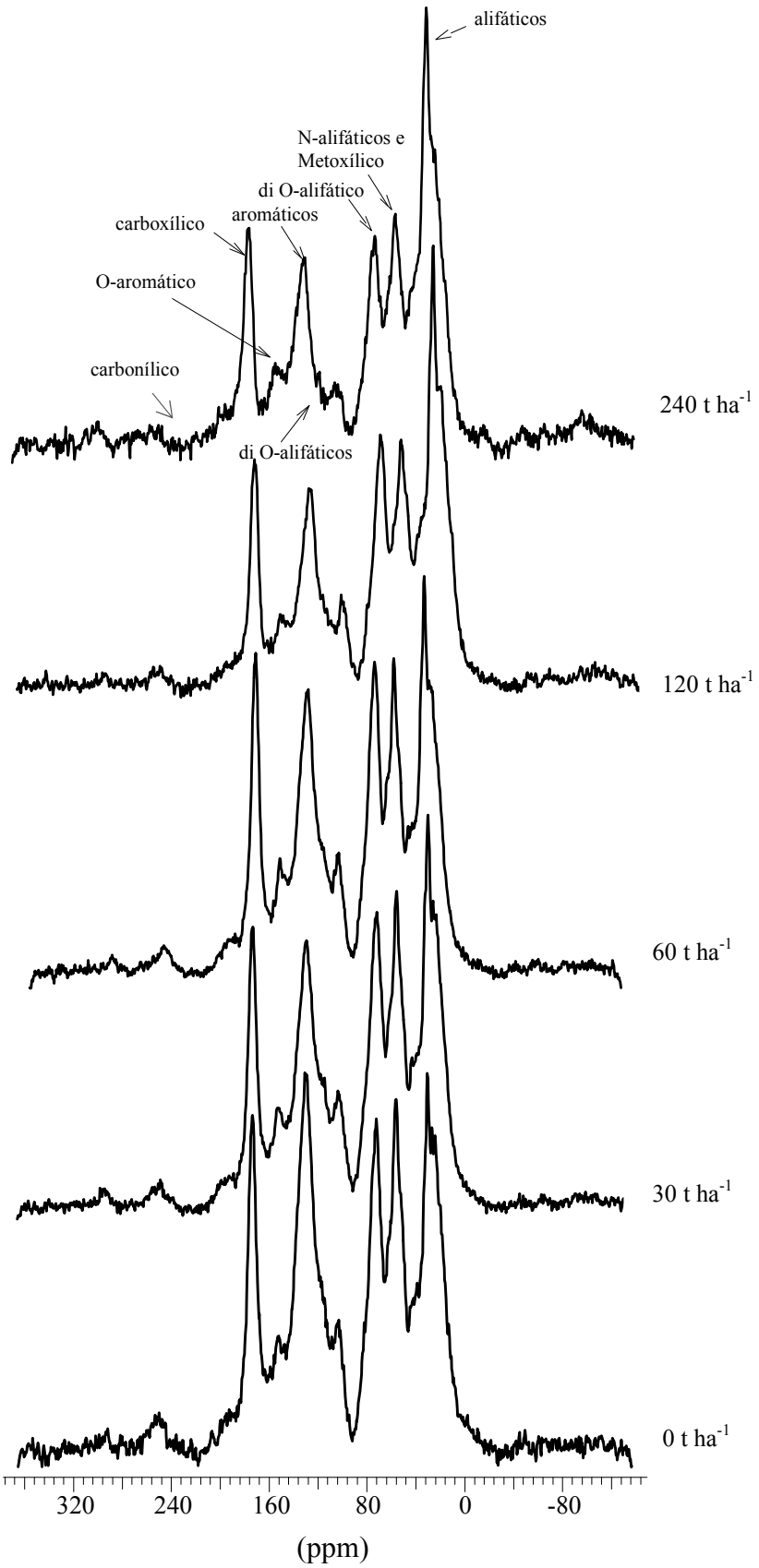

Figura 28 - Espectros de ^{13}C RMN dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 10-20 cm de profundidade

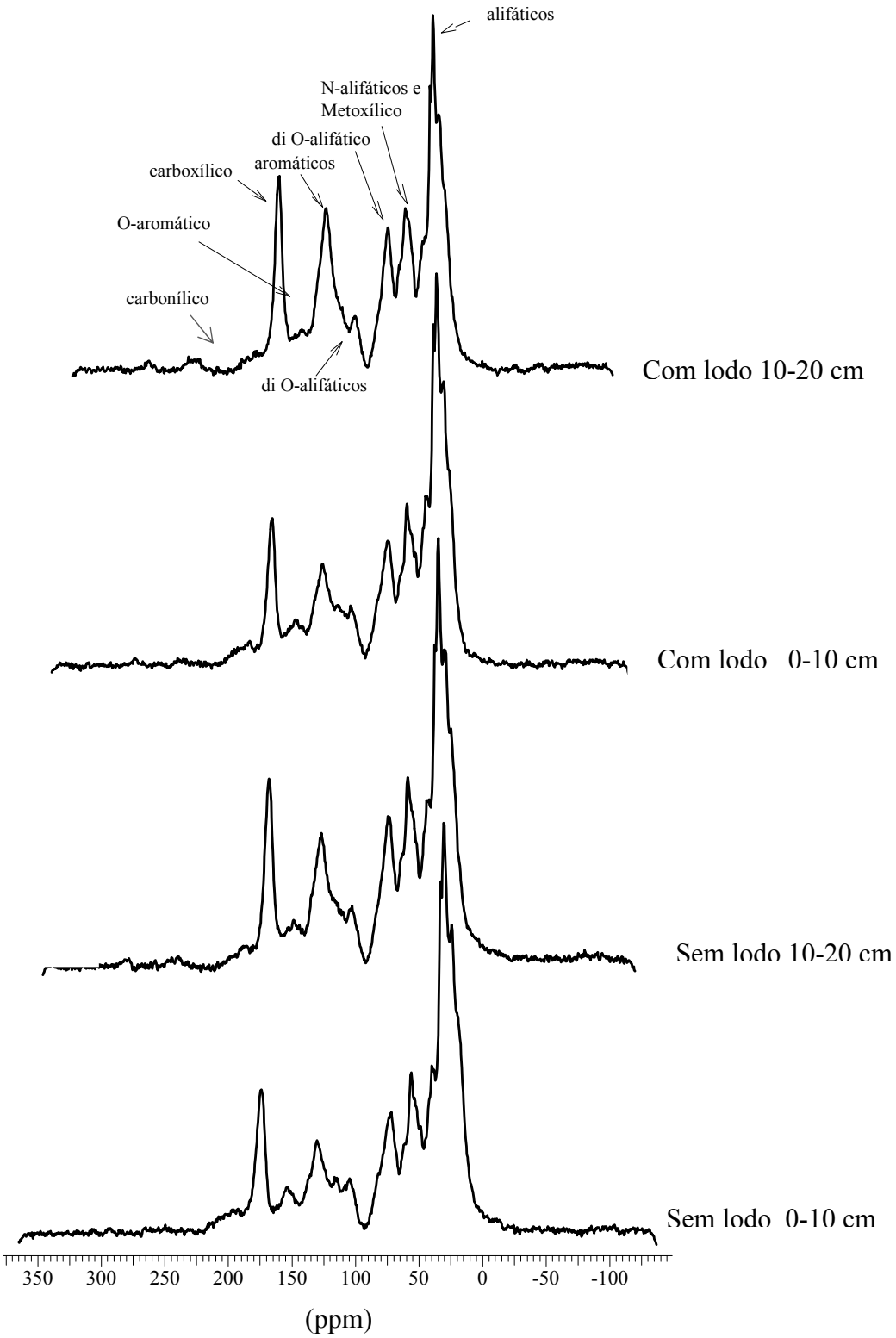

Figura 29 - Espectros de ^{13}C RMN dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses após sua aplicação

