

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS APLICADAS À ANÁLISE
DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO EM POMARES DE
CITROS SOB ADIÇÃO DE LODO DE ESGOTO**

Kelly Mayumi Narimoto

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

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

São Carlos
2006

Narimoto, Kelly Mayumi

Técnicas espectroscópicas aplicadas à análise da matéria orgânica do solo em pomares de citros sob adição de lodo de esgoto./ Kelly Mayumi Narimoto. São Carlos, IQSC, 2006. 112p.

Dissertação (Mestrado)-Instituto de Química de São Carlos/
Universidade de São Paulo, 2006.

Orientador: Dr. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

1. Lodo de esgoto. 2. Matéria orgânica. 3. Ácido húmico. I. Título

DEDICO

Aos meus queridos pais Akihisa e Daisy, a quem tudo devo e sou eternamente grata,
aos meus irmãos Marcelo e Karina pelo carinho e compreensão
e ao meu sobrinho Marcus, minha mais nova alegria.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof^o Dr. Wanderley José de Melo, da UNESP/Jaboticabal, pelas amostras e atencioso acompanhamento durante todo o trabalho.

Ao Engenheiro Agrônomo Antônio B. J. Franco por ter cedido a área experimental da sua dissertação de mestrado para a realização do trabalho.

Ao Dr. Wilson Tadeu Lopes de Silva, Dr. Marcelo Luiz Simões e Dr. Ladislau Martin-Neto pelas sugestões e auxílio na realização do trabalho.

Ao Renê, pela valiosa e prestativa ajuda no laboratório.

À Prof^a Dr.^a Maria Olímpia de Oliveira Rezende e ao pessoal do laboratório de Química Ambiental do IQSC/USP pela contribuição nas medidas de carbono.

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

À Maria do Socorro pela paciência e atenção.

Ao Valentim pelo capricho e prestativa ajuda nos trabalhos.

À Ursula, Larissa, Adriana e Fernanda pessoas especiais e sempre dispostas a ajudar, meus sinceros agradecimentos.

Às bibliotecárias do IQSC/USP e Embrapa Instrumentação Agropecuária.

À Silvia e Andréia da sessão de pós-graduação pela simpatia e pronto atendimento.

Aos colegas e amigos de trabalho Ursula, Jean, Larissa, Adriana, Aline, Fernanda, Ana Flávia, Cléber, Robson, Lúcia, Daniele, Rafael, Lucimar, Helder, Vanessa, Jeferson, Marcilene, Eduarda, pela convivência e feliz estadia em São Carlos.

Aos meus familiares em especial às minhas tias Lourdes, Shirley e Marly pelo total apoio e incentivo.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária por me receber de braços abertos.

À conceituada instituição de ensino no país, Universidade de São Paulo, em especial ao Instituto de Química de São Carlos.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, força e amor.

À Deus por me dar saúde e força de vontade.

E a todos que de uma forma ou de outra contribuíram significativamente para a realização deste trabalho. Sem a ajuda de algumas pessoas tudo seria mais difícil, a essas pessoas minha imensa gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 LODO DE ESGOTO	5
3.1.1 APLICAÇÃO EM SOLOS CULTIVADOS	7
3.1.2 IMPORTÂNCIA DA RECICLAGEM AGRÍCOLA	8
3.1.3 CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR METAIS E PATÓGENOS	10
3.2 MATÉRIA ORGÂNICA	12
3.2.1 IMPORTÂNCIA DA MATÉRIA ORGÂNICA PARA O SOLO	14
3.2.2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	15
3.2.3 PROPRIEDADES DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	21
3.2.4 INTERAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS COM METAIS	23
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	23
3.3.1 MÉTODOS QUÍMICOS	24
3.3.1.1 TEOR DE CINZAS	24
3.3.1.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR (CNHS)	24
3.3.1.3 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (TOC)	26
3.3.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	26
3.3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	28
3.3.2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	30
3.3.2.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO NO UV-VIS	34
3.3.2.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	36
3.3.2.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	39
3.3.2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 ÁREA EXPERIMENTAL	48
4.2 CARACTERÍSTICAS DO SOLO E DO LODO DE ESGOTO	49
4.3 AMOSTRAGEM	50
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO E LODO PARA A EXTRAÇÃO	50
4.5 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS ÁCIDOS HÚMICOS	51
4.6 PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS	54
4.7 TESTE DE PUREZA: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS	55
4.8 ANÁLISE ELEMENTAR	56

4.9 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL	56
4.10 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	57
4.10.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	57
4.10.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	58
4.10.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO NO UV-VIS	60
4.10.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	60
4.10.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	60
4.10.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 ANÁLISE ELEMENTAR E TEOR DE CINZAS	64
5.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	66
5.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	68
5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO NO UV-VIS	75
5.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	78
5.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	82
5.7 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL	92
5.8 FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER	94
6 CONCLUSÕES	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Modelo de estrutura de AH proposto por Schulten e Schnitzer (1993).	18
Figura 3.2: Modelo tridimensional de ácidos húmicos proposto por Schulten & Schnitzer (1997), carbono=azul; oxigênio=vermelho; nitrogênio=preto e hidrogênio=branco. As letras A, B e C indicam os espaços vazios presentes, provavelmente, na estrutura das SH.	19
Figura 3.3: Modelo estrutural das SH proposto por Simpson et al. (2002). As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as unidades pretas os polissacarídeos, as unidades azuis os polipeptídeos, as unidades verdes as cadeias alifáticas e as unidades marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.	21
Figura 3.4: Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético; forma da linha de absorção de energia do campo de microondas; primeira derivada da linha de absorção.	28
Figura 3.5: Esquema de estabilização do radical livre do tipo semiquinona.	29
Figura 3.6: Espectro de ^{13}C RMN típico de ácido húmico mostrando os grupos funcionais associados às bandas correspondentes.	31
Figura 3.7: Diagrama dos níveis de energia relativa de orbitais moleculares e possíveis transições entre os orbitais.	34
Figura 3.8: Alguns cromóforos presentes nas estruturas das SH.	35
Figura 3.9: Vibrações típicas de átomos. Os sinais + e – significam vibrações perpendiculares ao plano do papel.	37
Figura 3.10: Esquema da transição eletrônica fluorescência molecular.	41
Figura 3.11: A) pastilhas de solo utilizadas para a obtenção dos espectros de FIL. B) laser incidindo sobre a pastilha de solo.	46
Figura 3.12: Esquema do sistema para medida de FIL de amostras de solo.	47
Figura 5.1: Dados da concentração de radicais livres do tipo semiquinona em spin (g C^{-1}) obtidos para os AH extraídos do solo e lodo de esgoto, em diferentes profundidades e tratamentos.	67
Figura 5.2: Espectro de ^{13}C RMN do AH extraído de lodo de esgoto.	72
Figura 5.3: Espectros de ^{13}C RMN dos AH extraídos do solo para todos os tratamentos das amostras da camada superficial (0-10 cm).	73
Figura 5.4: Espectros de ^{13}C RMN dos AH extraídos do solo para todos os tratamentos das amostras da camada 10-20 cm.	73
Figura 5.5: Espectros de ^{13}C RMN dos AH extraídos do solo para todos os tratamentos das amostras da camada 20-30 cm.	74
Figura 5.6: Espectros de absorção de radiação no UV-Vis das amostras de AH extraídas do solo e lodo de esgoto.	75
Figura 5.7: Valores da razão E_4/E_6 para os AH extraídos do solo e do lodo de esgoto.	77
Figura 5.8: Espectros de FTIR obtido do AH extraído do lodo de esgoto.	78