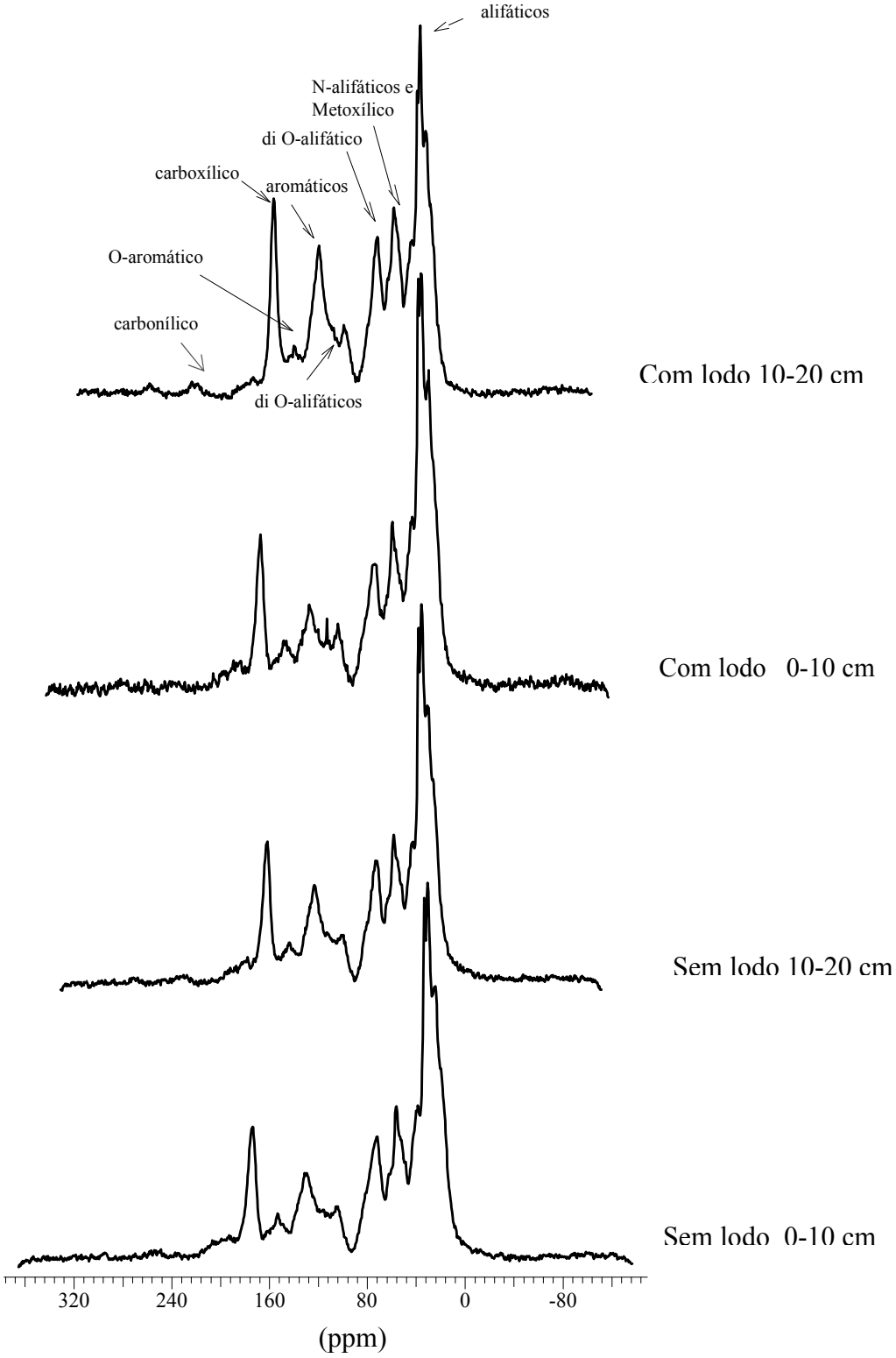

Figura 30 - Espectros de ^{13}C RMN dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 7 anos após sua aplicação

Os graus de aromaticidade e alifaticidade dos ácidos húmicos foram calculados a partir da área dos espectros de ^{13}C RMN, experimentos I e II, e estão apresentados na Tabela 3.

De modo geral, houve aumento um decréscimo da aromaticidade dos ácidos húmicos em função do aumento das doses de lodo de esgoto aplicadas no solo (Figura 31). Isso se deve à incorporação de material mais alifático no solo, não compostado, corroborando os resultados obtidos por FIL e FTIR. Entretanto, no experimento II, esse efeito só pode ser observado na profundidade de 0-10 cm, sendo que houve um aumento da alifaticidade após 7 anos da aplicação do lodo (Figura 32).

Tabela 3 - Grau de aromaticidade e alifaticidade dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico sob cultivo de milho e de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto

Doses de lodo de esgoto (t ha^{-1})	Área das bandas dos espectros de ^{13}C RMN										Aromaticidade	Alifaticidade
	0-45	45-60	60-110	110-140	140-160	160-185	185-230	0-110	0-160	110-160		
	(ppm)										(%)	
Experimento I												
Doses acumuladas												
0 (1)	0,27	0,12	0,21	0,22	0,07	0,11	0,01	0,60	0,89	0,29	32,90	67,10
0 (2)	0,21	0,09	0,17	0,17	0,06	0,10	0,04	0,47	0,69	0,23	32,73	67,27
0 (3)	0,22	0,10	0,20	0,20	0,06	0,11	0,02	0,52	0,78	0,26	33,07	66,93
30 (1)	0,25	0,11	0,20	0,17	0,06	0,10	0,03	0,56	0,79	0,23	29,31	70,69
30 (2)	0,24	0,09	0,18	0,15	0,06	0,10	0,05	0,51	0,72	0,20	28,64	71,36
30 (3)	0,27	0,11	0,23	0,18	0,06	0,10	0,02	0,60	0,84	0,24	28,21	71,79
60 (1)	0,25	0,10	0,19	0,15	0,05	0,09	0,03	0,54	0,74	0,20	27,14	72,86
60 (2)	0,25	0,09	0,18	0,14	0,05	0,09	0,04	0,52	0,72	0,19	27,05	72,95
60 (3)	0,24	0,10	0,20	0,17	0,06	0,11	0,03	0,53	0,76	0,22	29,63	70,37
120 (1)	0,30	0,10	0,19	0,14	0,06	0,10	0,04	0,59	0,78	0,20	24,94	75,06
120 (2)	0,29	0,10	0,19	0,13	0,05	0,09	0,04	0,19	0,76	0,18	23,44	76,56
120 (3)	0,34	0,12	0,21	0,15	0,05	0,10	0,01	0,67	0,87	0,20	22,97	77,03
240 (1)	0,30	0,10	0,18	0,14	0,05	0,10	0,03	0,59	0,78	0,19	24,91	75,09
240 (2)	0,24	0,09	0,18	0,13	0,05	0,09	0,04	0,51	0,69	0,19	26,86	73,14
240 (3)	0,35	0,11	0,18	0,13	0,06	0,10	0,02	0,64	0,83	0,19	22,83	77,17
Experimento II												
8 meses após a aplicação												
Sem lodo (4)	0,39	0,09	0,15	0,10	0,04	0,08	0,04	0,63	0,77	0,14	18,23	81,77
Sem lodo (5)	0,40	0,10	0,16	0,12	0,04	0,10	0,02	0,66	0,82	0,16	19,57	80,43
Com lodo (4)	0,40	0,10	0,17	0,12	0,05	0,09	0,03	0,68	0,85	0,17	19,52	80,48
Com lodo (5)	0,35	0,10	0,17	0,16	0,05	0,11	0,02	0,62	0,83	0,21	24,82	75,18
7 anos após a aplicação												
Sem lodo (4)	0,39	0,10	0,16	0,10	0,04	0,08	0,04	0,65	0,79	0,15	18,34	81,66
Sem lodo (5)	0,38	0,09	0,15	0,11	0,04	0,09	0,04	0,63	0,77	0,15	18,95	81,05
Com lodo (4)	0,41	0,10	0,16	0,09	0,04	0,08	0,04	0,66	0,79	0,13	16,60	83,40
Com lodo (5)	0,39	0,13	0,21	0,16	0,04	0,11	0,00	0,73	0,93	0,20	21,68	78,32

(1)camada de 0-5 cm de profundidade; (2)camada de 5-10 cm de profundidade; (3)camada de 10-20 cm de profundidade; (4)camada de 0-10 cm de profundidade; (5)camada de 10-20 cm de profundidade.

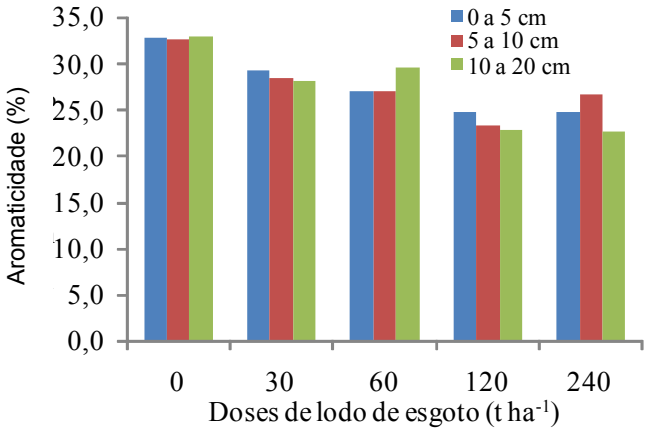

Figura 31 - Grau de aromaticidade dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade

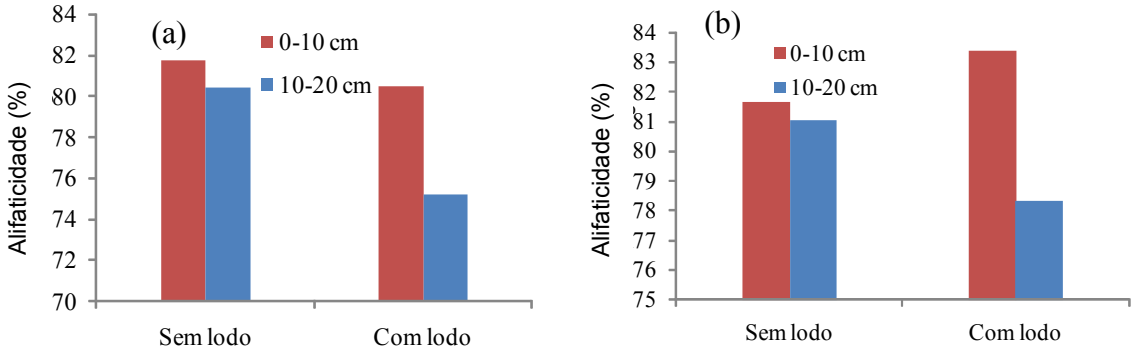

Figura 32 - Grau de alifaticidade dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto com adição e sem adição de lodo de esgoto, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm de profundidade aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) após sua aplicação

5.2.5. Fluorescência de Luz UV-vis

Os espectros de fluorescência foram obtidos nos modos de emissão e varredura sincronizada e, por meio deles, foi calculado o grau de humificação das amostras de ácidos húmicos segundo as metodologias de Kalbitz et al. (1999); Milori et al. (2002) e Zsolnay et al. (1999).

O deslocamento no máximo de intensidade de fluorescência de menor para maior comprimento de onda está associado com um aumento no número de núcleos aromáticos altamente substituídos e/ou com um sistema conjugado insaturado capaz de exibir alto grau de ressonância. Nos espectros (Figuras 33a, b, c e 34a, b), obtidos pelo método Kalbitz et al. (1999), notam-se dois picos: um em torno de 456 nm e 375 nm; deste modo, usou-se a razão I_{456}/I_{375} como índice de humificação.

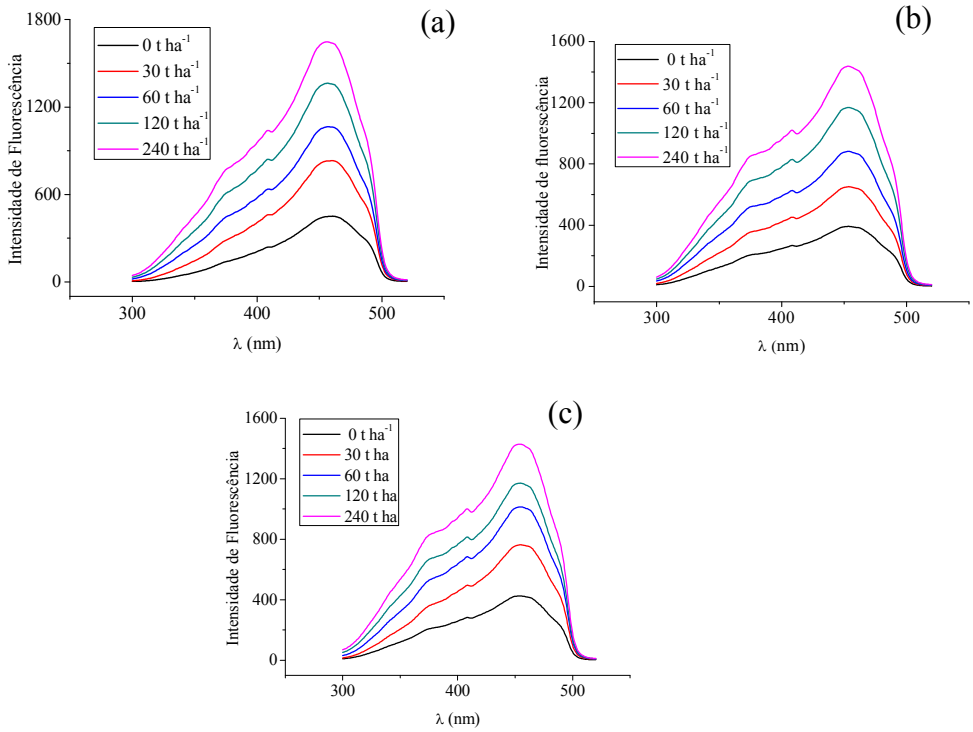

Figura 33. Espectros de Fluorescência (KALBTIZ et al., 1999) dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5 (a), 5-10 (b) e 10-20 (c) cm de profundidade.