Figura 5.9: Espectros de FTIR de AH extraídos de amostras de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto e cultivado com citros em sistema convencional e obtidas na profundidade 0-10 cm.	79
Figura 5.10: Espectros de FTIR de AH extraídos de amostras de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto e cultivado com citros em sistema convencional e obtidas na profundidade 10-20 cm.	79
Figura 5.11: Espectros de FTIR de AH extraídos de amostras de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto e cultivado com citros em sistema convencional e obtidas na profundidade 20-30 cm.	80
Figura 5.12: Espectro de emissão de fluorescência de AH extraídos do solo, com comprimento de onda de excitação $\lambda_{ex}=240nm$, e com intervalo de varredura de 300 a 700nm.	83
Figura 5.13: Espectro de emissão de fluorescência de AH extraído do solo e lodo de esgoto, com comprimento de onda de excitação $\lambda_{ex}=460nm$ e com intervalo de varredura entre 480 e 700nm.	84
Figura 5.14: Espectro de varredura sincronizada de AH extraído do solo, medidos com diferença de comprimento de onda de emissão e excitação, $\Delta\lambda=\lambda_{em}-\lambda_{ex}=55nm$.	85
Figura 5.15: Espectros de AH do lodo de esgoto obtido: A) no modo de emissão ($\lambda_{em}=240nm$) e B) varredura sincronizada ($\Delta\lambda=55nm$) respectivamente.	86
Figura 5.16: Valores do índice de humificação (A_{465}) obtido pela metodologia de Milori et al., 2002 para os AH extraídos do solo e lodo de esgoto.	88
Figura 5.17: Valores do índice de humificação obtido pela metodologia de Zsolnay et al. 1999, para os AH extraídos do solo e lodo de esgoto.	89
Figura 5.18: Valores do índice de humificação (I_{457}/I_{398}) obtido pela metodologia de Kalbitz et al. (2000) para os AH extraídos do solo e do lodo de esgoto.	90
Figura 5.19: Correlação entre as metodologias de Zsolnay et al. (1999) e Milori et al. (2002).	91
Figura 5.20: Correlação entre as metodologias de Zsolnay et al. (1999) e Kalbitz et al. (2000).	91
Figura 5.21: Correlação entre as metodologias utilizadas de Kalbitz et al. (2000) e Milori et al. (2002).	92
Figura 5.22: Carbono total em amostras de solo e do lodo de esgoto determinadas pelo método de TOC.	93
Figura 5.23: Valores de H_{FIL} obtido para as amostras de solo.	94
Figura 5.24: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Zsolnay et al., (1999) (A_4/A_1).	96
Figura 5.25: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Milori et al., (2002) (A_{465}).	97
Figura 5.26: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Kalbitz et al. (2000) (I_{457}/I_{398}).	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Bandas típicas observadas em espectros de FTIR de SH	39
Tabela 5.1: Carbono (C), nitrogênio (N), hidrogênio (H) e oxigênio (O), cinzas em amostras de AH extraídos do solo e do lodo de esgoto	64
Tabela 5.2: Relações C/N das amostras de AH extraídos do solo e do lodo de esgoto	66
Tabela 5.3: Porcentagem da área total das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS de amostras sólidas de AH	70
Tabela 5.4: Grupos aromáticos e alifáticos em amostras sólidas de AH obtidas através dos espectros de ^{13}C RMN de lodo de esgoto e de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto	71
Tabela 5.5: Carbono total nas amostras de solo e do lodo de esgoto obtido pelo método de TOC	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	Área do espectro de emissão de FIL
AH	Ácido Húmico
C	Carbono
CAQUI	Centro de Análises Químicas
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT	Valor do Carbono Orgânico Total
CP	Polarização Cruzada
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FIL	Fluorescência Induzida por Laser
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHSS	International Humic Substance Society
MAS	Rotação Segundo o Ângulo Mágico
MO	Matéria orgânica
MOS	Matéria orgânica do solo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SH	Substância Húmica
TOC	Total Organic Carbon
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VA	Amplitude Variável

RESUMO

A produção de lodo de esgoto vem aumentando a cada dia nas estações de tratamento, e a sua disposição final é um problema a ser resolvido. Uma das alternativas encontradas para a disposição final desses resíduos com benefícios ambientais e principalmente econômicos é a reciclagem agrícola, devido a sua composição em termos de matéria orgânica e nutrientes para as plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição do lodo de esgoto na matéria orgânica do solo, em um experimento de curto período de duração. As amostras utilizadas neste experimento foram coletadas na Fazenda Retiro, município de Monte Azul Paulista/SP, em áreas com cultivo de citros. O experimento foi composto de 5 tratamentos, uma testemunha e 4 doses de lodo de esgoto. Além dos 5 tratamentos também foram amostrados o solo de mata (referência) e lodo de esgoto. Dessas amostras foram extraídos os ácidos húmicos (AH). Foram avaliadas as alterações ocorridas nas estruturas dos AH quanto aos teores de carbono, composição de grupos funcionais, número de radicais livres do tipo semiquinona e grau de humificação. O solo *in natura* também foi avaliado quanto aos teores de carbono e grau de humificação da matéria orgânica (MO). Para isso, foram utilizadas técnicas como análise elementar, TOC e espectroscopia de EPR, ^{13}C RMN, FTIR, UV-Vis, Fluorescência e FIL. Através dos resultados de análise elementar, foi possível notar que não houve alterações na estrutura dos AH após a adição de lodo de esgoto, podendo ser comprovado através dos espectros de FTIR e ^{13}C RMN, onde não foram observadas diferenças significativas para os diferentes tratamentos. A adição de lodo de esgoto em solos sob cultivo agrícola, entretanto, incorporou MO fresca, pois quando se compara o solo testemunha e o solo que recebeu a dose mais alta de lodo observa-se um aumento de 75% no carbono orgânico do solo. O AH do lodo de esgoto possui um caráter bastante alifático e em sua estrutura uma considerável quantidade de radicais livres do tipo semiquinona. Ao ser adicionado ao solo, observa-se que modifica a concentração do número de radicais livres do tipo semiquinona sem alterar os grupos funcionais do AH do solo. Portanto, no sistema estudado, a adição de lodo de esgoto mostra que o número de radicais livres do tipo semiquinona presentes no solo não é proporcional ao grau de humificação da MO do solo. Os resultados demonstraram que a espectroscopia de fluorescência tanto em solução como a Induzida por Laser forneceu dados coerentes à cerca do grau de humificação da MO. Foi possível observar uma diminuição no grau de humificação no solos submetidos à adição de lodo de esgoto, aproximando-se do solo de mata utilizado como referência. A concentração de carbono no solo aumentou, mesmo depois de ter sido interrompida a aplicação por 2 anos, e o grau de humificação da MO diminuiu, sendo menor ainda do que o solo de mata utilizado com referência. Portanto, podemos considerar este tipo de manejo onde se utiliza lodo de esgoto para condicionamento do solo apropriado tanto do ponto de vista ambiental quanto do ponto de vista agrônomo.

ABSTRACT

The production of sewage sludge increases daily in treatment stations and definitive disposal is a problem to be resolved. One of the alternatives found to dispose such residues, with environmental and economic benefits, is agricultural recycling, owing to its organic composition and plant nutrients. The objective of the present work was to assess the effects of waste sludge addition to soil organic matter in an experiment of short duration. The samples used in this experiment were collected from Fazenda Retiro, a municipality of Monte Azul Paulista/SP, in an area that has citrus plantations. The experiment was composed of 5 treatments, reference soil and 4 sewage sludge doses. In addition to the 5 treatments, the forest soil (reference) and sewage sludge were also sampled. From these samples humic acids (HA) were extracted. The alterations that occurred in the HA structures were assessed regarding ratios of carbon, composition of functional groups, number of semiquinone-type free radicals and rate of humification. *In natura* soil was also assessed regarding carbon ratio and rate of humification of organic material (OM). Thus, techniques as elementary analysis, TOC and EPR spectroscopy, ^{13}C RMN, FTIR, UV-Vis, Fluorescence and FIL were used. By means of elementary analysis results, it was possible to notice that there was no alteration in the HA structure after addition of sewage sludge, therefore, verifying through FTIR and ^{13}C RMN spectra no significant differences observed for the different treatments. However, addition of sewage sludge in agricultural cultivated soils incorporated fresh OM, since when comparing the reference soil and the soil that received the highest dose of sludge, an increase of 75% is observed in the organic carbon of the soil. The HA of the sewage sludge has a very aliphatic characteristic and in its structure, a considerable quantity of semiquinone-type free radicals. It is observed that when added to the soil, it modifies the concentration of the number of semiquinone-type free radicals, without altering the HA functional groups of the soil. Therefore, in the studied system, addition of sewage sludge demonstrates that the number of semiquinone-type free radicals found in the soil is not proportional to the rate of OM humification of the soil. The results demonstrated that fluorescence spectroscopy in solution, as well as Laser-Induced fluorescence of whole soil, provided coherent data concerning the rate of OM humification. It was possible to observe reduction in the rate of humification in soils submitted to sewage sludge, in close approximation to the forest soil used as reference. The carbon concentration in the soil increased, even after interrupting application for 2 years, and humification degree of OM diminished, proving to be less than the forest soil used as reference. Thus, we can consider this type of management, when sewage sludge is used to condition soil, as appropriate from an environmental point of view, as well as from an agronomical one.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A consciência ecológica que vem crescendo dia a dia, não mais permite que os resíduos urbanos, sólidos ou líquidos, sejam lançados diretamente ao meio ambiente sem um prévio tratamento. As águas servidas devem ser tratadas, de modo a remover sua carga de organismos patogênicos e a maior parte possível de sua matéria orgânica (MO), somente então sendo devolvidas à natureza.¹