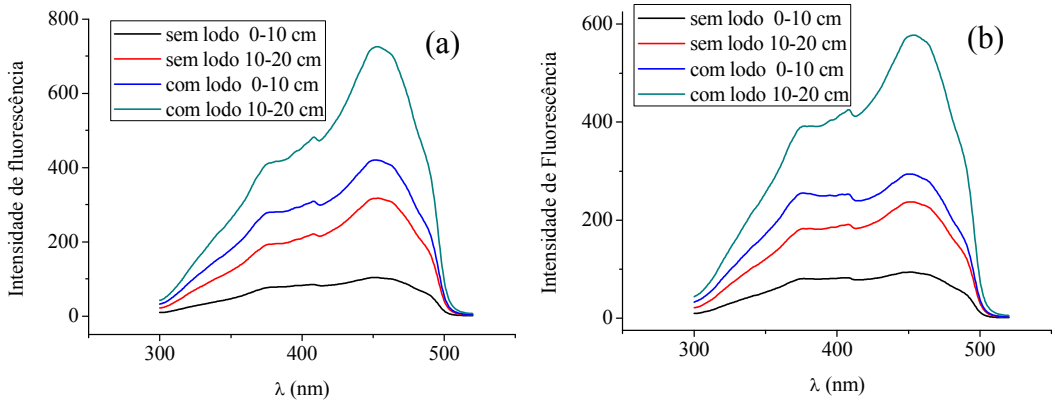

Figura 34 - Espectros de Fluorescência (Kalbtiz et al., 1999) dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) meses após sua aplicação

Observa-se na Figura 35 o índice de humificação das amostras de ácidos húmicos do experimento I, sob cultivo de milho. Nota-se que existem evidências de que o incremento das doses de lodo de esgoto provocou um decréscimo no grau de humificação, corroborando os resultados obtidos por Santos (2006), bem como,

resultados mencionados acima, obtidos por meio da FIL, FTIR e RMN. Isso ocorre devido ao alto grau de alifaticidade do lodo de esgoto que foi aplicado e incorporado até a profundidade de 20 cm do solo. Entretanto, esse efeito só foi observado na profundidade de 0-10 cm do solo sob floresta, tanto aos 8 meses quanto aos 7 anos após a aplicação do lodo (Figura 36), visto que o lodo de esgoto não foi incorporado ao solo e sim, aplicado somente em superfície.

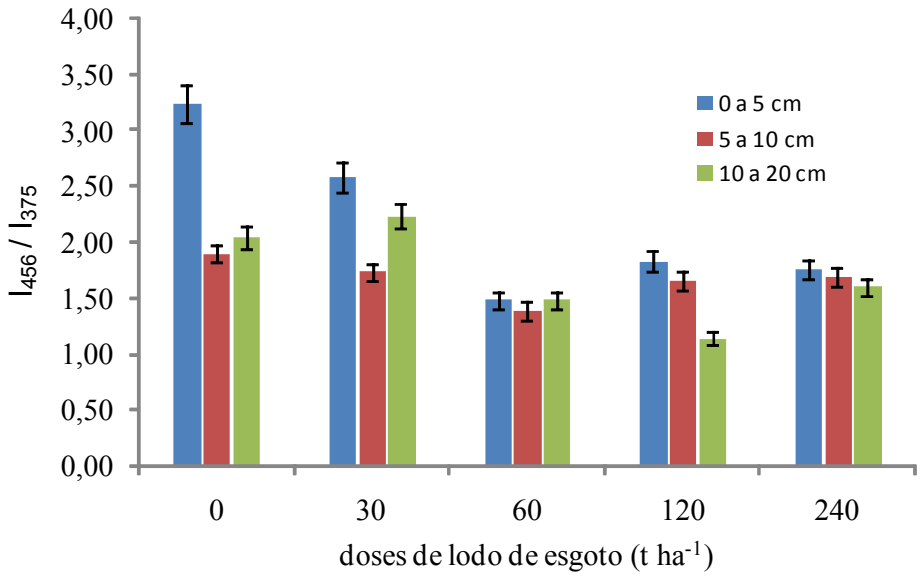

Figura 35 - Índice de humificação (I_{456};I_{375}) obtido pela metodologia de Kalbtiz et al. (1999) para os AH extraídos dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade

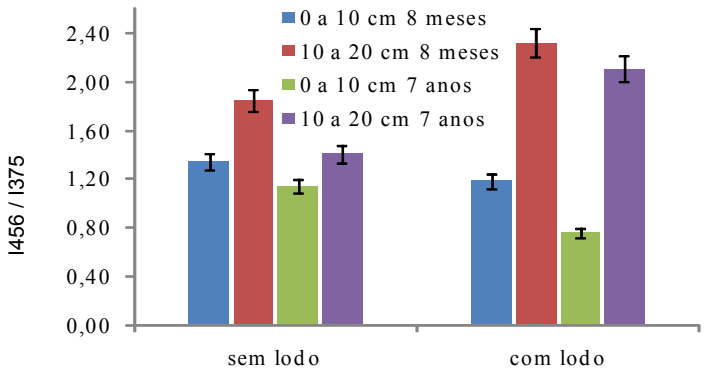

Figura 36 - Índice de humificação (I_{456};I_{375}) obtido pela metodologia de Kalbtiz et al. (1999) para os ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) meses após sua aplicação

Os espectros gerados segundo a proposta de Milori et al. (2002) são apresentados nas Figuras 37a, b, c e 38a, b. Para ambos os experimentos nota-se bandas largas na região de 520 nm e, uma diminuição da área de fluorescência com o aumento das doses de lodo de esgoto, em todas as profundidades. Isso pode ser facilmente visualizados na Figura 39. Já no experimento sob floresta (Figura 40), nota-se essa diminuição do grau de humificação dos ácidos húmicos com a adição do lodo, apenas na profundidade de 0-10 cm aos 7 anos após sua aplicação, que pode ser explicado, também, pelo incremento de serapilheira no solo, efeito secundário da aplicação do lodo de esgoto.

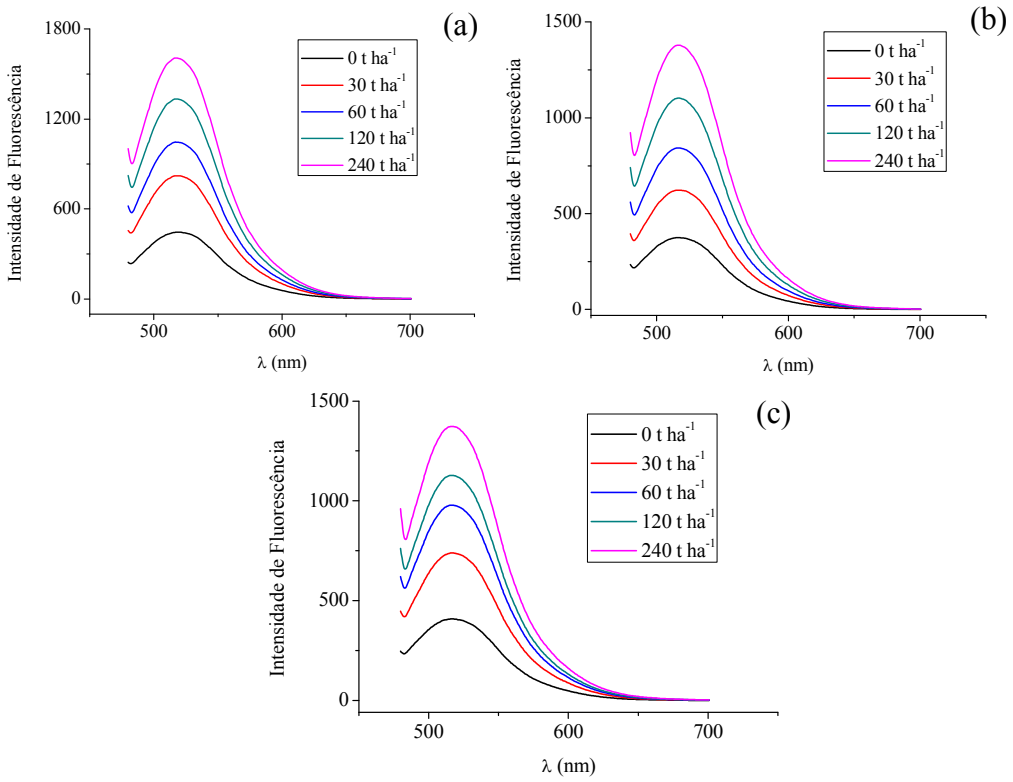

Figura 37 - Espectros de Fluorescência (MILORI et al., 2002) dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5 (a), 5-10 (b) e 10-20 (c) cm de profundidade

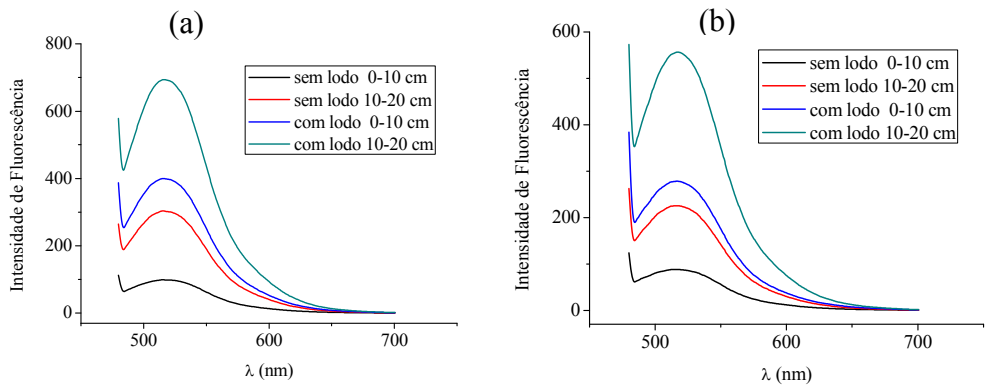

Figura 38 - Espectros de Fluorescência (MILORI et al., 2002) dos ácidos húmicos um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) meses após sua aplicação

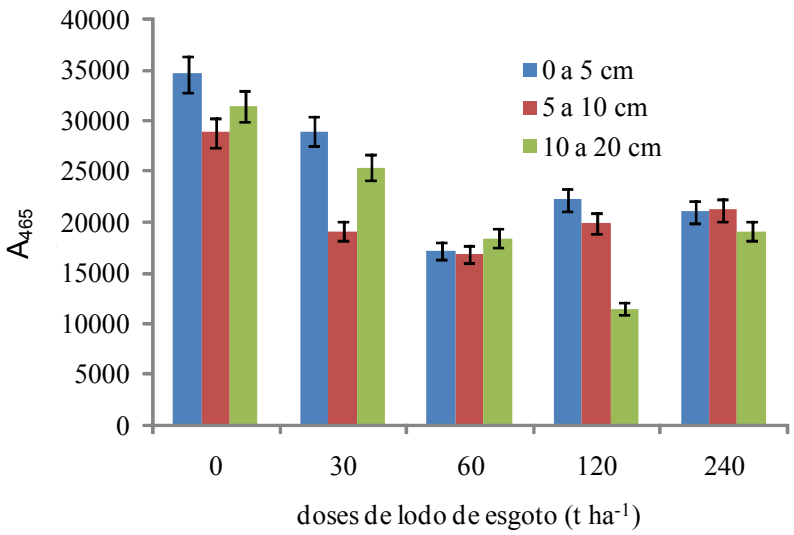

Figura 39 - Índice de humificação (A_{465}) obtido pela metodologia de Milori et al. (2002) para os AH extraídos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade

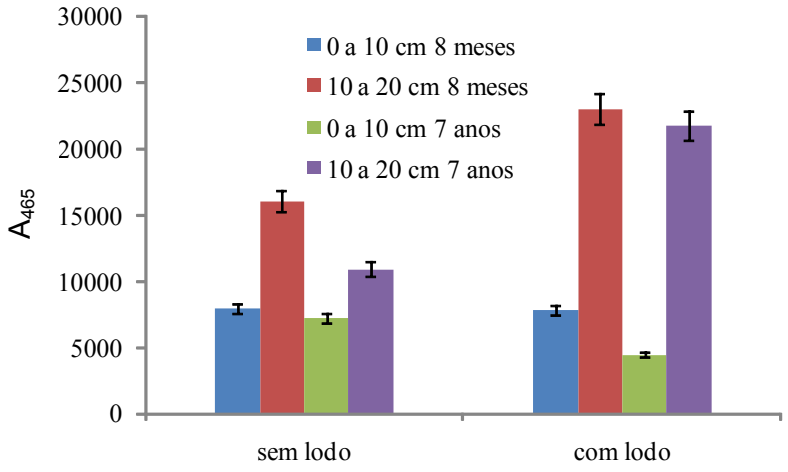

Figura 40 - Índice de humificação (A_{465}) obtido pela metodologia de Milori et al. (2002) para os AH extraídos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) meses após sua aplicação

Os espectros gerados a partir da metodologia prosposta por Zsolnay et al. (1999) considera que a humificação da MO leva à condensação de anéis aromáticos e este processo faz com que a fluorescência destes grupos se desloque para o vermelho. Assim, temos espectros com bandas largas e com máximo em torno de 510 nm (Figuras 41 e 42).

A fluorescência em comprimentos de onda longos está associada a sistemas insaturados conjugados e/ou núcleos aromáticos altamente substituídos por grupos de carbonila e carboxílicos (SENESI, 1999; RIVERO et al., 1998).

Corroborando os resultados obtidos por meio das metodologias de Milori et al. (2002) e por Kalbtiz, nota-se que o incremento das doses de lodo de esgoto no solo propiciou uma redução no grau de humificação no experimento I (Figura 43) e, no experimento sob floresta, esse efeito foi observado somente na profundidade de 0-10 cm aos 7 anos após a aplicação do lodo de esgoto (Figura 44).

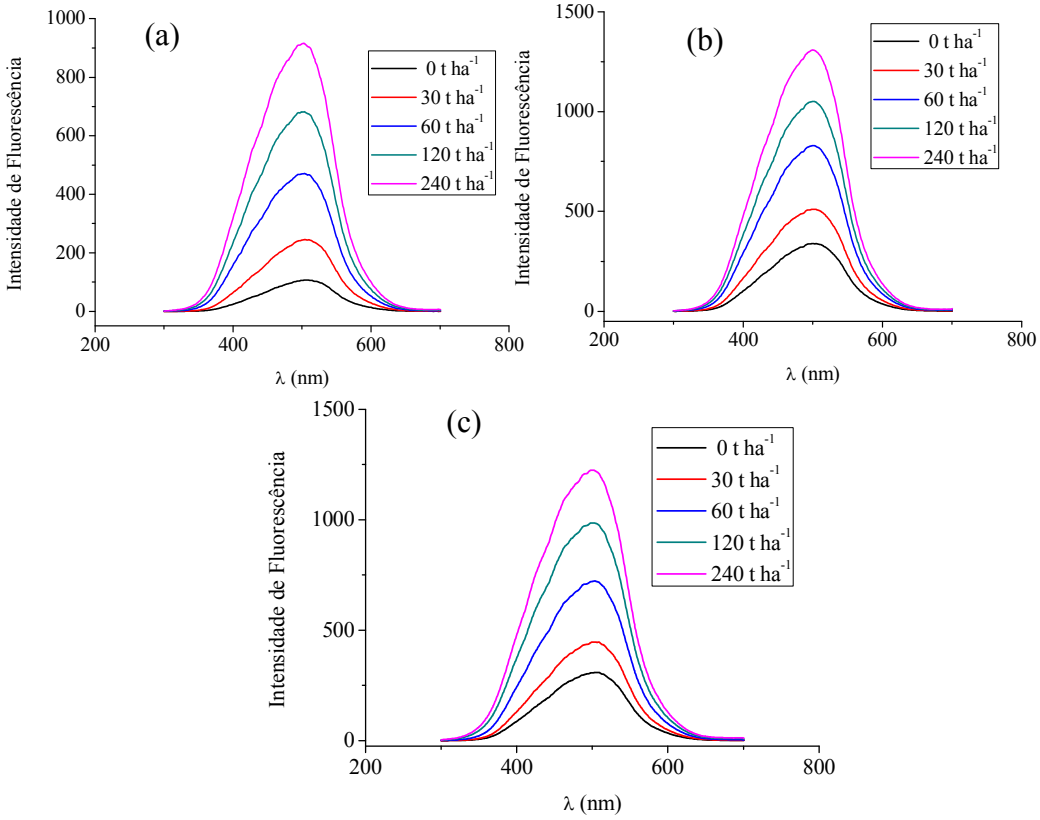

Figura 41 - Espectros de Fluorescência (ZSOLNAY et al., 1999) dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5 (a), 5-10 (b) e 10-20 (c) cm de profundidade.