Tratando-se os esgotos urbano-industriais, que são os maiores poluidores dos rios, pesquisadores salientam que a despoluição dos rios estaria praticamente garantida. Deste modo, haveria redução nos custos para o tratamento das águas, recuperação dos rios e com isso permitiria a sua utilização para fins recreativos, além dos aumentos da atividade pesqueira e outras vantagens sociais, como a redução da mortalidade infantil, devido ao saneamento.²

A situação brasileira com relação à cobertura de rede de esgotos apresenta uma imensa deficiência de atendimento. Os mais recentes resultados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística³ (IBGE- 2000) mostram que praticamente metade dos municípios brasileiros não oferece serviço de esgotamento sanitário e pouco mais de 35% da população brasileira é atendida por sistema de coleta e tratamento de esgoto. No estado de São Paulo, cerca de 40% de sua população é atendida por redes coletoras e tratamento de esgoto, onde de 5039477 m³ de esgotos coletados por dia, apenas 2019536 m³ são tratados.

A Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) maior produtora de lodo de esgoto do país, está produzindo atualmente 150 toneladas por dia, em base seca, e com previsão de produzir no ano de 2015, cerca de 830 toneladas de lodos de esgotos por dia.⁴ O estado do Paraná, pioneiro no

tratamento de lodo de esgoto, vem desde o começo da década de 90 desenvolvendo pesquisas nesta área, atualmente, produz cerca de 54 toneladas por mês do lodo de esgoto. Devido aos baixos índices de coleta e tratamento de esgoto, há uma clara tendência a um grande aumento na produção de lodo, dados apresentados por Tsutya (2000)^{4,a} em Workshop.

Os dejetos tratados, por sua vez, geram o chamado lodo de esgoto, uma massa “biológica” composta por microorganismos que se alimentaram da MO existente no esgoto. O processo de tratamento separa as impurezas presentes no esgoto, produzindo lodos ainda na forma líquida representando cerca de 1% a 2% do volume de esgoto tratado. Entretanto, o custo para o seu tratamento e disposição final é da ordem de 20% a 40% do custo operacional de uma estação de tratamento de esgoto.

A disposição desses materiais é um grande problema, devido, às implicações, pois o seu armazenamento requer a utilização de espaços físicos especiais e seu tratamento é, na grande maioria das vezes, dispendioso. Freqüentemente o retorno não é rentável, esses resíduos são dispostos de maneira inadequada, causando sérios problemas ambientais.

^a TSUTYA, M.T. Qualidade e Perspectiva de Produção de Lodo de esgotos no Brasil. In: WORKSHOP SOBRE USO DE LODO DE ESGOTO NA AGRICULTURA, 2., 2000, Jaboticabal-SP. Palestra... Jaboticabal: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

As formas mais usuais de disposição do lodo são: aterros sanitários, oceanos, incineração, transformação em agregado leve, disposição no solo e uso agrícola, sendo esta última a melhor alternativa, quando o lodo apresenta características adequadas, isto é, quando está dentro de um padrão em relação aos nutrientes, poluentes e patógenos. A utilização agrícola é a que tem apresentado maior potencial devido aos efeitos do lodo sobre a melhoria de características químicas e físicas dos solos, podendo ainda atuar como fertilizante e condicionador de solos.⁴

Esta prática de reciclagem de resíduos, além de auxiliar na recuperação de solos, é importante porque minimiza a ocorrência dos descartes de resíduos prejudiciais ao ambiente.

Embora, diversos países dispõem de legislação para o uso do lodo de esgoto na agricultura, no Brasil apenas dois estados apresentam normatização, o estado de São Paulo, e o estado do Paraná. Contudo, uma regulamentação brasileira vem sendo estudada e elaborada pelos Ministérios do Meio Ambiente e da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)⁵ com a finalidade de se definir critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos gerados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) sanitário e seus produtos derivados.

Com o reconhecimento e apoio por parte dos órgãos governamentais, além da continuidade de projetos de pesquisa, a tendência é aumentar a reciclagem de lodo de esgoto utilizando-o na agricultura.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

Este projeto propõe-se a caracterizar a matéria orgânica de solos submetidos e não submetidos a adição de lodo de esgoto.

Para tanto serão avaliadas as alterações ocorridas nas estruturas dos ácidos húmicos quanto aos teores de carbono, composição de grupos funcionais, níveis de radicais livres do tipo semiquinona e grau de humificação e as alterações ocorridas no solo, quanto aos teores de carbono e grau de humificação da matéria orgânica do solo.

Serão utilizadas técnicas químicas como análise elementar e TOC e técnicas espectroscópicas como EPR, RMN, FTIR, UV-Vis, Fluorescência e FIL com intuito de auxiliar as pesquisas sobre utilização de lodo de esgoto em sistemas agrícolas.

CAPÍTULO 3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LODO DE ESGOTO

O lodo de esgoto é um resíduo que se acumula nas ETES das grandes cidades, este resíduo é obtido após o tratamento das águas servidas, com a finalidade de torná-las o menos poluído possível, de modo a permitir seu retorno ao ambiente sem que sejam agentes de poluição,⁴ podendo representar mais uma ameaça no ambiente se não forem encontradas alternativas viáveis do ponto de vista social, econômico e ambiental para sua utilização. Para sua disposição final devem ser considerados os seguintes aspectos principais: produção, qualidade e grau de umidade.

Em função da origem e do processo de obtenção utilizado, o lodo de esgoto apresenta uma composição muito variável, sendo um material ainda rico em MO (40-60%),¹ porém depende também do tratamento de depuração ao qual ele é submetido. Pode variar em função do local de origem, ou seja, se de uma área tipicamente residencial ou industrial, da época do ano e do nível social da comunidade.⁶

As concentrações de nutrientes vegetais em lodos de esgotos variam amplamente entre localidades e tratamentos que o resíduo recebe antes da sua disposição final.

Elementos como N, P, Ca, S, Zn, Fe, Cu, Mn, entre outros encontram-se em quantidades variáveis dependendo do processo de produção, quantidades essas, às vezes, suficientes para atender às necessidades de plantas. Em solos de clima

tropical e subtropical, onde a MO desempenha papel de fundamental importância na capacidade de troca catiônica (CTC), esse atrativo torna-se ainda maior.⁷

Dessa forma, a análise da composição do lodo de esgoto chama logo a atenção para seu potencial para uso na agricultura, seja como condicionador das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, seja como substituto, pelo menos em parte, dos fertilizantes minerais atualmente em uso.

Para os solos paulistas, onde há uma carência de MO, possivelmente o valor agrônomo de maior importância dos lodos de esgotos, refere-se à MO.

Além da MO e dos nutrientes vegetais, o lodo de esgoto inclui na sua composição os chamados metais pesados e também microorganismos que se desenvolveram durante o processo de tratamento, assim como microorganismos e ovos de vermes que já existiam no esgoto.¹

Os objetivos dos processos de estabilização do lodo de esgoto são: reduzir seu conteúdo em microorganismos patogênicos e inibir, reduzir ou eliminar o potencial de putrefação do lodo e, conseqüentemente, seu potencial de produção de odores.⁴

O lodo de esgoto é constituído por diferentes grupos orgânicos, entre eles, as substâncias húmicas (SH), consideradas o estágio final da evolução dos compostos de carbono (C) no solo,⁸ conseqüentemente, é um grupo de substâncias mais estáveis e de difícil degradação do ponto de vista químico. O lodo de esgoto pode contribuir para o aumento dos teores e proporções das SH presentes no solo. De acordo com Albiach et al. (2001)⁹, o acréscimo no teor de C-substâncias húmicas em solo depende da dose, da composição química do lodo de esgoto aplicado e do tempo de aplicação.