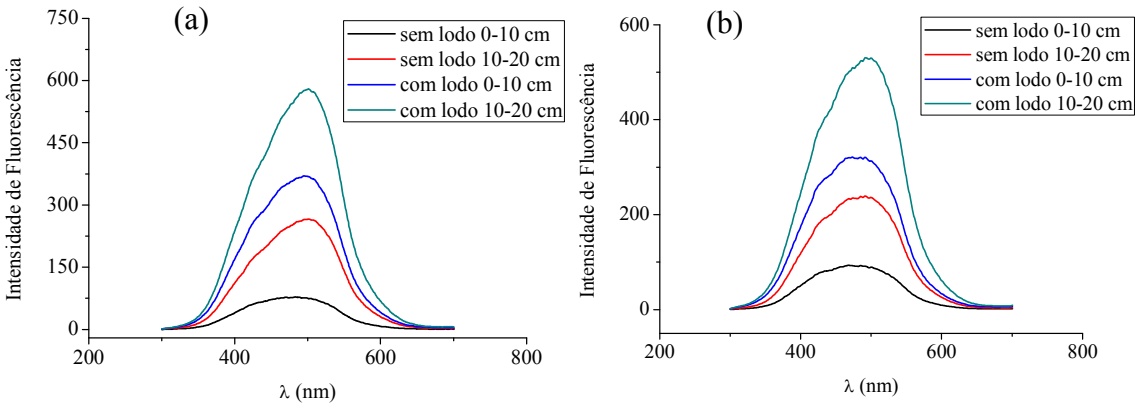

Figura 42 - Espectros de Fluorescência (ZSOLNAY et al., 1999) dos ácidos húmicos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) meses após sua aplicação

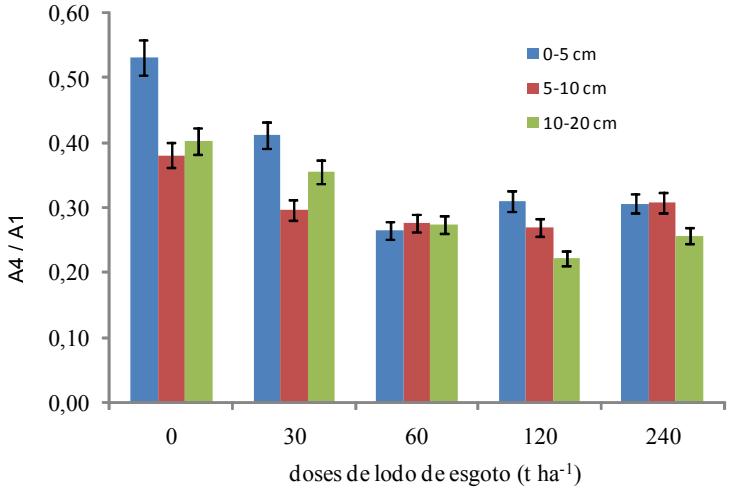

Figura 43 - Índice de humificação obtido pela metodologia de Zsolnay et al. (1999) para os AH extraídos de um Latossolo Vermelho distroférrico cultivado com milho em função do efeito residual de doses acumuladas de lodo de esgoto na camada de 0-5, 5-10 e 10-20 cm de profundidade

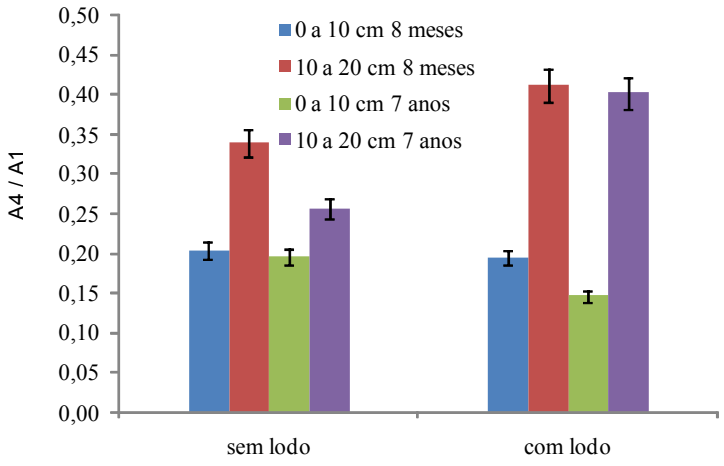

Figura 44 - Índice de humificação obtido pela metodologia de Zsolnay et al. (1999) para os AH extraídos de um Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto em função de doses de lodo de esgoto na camada de 0-10 e 10-20 cm de profundidade, aos 8 meses (a) e aos 7 anos (b) meses após sua aplicação

6. CONCLUSÕES

As seis aplicações sucessivas de lodo de esgoto no Latossolo Vermelho distroférrico, sob cultivo de milho, permitem que seu efeito residual benéfico - a incorporação de carbono no solo - seja fortemente visualizado após seis anos da sua última aplicação, nas condições analisadas. Essas aplicações proporcionam um aumento da quantidade de carbono no solo, bem como provocam mudanças na estrutura das substâncias húmicas, como a diminuição da aromaticidade dos ácidos húmicos, evidenciadas pelas técnicas espectroscópicas utilizadas: FIL, FTIR, RMN e Fluorescência de UV-Vis.

Uma única aplicação de 21,3 t ha^{-1} de lodo de esgoto num Latossolo Vermelho distrófico sob floresta de eucalipto é suficiente para incrementar o conteúdo de carbono deste solo, porém não é capaz de provocar mudanças muito evidentes na estruturas dos ácidos húmicos, nas condições analisadas.

A incorporação do carbono no solo é dependente do tamanho dos agregados, sendo que as partículas menores apresentam maior conteúdo e menor grau de humificação. Verifica-se que o conteúdo de carbono, no experimento sob monocultura de milho, foi influenciado tanto pela aplicação das doses de lodo de esgoto quanto pelo tamanho de partículas, especialmente na profundidade de 5-10 cm.

A presença da MO fresca, não compostada, é observada pelas diferentes técnicas espectroscópicas, sendo que sua estabilidade é dependente, não somente das características estruturais da MO, mas também de como ela interage com a fração mineral.

A técnica espectroscópica que melhor refletiu os efeitos da aplicação do lodo de esgoto, em ambos os experimentos, foi a Ressonância Magnética Nuclear. Os espectros de RMN mostram, de maneira clara, que a aplicação do lodo incrementou a alifaticidade dos ácidos húmicos do solo, oriundas provavelmente de resíduos provenientes de óleos, ceras, graxas encontrados no lodo, com consequente diminuição relativa da proporção de estruturas aromáticas. Esse efeito é mais evidente conforme aumentam as doses aplicadas.

REFERÊNCIAS

ABREU JUNIOR, C. H.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P.; SIMOES, M. L.; DA SILVA, W. T. L. Métodos analíticos utilizados em química do solo. In: MELO, V. F.; ALLEONI, R. F. (Org.). **Química e mineralogia do solo**. Viçosa: SBCS, 2009. v. 2, p. 529-685.

ABREU JUNIOR, C. H.; BOARETTO, A. E.; MURAOKA, T.; KIEHL, J. C. Uso agrícola de resíduos orgânicos: propriedades químicas do solo e produção vegetal. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 391-479, 2005.

AMALFITANO, C.; PIGNALOSA, V.; AURIEMMA, L.; RAMUNNI, A. The contribution of lignin to the composition of humic acids from a wheat-straw amended soil during 3 years of incubation in pots. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 43, p. 495-504, 1992.

BAES, A. U.; BLOOM, P. R. Fulvic acid ultraviolet-visible spectra: Influence of Solvent and pH. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 54, p. 1248-1254, 1990.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C. A. Effect of notill cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 95-104, 2000.

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

BERTON, R. S.; VALADARES, J. M. A. S.; CAMARGO, O. A.; BATAGLIA, O. C. Peletilização do lodo de esgoto e adição de $CaCO_3$ na produção de matéria seca e absorção de Zn, Cu e Ni pelo milho em três Latossolos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 685-691, 1997.

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

CARVALHO JÚNIOR, J.; BRAGANÇA, R.; RIBEIRO, E.; BENITES, V. Comparação entre métodos de determinação de carbono orgânico do solo e das frações húmicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Informação, globalização uso de solo; anais**. Rio de Janeiro: SBCS; EMBRAPA, 1997.

CHEN, Y. Nuclear magnetic resonance, infra-red and pyrolysis: application of spectroscopic methodologies to maturity determination of composts. **Compost Science & Utilization**, London, v. 11, n. 2, p. 152-168, 2003.

CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provide on humic substances by E4/E6 ratios. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 41, p. 352-358, 1977.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Norma P.4230**: Aplicação de biossólido de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas: critérios para projeto e operação. São Paulo, 1999. 35 p.

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

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução 375**: Uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados: critérios para projeto e operação. Brasília, DF, 2006. 31 p.

DA ROS, C. O.; AITA, C.; CERETTA, C. A.; FRIES, M. R. Lodo de esgoto: efeito imediato no milheto e residual na associação aveia-ervilhaca. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 17, p. 257-261, 1993.

DAVIES, B. E. Loss-on-ignition as an estimate of soil organic matter. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 38, p. 347-353, 1974.

DIAS, B. O.; SILVA, C. A.; MERCÊS, E.; SOARES, B.; BETTIOL, W.; GUERREIRO, M. C.; BELIZÁRIO, M. H. Infravermelho na caracterização de ácidos húmicos de latossolo sob efeito de uso contínuo de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 885-894, 2009.

DIAS, B. O.; SILVA, C. A.; SOARES, E. M. B.; BETTIOL, W. Estoque de carbono e quantificação de substâncias húmicas em latossolo submetido a aplicação contínua de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 701-711, 2007.

DIEKOW, J. **Estoque e qualidade da matéria orgânica do solo em função de sistemas de culturas e adubação nitrogenada no sistema plantio direto**. 2003. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DOBBSS, L. B.; RUMJANECK, V. M.; BALDOTTO, M. A.; VELLOSO, A. C. X.; CANELLAS, L. P. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de latossolos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 51-63, 2009.

DOMINGUES, R. R. **Estabilidade da matéria orgânica e teores de metais pesados em solo tratado sucessivamente com logo de esgoto**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2013.

DOU, H.; ALVA, A. K.; KHAKURAL, B. R. Nitrogen mineralization from citrus tree residues under different production conditions. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, p. 1226-1232, 1997.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

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

FERNANDES, S. A. P.; BETTIOL, W.; CERRI, C. C. Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 65-77, 2005.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Sotware) e planejamento de experimentos** – SISVAR 5.0 (Build 67). Lavras: DEX/UFLA, 2003.

FONTANA, A. **Caracterização química e espectroscópica da matéria orgânica em solos do Brasil**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

FIALHO, L. L. **Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos.** 2007. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

FIRME, L. P. **Produção de madeira e elementos potencialmente tóxicos no sistema solo - eucalipto tratado com lodo de esgoto**. 2009. 81 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FUENTES, M.; GONZALEZ-GAITANO, G.; GARCIA-MINA, J. M. The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soil and composts. **Organic Geochemistry**, Amsterdam, v. 37, p. 1949-1959, 2006.

GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; COSTA, F.; PASCUAL, J.A. Phytotoxicity due to the agricultural use of urban wastes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 59, p. 313-319, 1992.

GARCÍA-ORENES, F.; GUERRERO, C.; MATAIX-SOLERA, J.; NAVARRO-PEDRENO, J.; GOMEZ, I.; MATAIX-BENEYTO, J. Factors controlling the aggregate stability and bulk density in two different degraded soils amended with biosolids. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 82, p. 65-76, 2005.

GATTO, A.; BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F.; SILVA, I. R.; MENDONÇA, E. S.; VILLANI, M. A. Comparação de métodos de determinação de carbono orgânico em solos cultivados com eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 735-740, 2009.

GIGLIOTTI, G.; GIUSQUIANI, P. L.; BUSINELLI, D.; MACCHIONI, A. Composition changes of dissolved organic matter in a soil amended with municipal waste compost. **Soil Science**, New Brunswick, v. 162, p. 919–926, 1997.

GLATZELA, S.; KALBITZ, K.; DALVAC, M.; MOOREC, T. Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs. **Geoderma**, Amsterdam, v. 113, p. 397-411, 2003.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L. A.; MILORI, D. M. B. P.; CAMARGO, A. O.; BERTON, R.; BETTIOL, W. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge-amended Oxisols by electron paramagnetic resonance. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 91, p. 95-100, 2006.

HOHLA, G. N.; JONES, R. L.; HINESLY, T.D. The effect of anaerobically digested sewage sludge on organic fractions of blount silt loam. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 7, p. 559-563, 1978.

JORDÃO, C. P.; COSTA, E. D.; BRUNE, W.; GOURLART, A. T. Adsorção de cátions metálicos em ácidos húmicos de Latossolo. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, p. 517-520, 1993.

JORGE, J. A.; CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S. Condições físicas de um Latossolo Vermelho-Escuro quatro anos após aplicação de lodo de esgoto e calcário. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 15, p. 237-240, 1991.

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

KELLEHER, B.; SIMPSON, A. J. Humic substances in soils: Are they really chemically distinct? **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 40, p. 4605-4611, 2006.

MALDONADO, C. A. B. **Fertilidade do solo, nutrição e crescimento de plantas de eucalipto ao longo de 46 meses após aplicação de lodo de esgoto**. 2009. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MAIO, M. M.; SAMPAIO, R. A.; NASCIMENTO, A. L.; PRATES, F. B. S.; RODRIGUES, M. N.; SILVA, H. P.; DIAS, A. N.; FREITAS, C. E. S. Atributos físicos do solo, adubado com lodo de esgoto e silicato de cálcio e magnésio. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 6, p. 823-830, 2011.

MARQUES, M. O. **Incorporação de lodo de esgoto em solo cultivado com cana-de-açúcar**. 1996. 111 p. (Tese de Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal,1996.

MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P.; DA SILVA, W. T. L.; SIMOES, M. L. EPR, FTIR, Raman, UV-visible light absorption and fluorescence spectroscopies in studies of humic substances. In: SENESI, N.; XING, B.; HUANG, P. M. (Org.). **Biophysico-chemical processes involving natural organic matter in environmental systems.** Hoboken, New Jersey: Wiley, 2009. chap. 16, p. 651-728.

McPHIE, P. Enzyme purification and related techniques: dialysis. **Methods in Enzymology**, New York, v. 22, p. 25-175, 1971.

MELO, V. P. **Propriedades químicas e disponibilidade de metais pesados para a cultura do milho em dois latossolos que receberam a adição de biossólido**. 2002. 134 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2002.

MELO, V. P.; BEUTLER, N. A.; SOUZA, Z. M.; CENTURION, J. F; MELO, W.J. Atributos físicos de Latossolos adubados durante cinco anos com biossólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 67-72, 2004.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R. A.; LEITE, S. A. S. Efeito de doses crescentes de lodo de esgoto sobre as frações da matéria orgânica e CTC de um Latossolo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 18, p. 449-455, 1994.