3.1.1 APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO EM SOLOS CULTIVADOS

O lodo de esgoto é uma fonte de nutrientes e MO e sua aplicação em solos agrícolas é uma forma de disposição final desse resíduo, da qual pôde-se obter benefícios. Borges et al. (2004)¹⁰ mostraram que a adição de lodo de esgoto promoveu alterações em alguns atributos químicos dos solos e que ocorreram aumentos lineares dos teores de MO.

A aplicação de lodo de esgoto no solo causa aumento no teor de MO, melhorando o nível de fertilidade, com aumento na CTC.⁴ De um modo geral, a aplicação de lodo de esgoto ao solo tem promovido aumento de pH, diminuição da acidez potencial e do alumínio trocável, aumento gradual na disponibilidade de nutrientes,¹¹ possui papel de condicionador de solos, função principalmente do conteúdo orgânico do resíduo. Além disso, a presença de MO melhora o estado de agregação das partículas do solo, diminui sua densidade, aumenta a aeração, a capacidade de retenção de água.^{4,12}

Para a aplicação dos lodos de esgotos na agricultura é necessário que essa atividade seja regulamentada, de modo que se fixe as condições e restrições para que os lodos de esgotos possam ser aplicados de forma segura para a população e ao ambiente. Para o uso agrícola devem ser levados em consideração os aspectos referentes à qualidade dos lodos de esgotos, principalmente quanto aos metais pesados e organismos patogênicos. Além disso, devem também ser considerados os seguintes aspectos: características do lodo de esgoto, condições do solo para o uso do lodo de esgoto, características das áreas para a aplicação do lodo de esgoto, taxa de aplicação do lodo de esgoto e culturas agrícolas recomendadas.⁴

Como resultado da melhoria das propriedades físico-químicas e biológicas do solo, a aplicação de lodo de esgoto tem conduzido ao aumento na absorção de nutrientes pelas culturas, com reflexo na produtividade.⁴

A aplicação de lodo de esgoto ao solo tem levado ao aumento no teor de nutrientes disponíveis no solo, embora, em função de sua composição este aumento nem sempre mantém o equilíbrio adequado entre os diferentes nutrientes, de modo que, mesmo havendo aumento da disponibilidade de nutrientes, a planta poderá não responder em termos de aumento na produtividade.⁴

O uso do lodo de esgoto tem sido exaustivamente pesquisado em todo o mundo, não havendo registro de nenhum efeito adverso sobre o ambiente. À longo prazo, entretanto, o aumento da aplicação do lodo torna-se uma preocupação justificada, devido a presença de metais pesados, pois se não adequadamente controlado pode ameaçar a cadeia trófica.

3.1.2 IMPORTÂNCIA DA RECICLAGEM AGRÍCOLA

Com o conceito de que MO é parte essencial do solo, em adição à tentativa de resolução do problema da disposição de resíduos gerados pela agricultura e indústria, surge o conceito de aproveitamento de alguns tipos de resíduos orgânicos como retorno da MO ao solo.

Os lodos de esgotos contém MO, macro e micronutrientes que exercem um papel fundamental na produção agrícola e na manutenção da fertilidade do solo. Além disso, a MO contida nos lodos de esgotos pode aumentar o conteúdo de húmus que melhora a capacidade de armazenamento e de infiltração da água no solo, aumentando a resistência dos agregados e reduzindo a erosão,⁴ além de fontes de C orgânico e podem incrementar a CTC. Pela quantidade de N e P

contido nos lodos de esgotos, pode-se admitir que esses elementos podem substituir os fertilizantes minerais como uma fonte de nutrientes para as plantas. Melo (1997) ressalta que pelo conteúdo de MO e nutrientes das plantas, o lodo de esgoto apresenta potencial para uso em agricultura, substituindo parte da adubação mineral.⁴

Para as condições brasileiras, a reciclagem agrícola dos lodos de esgotos, apresenta vários aspectos positivos em função da influência de um clima tropical, que expõe o solo a uma intensa atividade intempérica, proporcionando uma rápida mineralização da MO, disponibilizando uma gama de nutrientes ao meio, podendo ainda contribuir para a elevação do pH do solo, redução da acidez potencial, possuir um papel de condicionador de solos, função principalmente do conteúdo orgânico do resíduo e representa um benefício de ordem social pela disposição final menos impactante de resíduos no ambiente;¹³ além da utilização como fertilizante, diminuindo os custos com os fertilizantes convencionais. A utilização agrícola do lodo de esgoto faz com que a parte que se retira do solo retorne a ele.²

Considerando que em solos de clima temperado o cultivo durante 50 a 100 anos raramente conduz a perdas maiores que 50% do C total do solo por mineralização, e a MO é mantida no solo armazenando os nutrientes e conservando a estrutura grumosa do solo. Entretanto, em solo de clima tropical as perdas de C total, causadas pelo cultivo, são superiores e muito mais rápidas, quando comparado aos solos de clima temperado, levando ao deterioramento da qualidade destes em menos de 10 anos.

Assim sendo, é de extrema importância utilizar sistemas que recuperem o conteúdo de MO inicial do solo para a conservação do ecossistema e o sucesso das atividades agropecuárias.

Apesar das quantidades apreciáveis de nutrientes e MO com efeitos benéficos do lodo, o processo de reciclagem exige a definição de critérios seguros para sua implementação, pois este pode apresentar alguns problemas devido a presença de sais solúveis, patógenos e compostos orgânicos persistentes e principalmente no que se refere a dinâmica dos metais pesados em função das características ácidas da maioria dos solos brasileiros que proporciona uma maior solubilidade das formas metálicas.

Atualmente, há um interesse crescente no uso de MO como fertilizante ou condicionador de solos. Isso pode ser atribuído à vários fatores: (1) interesse na redução do uso de fertilizantes químicos; (2) preocupação pública com os efeitos poluentes potenciais de substâncias químicas no ambiente; e (3) necessidade premente de conservação de energia.

3.1.3 CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR METAIS E PATÓGENOS

Os lodos de esgotos podem poluir o meio ambiente devido à presença de metais pesados e de organismos patogênicos.⁴

As concentrações de metais no lodo são determinadas pela atividade e pelo tipo de desenvolvimento urbano e industrial da área que abastece a ETE. O lodo de esgoto proveniente do tratamento de esgotos domésticos, com predominância sobre os industriais, geralmente tem teores de Cd, Cu, Mo, Ni, Zn, Mn, Fe, Al, Cr, e Hg dentro das faixas permitidas para seu uso agrônômico. Entretanto, quando os efluentes industriais predominam no esgoto, o lodo apresenta teores de metais pesados acima da faixa permitida, havendo restrições para uso agrícola.¹¹ É de importância fundamental o controle de efluentes industriais, pois se o lodo de esgoto

contiver metais pesados poluentes acima dos limites estabelecidos pela norma norte americana, não poderá ser utilizado na agricultura.

Num esforço de simular os efeitos dos elementos traço em solos tratados com lodo de esgoto, as primeiras pesquisas direcionaram-se para o crescimento de plantas em casas de vegetação, com metais adicionados ao solo como sais inorgânicos. Num estudo de campo subsequente, Page et al. (1994)¹⁴ usaram lodo de esgoto e mostrou que os resultados dos estudos da casa de vegetação superestimaram a biodisponibilidade e fitotoxicidade dos metais provenientes do lodo. Resultados destes estudos de campo demonstraram que culturas crescidas em solos tratados com lodo foram beneficiadas em nutrientes presentes no lodo de esgoto, mas não acumularam As, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni ou Zn em quantidades suficientes para serem prejudiciais aos consumidores. Dependendo das condições do solo, poderia haver possibilidade de absorção de Cd, Mo e Se pelas plantas em quantidades prejudiciais aos humanos (Cd) e animais (Cd, Mo e Se) que consumissem a colheita afetada.