MIIKKI, V.; SENESI, N.; HANNIKEN, K. Characterization of humic material formed by composting of domestic and industrial biwastes. Part 2: Spectroscopic evaluation of humic acid structures. **Chemosphere**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1639-1651, 1997.

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

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; GALETI, H. V. A.; GONZALEZ-PEREZ, M.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; SALTON, J. **Índice de humificação obtido através da fluorescência induzida por laser**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2004. 17 p.

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

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C. **Fluorescência induzida por laser para análise da matéria orgânica de solos intactos**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2002. 18 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 3).

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. 626 p.

NARIMOTO, K. M. **Técnicas espectroscópicas aplicadas à análise a matéria orgânicas do solo em pomares de citros sob adição de lodo de esgoto**. 2006. 112 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: BLACK, C. A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Part 3. Chemical methods. Madison: SSSA; ASA, 1996. p. 961-1010.

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

OLIVEIRA, F. C.; MATIAZZO, M. E.; MARCIANO, C. R.; ROSSETO, R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em Latossolo Amarelo distrófico cultivado com cana-de-açucar: carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 505-519, 2002.

OLIVEIRA, F. C. **Disposição de lodo de esgoto e composto de lixo urbano num Latossolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar.** 2000. 247 f. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

OLIVEIRA, F. C.; MARQUES, M. O.; BELLINGIERI, P. A.; PERECIN, D. Lodo de esgoto como fonte de macronutrientes para a cultura do sorgo granífero. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, p. 360-367, 1995.

OUTMANE, A.; D`ORAZIO, V.; HAFIDI, M.; SENESI, N. Chemical and physicochemical characterization of humic acid-like materials from composts. **Compost Science / Land Utilization**, Emmaus, v. 10, n. 1, p. 39-46, 2002.

PEIXOTO, R. T. dos G. Matéria orgânica e a dinâmica das cargas elétricas dos solos: processos e consequências. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBCS; EMBRAPA, CNPS, 1997. 1 CDROM.

PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. **Analytical Chimica Acta.** Amsterdam, v. 337, p. 133-149, 1997.

PICCOLO, A. Humus and soil conservation. In: _____. (Ed.). **Humic substances in terrestrial ecosystems**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 225-264.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CANCHERI, G. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 47, p. 319-328, 1996.

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis Publisher, 1994. 313 p.

PRIMO, D. C. **Manejo da adubação orgânica para culturas oleaginosas e alimentícias na região semi-árida**. 2012. 113 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

RAISON, R. J.; CONNELL, M. J.; KHANN, P. K. Methodology for studying fluxes of soil mineral-N in situ. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 521-530, 1987.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico; Fundação IAC, 1996. 285 p. (Boletim Técnico, 100).

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

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas**: interações com espécies metálicas. São Paulo: Ed. UNESP, 2003.

SANTOS, L. M.; SIMÕES, M. L.; DA SILVA, W. T. L.; MILORI, D. M. B. P.; MONTES, C. R.; MELFI, A. J.; MARTIN-NETO, L. Caracterização química e espectroscópica de solos irrigados com efluente de esgoto tratado. **Eclética Química**, São Paulo, n. 1, v. 34, p. 39-44, 2009.

SANTOS, C. H. **Análises espectroscópicas da matéria orgânica de solos sob aplicação de águas residuárias**. 2008. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

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

SCHNITZER, M. Soil organic matter - The next 75 years. **Soil Science**, New Brunswick, v. 151, n. 1, p. 41-58, 1991.

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

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, New Brunswick, v. 162, n. 2, p. 115-130, 1997.

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

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

SENESI, N. Application of electron spin resonance and fluorescence spectroscopies to the study of soil humic substances. In: In: KUBÁT, J. (Ed.). **Humus, its structure and role in agriculture and environment**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. p. 11-26.

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

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

SEGNINI, A.; CARVALHO, J. L. N.; BOLONHEZI, D.; MILORI, D. M. B. P.; DA SILVA, W. T. L.; SIMOES, M. L.; CANTARELLA, H.; DE MARIA, I. C.; MARTIN-NETO, L. Carbon stock and humification index of organic matter affected by sugarcane straw and soil management. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 321-326, 2013.

SEGNINI, A.; SOUZA, A. A.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D. M. B. P.; DA SILVA, W. T. L.; BONAGAMBA, T. J.; POSADAS, A.; QUIROZ, Z. Characterization of Peatland Soils from the High Andes through C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 77, p. 673-679, 2013.

SEGNINI, A.; SANTOS, L. M.; SILVA, W. T. L.; MARTIN-NETO, L.; BORATO, C. E.; MELO, W. J.; BOLONHEZI, D. Estudo comparativo de métodos para a determinação da concentração de carbono em solo com altos teores de Fe (Latossolos). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 94-97, 2008.

SEGNINI, A. **Estrutura e estabilidade da matéria orgânica em áreas com potencial de seqüestro de carbono no solo**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SILVA, F. C. da (ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** 2. ed. rev. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 370 p.

SIMÕES, M. L. **Estudos de interações hidrofóbicas em substâncias húmicas e componentes do solo utilizando análises espectroscópicas.** 2005. Tese (Doutorado – Ciências) – Departamento de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SIMPSON, A. J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, London, v. 40, p. 572-582, 2002.

SILVA, R. R.; LUCENA, G. N.; ABRAHÃO, V. A. P.; MATOS, A. T.; COELHO, M. S.; PIMENTA, L. A. Caracterização qualitativa de substâncias húmicas em substratos orgânicos por espectroscopia no Uv-Visível. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 52., 2012, Recife. **Anais...** Recife: SBQ, 2012. 1 CD-ROM.

SILVA, L. B.; DICK, D. P.; INDA JUNIOR, A. V. Solos subtropicais de altitude: atributos químicos, teor de matéria orgânica e resistência à oxidação química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1167-1171, 2008.

SILVA, L. S.; CAMARGO, F. A. O.; CERETTA, C. A. Composição da fase sólida orgânica do solo. In: MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. 2. ed. Porto Alegre: Genesis, 2004. p. 73-99.

SILVA, J. E.; RESCK, D. V. S.; SHARMA, R. D. Alternativa agronômica para o biossólido produzido no Distrito Federal. I. Efeito na produção de milho e adição de metais pesados em Latossolo no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 487-495, 2002.

SILVA, A. C.; TORRADO, P. V.; ABREU JUNIOR, J. S. Métodos de quantificação de matéria orgânica do solo. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 21-26, 1999.

SOARES, E. M. B.; SILVA, C. A.; DIAS, B. O.; BETTIOL, W.; BELIZÁRIO, M. H. Frações da matéria orgânica de Latossolo sob influência de doses de lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 9, p. 1231-1240, 2008.

SOLLINS, P.; HOMANN, P.; CALDWELL, B. A. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. **Geoderma**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-105, 1996.

SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado**: correção do solo e adubação. 2. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. p. 129-144.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry**: genesis, composition, reactions. 2. ed. New York: John Wiley, 1994. 496 p.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: BLACK, C. A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Part 3. Chemical methods. Madison: SSSA; ASA, 1996. p. 1011-1069.

VAZ, L. M. S.; GONÇALVES, J. L. M. Uso de biossólidos em povoamento de *Eucalyptus grandis*: efeito em atributos químicos do solo, no crescimento, e na absorção de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 747-758, 2002.

USEPA. **Standards for the use or disposal of sewage sludge**. 40 CFR 503. Washington, DC, 1996. p. 655-686.

ZBYTNIEWSKI, R.; BUSZEWSKI, B. Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost. Part 1: chemical and spectroscopic properties. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 471–478, 2005.

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

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**, Oxford, v. 38, p. 45-50, 1999.