Geralmente, a absorção de metais pelas plantas ocorre em baixos valores de pH, uma vez que os metais tornam-se mais disponíveis em solos ácidos.¹⁵ Alguns autores afirmam que a disponibilidade de metais também é insuficiente pela CTC na seguinte relação: quanto maior a CTC, maior a complexação dos metais tóxicos, tornando-os menos disponíveis às culturas.¹⁶

Toda a preocupação que se tem com os metais pesados é devido a sua capacidade de estabelecer ligações com grupos orgânicos em geral e, em especial, com o grupo sulfidril presente em proteínas. Essa característica é que os torna potencialmente tóxicos, havendo possibilidade de que a MO forme complexos desses metais evitando sua translocação no perfil do solo e possível contaminação

do lençol freático. Porém, pode acontecer contaminação do solo e a possibilidade de absorção dos mesmos, pelas plantas conseqüente entrada na cadeia alimentar. Estes elementos provocam efeitos negativos à saúde humana e animal e na qualidade do alimento, e ao contrário dos patógenos e outros compostos orgânicos presentes no lodo, os metais pesados podem sofrer alterações apenas de natureza química, ou seja, não são biodegradáveis e podem acumular-se no solo por tempo indefinido. Em geral, os metais pesados encontrados são: Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Fe, Co, Mn, Mo, Hg, Sn e Zn. Entre estes o Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn são essenciais às plantas, o Co às bactérias fixadoras de nitrogênio e Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn aos animais.

Os organismos patogênicos são inerentes aos esgotos sanitários e conseqüentemente aos lodos de esgotos. A sua presença causa um problema de poluição à medida em que se verifica a possibilidade da sua disseminação pelo ambiente.⁴

Os EUA e grande número de países da Europa já possuem leis regulamentando o uso de resíduos em solos agrícolas, considerando níveis críticos de metais pesados no solo e nos resíduos.¹ No entanto, estas leis baseiam-se principalmente nas propriedades morfológicas e não descrevem suficientemente a química da MO contida nos compostos. Também não especifica os efeitos a curto e longo prazo, que o composto pode exercer na MO nativa do solo e no crescimento das plantas.¹⁷

3.2 MATÉRIA ORGÂNICA

A MO é imprescindível para a qualidade dos solos tropicais. Ela desempenha um papel relevante na produtividade das culturas por ser um importante reservatório

de N, P e S e por influenciar fatores como pH, capacidade de troca iônica, atividade microbiana e estrutura do solo.^{18,19} Além disso, a MO pode contribuir para o seqüestro de carbono atmosférico.^{20,21} A sua dinâmica é um dos aspectos de grande interesse em se estudar, devido sua importância tanto do ponto de vista de solos, considerando aspectos relevantes de fertilidade e de estrutura, para evitar processos erosivos, quanto aspectos ambientais, com relação as reações e associações com pesticidas, metais pesados e microorganismos, em solos e águas, e ainda considerando aspectos globais da Terra, como o efeito estufa.

Em solos de regiões tropicais e subtropicais, a MO desempenha papel de fundamental importância na fertilidade, por se tratarem de solos altamente intemperizados, cujos minerais, já estão na escala final do intemperismo. Assim sendo, a MO além de se constituir em um dos principais, senão o principal, componente da CTC, durante o processo de mineralização libera nutrientes para a nutrição dos vegetais.²² Nesses tipos de clima a taxa de decomposição da MO é bastante elevada, cerca de cinco vezes mais rápida quando comparada à de regiões temperadas.

Apesar de se encontrarem em reduzida quantidade, a MO tem influência em quase todas as propriedades do solo, atuando de maneira marcante no crescimento dos vegetais. Sua presença caracteriza os solos de boa fertilidade, aos quais proporciona uma estruturação favorável à vida das plantas. É praticamente a principal fonte de nitrogênio para as plantas, sendo ainda, fornecedora de elementos como o fósforo e o enxofre, bem como de vários micronutrientes.²³ Por isso, incrementa-se a quantidade de MO pela prática de adições regulares de resíduos orgânicos ao solo, para lhe conferir maior produtividade agrícola.

A matéria orgânica do solo (MOS) é correntemente definida como “a fração orgânica do solo incluindo resíduos vegetais e animais em diferentes estados de decomposição, tecidos e células de organismos e substâncias produzidas por habitantes no solo”, ou seja, resulta da degradação química, biológica e da atividade sintética dos microorganismos.^{8,24} Essa é uma definição muito ampla, que inclui materiais pouco alterados até aqueles que sofreram profundas alterações.

A MOS designa um conjunto de substâncias altamente heterogênea que inclui numerosos compostos de carbono, variando de açúcares, proteínas e outros constituintes biológicos, ácidos orgânicos de baixas massas moleculares, como os ácidos acético e oxálico, quase todos facilmente mineralizáveis, até o conjunto complexo de produtos recalcitrantes resultantes de transformações químicas e microbianas da MOS.²⁵

A MOS é constituída basicamente de SH e substâncias não húmicas. As SH (proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, entre outros) pertencem a grupos bem conhecidos e possuem características físicas e químicas bem definidas. Geralmente correspondem aos compostos mais facilmente degradados por microorganismos, tendo, normalmente, tempo mais curto de vida no ambiente.²⁶ As SH, por sua vez, são macromoléculas ou estruturas supramoleculares, com massa molecular e estruturas variáveis, são muito resistentes a degradação e seu tempo de existência pode ser de séculos ou até milênios.

3.2.1 IMPORTÂNCIA DA MATÉRIA ORGÂNICA PARA O SOLO

Quanto à importância da MO, pode ser analisada através das suas funções:

- biológica- regula as atividades da microflora e dos organismos da microfauna;

- nutritiva- serve como uma fonte de nutrientes para o crescimento das plantas, retendo e fornecendo tanto os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) assim como os micronutrientes, (Zn, Fe, Mn, Cu), impede a perda por lixiviação e arraste dos fertilizantes químicos;
- física e físico- química- melhora a capacidade de retenção de água, drenagem, aeração e conserva a estrutura do solo. É responsável pela CTC e a capacidade tampão do solo. Participa também no processo de decomposição de agentes tóxicos formando compostos complexos com metais pesados e pesticidas, ajuda na retenção de calor influenciando na germinação de sementes e desenvolvimento das raízes.

A determinação precisa do teor de MO é importante sob diversos aspectos. Primeiramente, do ponto de vista do estabelecimento de práticas de manejo para o cultivo de plantas, uma vez que a MO desempenha um papel importante no fornecimento de nutrientes para as plantas, aumento da CTC e melhoria da estrutura do solo. Além disso, recentemente, o conteúdo de MO tem sido usado como um parâmetro que auxilia nas recomendações de aplicação de nitrogênio, enxofre, calcário e herbicidas.²⁷ Esses aspectos são muito importantes e atuais considerando a necessidade de práticas que levem a uma “agricultura sustentável”. Os aspectos qualitativos da MO também são relevantes dada a complexidade e diversidade de reações das macromoléculas que a constitui.

3.2.2 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As SH são definidas na literatura de maneiras bem diversas, em função de suas múltiplas características e natureza complexa. Devido à isso, pouco se sabe

sobre sua estrutura química e apresentam-se como misturas heterogêneas de moléculas polidispersas com elevada massa molecular.

As SH são os componentes mais recalcitrantes da MOS e representam o mais resistente estoque de MO.

As SH são compostos orgânicos derivados de matéria animal e vegetal em decomposição. Originam-se no ecossistema terrestre, ou seja, no solo, onde a MO fica aprisionada, decompondo-se gradativamente, em conjunto com agentes químicos envolvidos nos ciclos dos nutrientes.²⁸ Elas são constituídas por uma mistura de compostos de elevada massa molar com uma variedade de grupos funcionais. Os principais grupos funcionais das SH incluem grupos carboxílicos, hidroxil-fenólicos, carbonílicos e hidroxílicos.²⁹ Normalmente, os cientistas de SH definem as estruturas químicas dos ácidos húmicos (AH) como macromoléculas complexas, constituídas de diferentes estruturas aromáticas e alifáticas com funções carboxílicas e fenólicas. Estas estruturas estão ligadas a peptídeos e outros compostos contendo nitrogênio e carboidratos em pequenas quantidades.

Suas características moleculares podem variar dependendo da idade ou da origem do material sendo, por isso, definidas operacionalmente.³⁰ Assim, com base nas suas respectivas solubilidades são classificadas em humina, AH e ácido fúlvico, em que cada fração deve ser considerada como sendo constituída de uma série de moléculas de tamanhos diferentes.

A maioria delas não possui a mesma configuração estrutural ou grupos reativos na mesma posição.⁸ O AH constitui a fração das SH solúvel em meio alcalino, que precipita após acidificação. O ácido fúlvico permanece em solução quando o meio é acidificado e a humina é a fração insolúvel tanto em ácido quanto em álcali diluídos.

Em síntese, pode-se conceituar SH como aquela parte da MO ou, mais particularmente, do húmus, que após várias transformações, permanece no ambiente, consistindo de uma mistura heterogênea, polifuncional, sem características químicas e físicas definidas e em diferentes graus de polidispersão.

A variedade de materiais de origem e o grande número de caminhos reacionais possíveis para a formação do húmus são a razão para as dificuldades na sugestão de uma estrutura precisa para os AH, ácido fúlvico e humina.

Essa variedade de definições é conseqüência da natureza complexa das SH e principalmente devido ao fato dessas substâncias não constituírem uma classe definida de compostos, mas um grupo dinâmico de compostos heterogêneos que mudam constantemente com o tempo e conjuntura ambiental.

Até há alguns anos, as SH eram consideradas como polímeros macromoleculares. As afirmações e citações feitas anteriormente foram baseadas na proposta que SH seriam macromoléculas orgânicas, com características similares às macromoléculas biológicas como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lignina. Schnitzer e Khan (1978) e, mais recentemente, Schulten e Schnitzer (1997) propuseram a existência de espaços vazios (Figura 3.2) de diferentes tamanhos, onde poderiam alojar-se outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, como carboidratos e materiais proteínáceos, lipídios, agrotóxicos e outros poluentes. Poderiam também estar presentes elementos inorgânicos como argilas e óxidos-hidróxidos.

A relevância e conseqüências de termos para um modelo definitivo para as SH são evidentes. Deste modo, independente de qual modelo proposto, existe um consenso sobre a existência de regiões hidrofóbicas que podem ser excelentes sítios de sorção, por exemplo, para pesticidas não polares.

Schulten e Schnitzer (1993), a partir de técnicas analíticas, tais como: pirólise, espectroscopia, degradação oxidativa e microscopia eletrônica, sugeriram a estrutura esquemática e macromolecular para o AH, mostrado na figura 3.1.

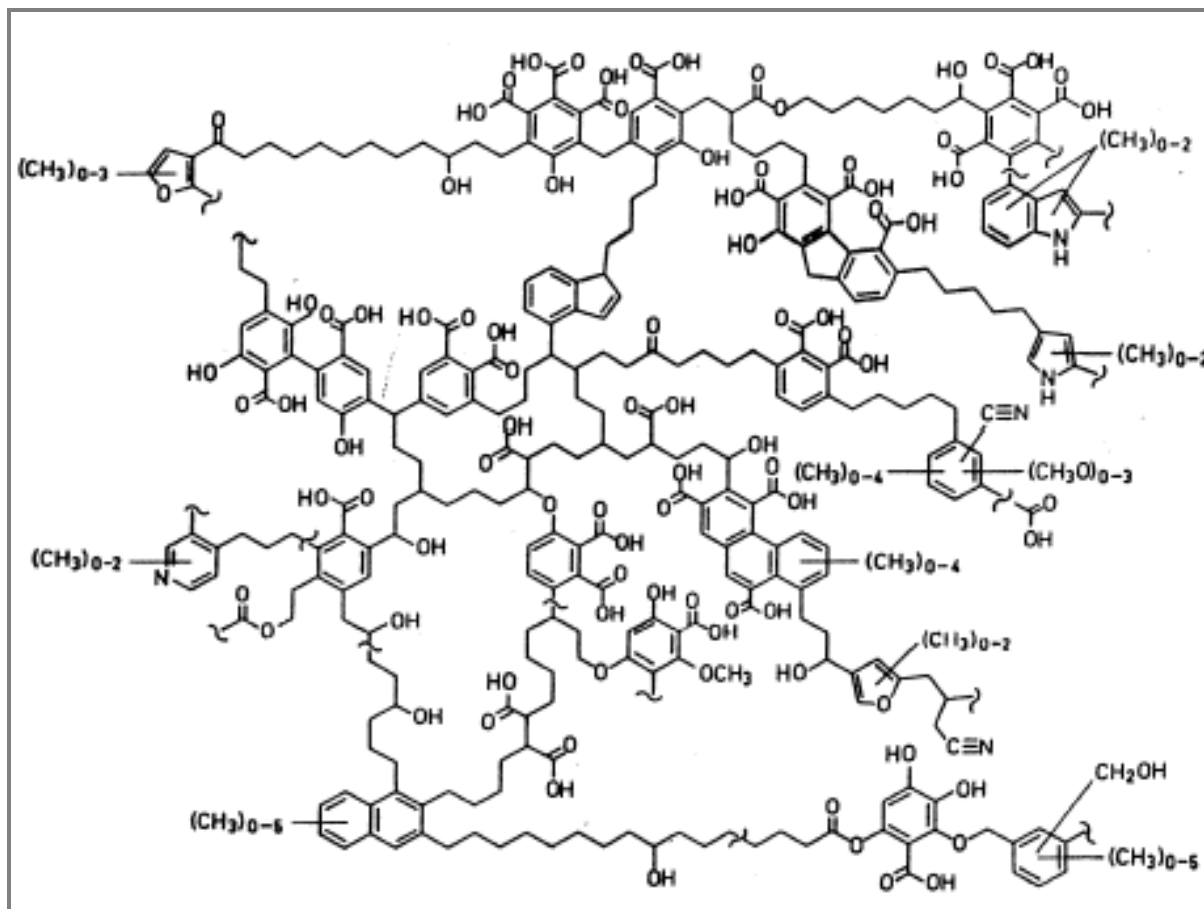


Figura 3.1: Modelo de estrutura de AH proposto por Schulten e Schnitzer (1993).

A estrutura proposta por Schulten e Schnitzer (1993) para o AH contém longas cadeias alifáticas, grupos OH fenólicos livres e ligados, estruturas de quinona, nitrogênio e oxigênio como ponte de ligação dos grupos de COOH localizados de diferentes formas nos anéis aromáticos.

Schulten e Schnitzer (1997) apresentaram um modelo obtido através de técnica de pirólise e espectrometria de massas, pelo qual o AH é representado como uma macromolécula (Figura 3.2).

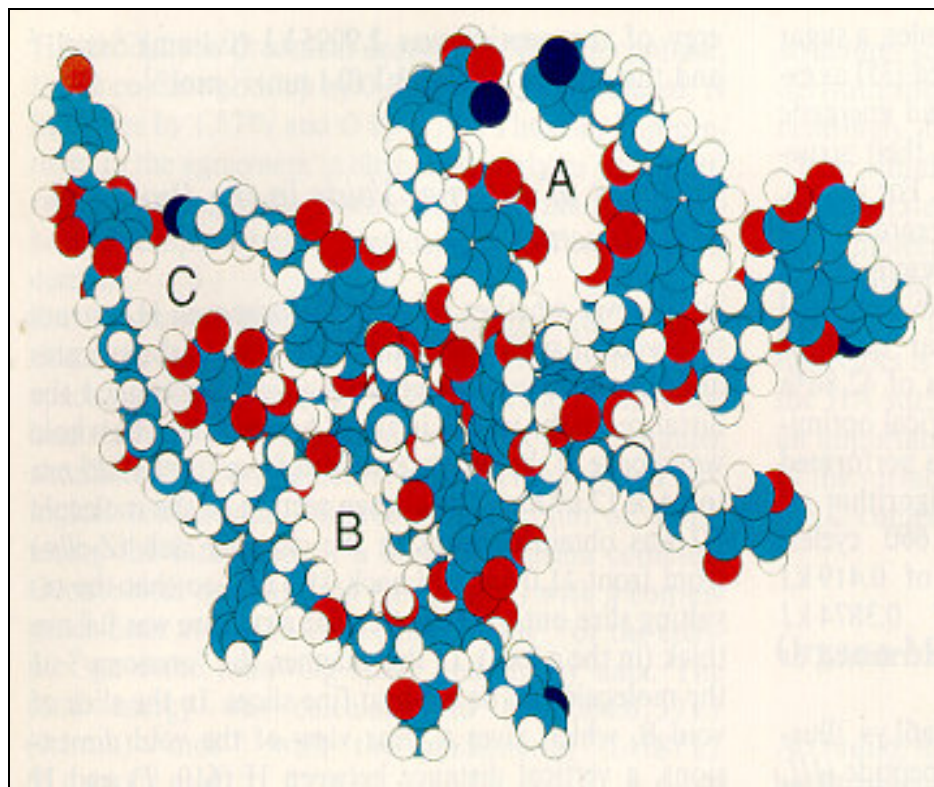


Figura 3.2: Modelo tridimensional de ácidos húmicos proposto por Schulten e Schnitzer (1997), carbono=azul; oxigênio=vermelho; nitrogênio=preto e hidrogênio=branco. As letras A, B e C indicam os espaços vazios presentes, provavelmente, na estrutura das SH.

A reatividade química das SH é devido, principalmente, a quatro características estruturais:^{31,32} polifuncionalidade, a presença de vários grupos funcionais, com reatividades diferentes, representativos de uma mistura heterogênea de polímeros que interagem entre si; carga macromolecular, o caráter aniônico do arranjo molecular cujos efeitos refletem na reatividade dos grupos funcionais e na conformação molecular; hidrofiliçidade, essa propriedade reflete-se na tendência que têm as SH de formarem ligações de hidrogênio com as moléculas da água do meio,

solvatando, dessa maneira, grupos funcionais como COOH e OH; labilidade estrutural, devido à capacidade de associações intermoleculares e de mudanças conformacionais em resposta a mudanças de pH, condições redox, concentração iônica e ligações químicas. Todas as propriedades citadas a respeito das SH são semelhantes a propriedades de outros biopolímeros, como proteínas e polissacarídeos. Contudo, no caso das SH essas propriedades refletem o comportamento de uma mistura heterogênea de moléculas interagindo entre si, ao invés do comportamento de um único tipo de macromolécula, estruturalmente bem definida.

Além do modelo macromolecular, tem-se ainda o modelo supramolecular, no qual é proposto que as SH em solução formam agregados húmicos que são estabilizados por ligações fracas, tais como: ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas. Além disso, é proposto que as SH são provenientes de produtos da degradação enzimática de plantas e complexos de ligninas.^{33,34} Este modelo foi embasado por Conte e Piccolo (1999)³⁵ dando origem à teoria supramolecular,^{36,37} na qual as SH são formadas por moléculas pequenas e heterogêneas de várias origens, auto-organizadas em conformações supramoleculares, o que explicaria o grande tamanho molecular aparente das SH. O modelo supramolecular foi sustentado pelos resultados obtidos por Simpson (2002)³⁸ e Simpson et al. (2002)³⁹. Estes autores demonstraram que as SH extraídas de solos são formadas por uma mistura de substâncias agregadas de baixa massa molar e propuseram um modelo estrutural (Figura 3.3) para ilustrar como as principais estruturas identificadas nas SH poderiam formar um agregado na presença de cátions metálicos de ocorrência natural nos ecossistemas terrestres.

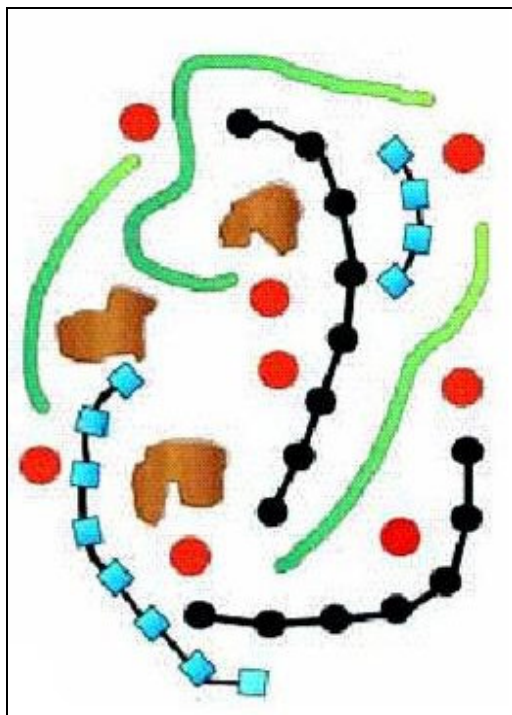


Figura 3.3: Modelo estrutural das SH proposto por Simpson et al. (2002). As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as unidades pretas os polissacarídeos, as unidades azuis os polipeptídeos, as unidades verdes as cadeias alifáticas e as unidades marrons os fragmentos aromáticos provenientes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

3.2.3 PROPRIEDADES DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Estima-se que 65% a 75% da MO da maior parte dos solos minerais sejam SH.²⁶

As SH apresentam propriedades químicas que variam consideravelmente, dependendo de vários fatores, como a composição dos resíduos das plantas originárias, condições climáticas, ação dos microorganismos, interação com argila e minerais e outros.^{26,40,41,42}

Algumas características importantes das SH são:

- alta capacidade de retenção de água, com importante papel regulador para evitar processos erosivos no solo, bem como fonte de armazenamento dessa substância vital para as culturas;

- alta CTC, sendo que na maioria das situações é a principal reguladora da CTC do solo. A CTC significa a soma total de cátions trocáveis que um solo, ou algum de seus constituintes, pode adsorver a um pH específico.
- na combinação com argilas, formam agregados facilitando a aeração e “estruturação” do solo;
- formação de complexos com íons micronutrientes de plantas (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo e outros), permitindo a migração dos mesmos, tornando-os biodisponíveis;
- complexação ou quelação com pesticidas e metais pesados (Pb, Hg, Cr, Cd e outros) diminuindo suas concentrações e a toxidez. Esta característica pode, no entanto, ser um fator de contaminação de solos e águas naturais, uma vez que aumenta o tempo de permanência dos metais;^{26,40}
- a coloração tipicamente escura possibilita a retenção de calor pelo solo, beneficiando a germinação de sementes e desenvolvimento de raízes;

Esse material consiste de uma mistura de compostos com elevada massa molar e uma grande variedade de grupos funcionais,³⁰ contendo oxigênio na forma de carboxilas, hidroxilas, fenólicos, carbonilas, quinonas, hidroquinonas e outros, e a presença desses grupos funcionais contendo oxigênio causa a elevada reatividade das SH.

São formadas através do processo de humificação, caracterizado por alterações nas estruturas químicas dos resíduos orgânicos e é controlada por variáveis como temperatura, regime de água do solo, pH e disponibilidade de nutrientes. Durante a humificação, geralmente ocorre um aumento na concentração de C carboxílico, C alquil e C aromático e uma diminuição na concentração de C O-alkyl.¹⁸

A humificação é entendida como a degradação de compostos lábeis e acúmulo de material quimicamente recalcitrante, logo, aquele material que é preservado no solo por proteção física não é considerado humificado.

As SH provenientes de resíduos orgânicos compostados apresentam algumas características que as diferenciam daquelas originárias dos solos. Grupos proteináceos e estruturas alifáticas presentes nas SH de resíduos compostados são largamente incorporados às SH do solo em formas relativamente resistentes à decomposição. Com o passar do tempo, entretanto, observa-se modificações químicas e estruturais tornando esta diferença menos aparente, com a clara evidência de aproximação às SH do solo original. Este resultado é importante pois sustenta, em parte, que a reciclagem de resíduos orgânicos parcialmente humificados é benéfica no tratamento de solos.

3.2.4 INTERAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS COM METAIS

As SH apresentam características estruturais que fazem com que elas possam interagir com metais e compostos orgânicos, como por exemplo, pesticidas e herbicidas presentes no ambiente.⁴³ Em certas situações suas características funcionais tem sido inclusive utilizadas como indicadores do grau de poluição em diferentes ambientes.³⁰

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A literatura é rica em trabalhos sobre os efeitos do lodo de esgoto no nível de fertilidade do solo, nas propriedades físicas e biológicas, na absorção de nutrientes e

na produtividade das culturas. Contudo, é pobre em estudos a respeito dos efeitos do lodo de esgoto sobre as frações da MOS.⁷

Os métodos químicos e espectroscópicos tem sido amplamente aplicados no estudo da MOS, principalmente das SH, assim como na identificação e caracterização dos diferentes compostos húmicos, na avaliação das alterações desses compostos e, no entendimento dos processos relacionados com a dinâmica da MO após a aplicação do lodo de esgoto ao solo.

3.3.1 MÉTODOS QUÍMICOS

3.3.1.1 TEOR DE CINZAS

O teor de cinzas corresponde à quantidade de matéria inorgânica, especialmente sílica e metais, presentes no AH. Esse valor reflete na eficiência da extração e purificação. Valores altos de cinzas podem comprometer a interpretação da análise elementar e interfere nas análises de NMR e EPR.

3.3.1.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR (CNHS)

A análise elementar é o método mais usado para a determinação da composição elementar das SH, se baseia na detecção de quatro componentes (nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre) de uma mistura, eluída e separada por uma coluna cromatográfica e detectada por um detector, na seqüência N₂, CO₂, H₂O e SO₂. Com os dados da análise elementar não é possível se chegar a fórmula molecular do ácido húmico ou ácido fúlvico, mas é possível ter uma noção da composição geral da molécula.

A composição das SH é afetada por diversos fatores, como pH, material de origem, vegetação e uso do solo. Assim, solos neutros apresentam uma faixa estreita de valores para carbono, hidrogênio e nitrogênio, enquanto que solos ácidos apresentam uma faixa mais larga. O ácido fúlvico é mais rico em oxigênio e enxofre, enquanto que o AH é mais concentrado em carbono, hidrogênio e nitrogênio.⁴⁴

Esse tipo de análise tem sido extensivamente utilizado para identificar alterações na composição de SH extraídas de solos sob diferentes tratamentos e manejos, incluindo adição de lodo de esgoto.⁴⁵

Estudos mostraram que C, H, O, N, P e S respondem por 100% da composição das SH livres de cinzas.^{8,26} Os elementos C, H, N e S são determinados e o O obtido por diferença.

A composição elementar é determinada para possibilitar conhecer a quantidade dos elementos químicos formadores da molécula polimérica. As frações das SH são diferenciadas pela quantidade de elementos químicos presentes na molécula.

A partir desses valores, pode-se calcular a razão atômica C/N. A razão C/N, por sua vez, indica o grau de incorporação do nitrogênio na estrutura húmica e o estado de humificação da MO, por conseqüência, o nível de fertilidade desse material, pois através de diversos mecanismos de mineralização da MOS, o nitrogênio é liberado para as raízes das plantas sob a forma de nitrato. Na maioria dos solos, a relação C/N diminui com a profundidade.

A razão C/N fornece informações à respeito da estabilidade da MO ou do grau de humificação. Os microorganismos necessitam de carbono, como fonte de energia, de esqueletos carbônicos para a síntese de biomoléculas diversas e de nitrogênio para síntese de proteínas. Durante o processo de decomposição da MO,

o consumo de carbono é maior do que o de nitrogênio, ocorrendo uma concentração relativa no nitrogênio e uma diminuição na relação C/N.^{46,47,48} Segundo Fernandes (2000), o lodo de esgoto apresenta razão C/N entre 5 e 11.

O nitrogênio incorporado às macro ou supermoléculas dos AH origina-se na decomposição de proteínas e polipeptídeos dos tecidos dos organismos mortos presentes no lodo de esgoto, que são incorporados aos AH nativos do solo em formas resistentes à decomposição.⁴⁹

Esta razão deve ser constante para os solos e sedimentos entre 10-12.^{8,50} Uma alta razão C/N significa baixa incorporação de N e baixo grau de humificação.

A razão C/N pode ser utilizada ainda para inferir o grau de estabilidade da MO, do ponto de vista ao ataque microbiano.⁵¹

3.3.1.3 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (TOC)

O carbono total é determinado pela oxidação do carbono orgânico e inorgânico à CO₂, devido ao aumento da temperatura a 900°C.

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

3.3.2 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

A extração de SH e sua caracterização por meio de técnicas espectroscópicas têm gerado importantes resultados na avaliação da qualidade do solo, sob condições temperadas e tropicais, uma vez que fornecem informações sobre os grupos funcionais que constituem a MO, muito embora, em sistemas tropicais, esses estudos sejam ainda reduzidos.^{52,53,54,55,56} Mangrich (2001)⁵⁷ ressalta

que o conhecimento das estruturas químicas das SH é essencial para entender a sustentabilidade dos diferentes sistemas agrícolas, o ciclo global do carbono e a lixiviação de espécies químicas, que causam poluição das águas e o empobrecimento do solo.

As análises espectroscópicas nas diferentes regiões do espectro eletromagnético tem ampla aplicação no estudo da MOS, especialmente das SH, tanto para a identificação e caracterização dos diferentes compostos húmicos, como para a avaliação das alterações qualitativas desses compostos.

Estas técnicas possuem vantagens como a utilização de pequena quantidade de amostra e a sua fácil execução.⁸

Os resultados obtidos por Piccolo et al. (1992) a partir da caracterização química e espectroscópica de SH extraídas de solos tratados por 4 anos com diferentes proporções de resíduos orgânicos industrial e doméstico, e de esterco animal, indicaram efeito benéfico na fertilidade do solo, a partir da adição de resíduos ao solo, mas também que o AH formado assumiu características químicas e grau de humificação do material originalmente contido no solo.

Oficialmente não há um método padrão estabelecido para avaliação da qualidade do composto orgânico, mas diferentes técnicas tem sido propostas para testar a evolução e modificações ocorridas na MO. Entre essas, as medidas espectroscópicas, EPR, FTIR, UV-Vis, NMR, Fluorescência e FIL, têm sido comprovadamente eficientes e aplicadas em diversas pesquisas combinadas com metodologias padronizadas de análise química, para caracterização de SH provenientes das mais diferentes origens e tipos de tratamentos.^{46,48,49,46,58}

3.3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

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

A transição entre os dois níveis ocorrerá quando uma energia

$$\Delta E = g\beta H_0 \quad (3.1)$$

for fornecida ao sistema. Quando a condição de ressonância é satisfeita, o momento magnético sofre uma transição de uma posição paralela ao campo magnético para uma posição antiparalela a este.

A figura 3.4 ilustra estas informações.

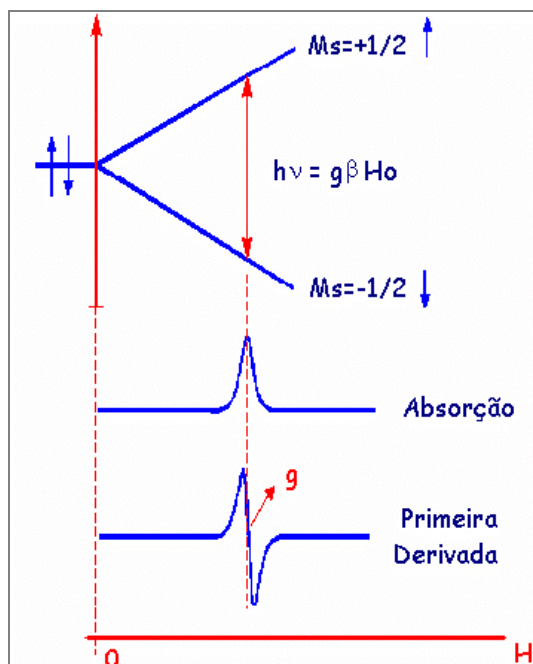


Figura 3.4: Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético; forma da linha de absorção de energia do campo de microondas; primeira derivada da linha de absorção.

Uma das principais informações a respeito das SH é a medida do grau de humificação⁵⁹ e um parâmetro que caracteriza este estágio de humificação é o nível de radicais livres do tipo semiquinona. O grau de humificação está associado a estabilidade e complexidade das moléculas de SH, o que significa cadeias maiores com maior conteúdo de grupos aromáticos. Um dos poucos parâmetros que reflete essa propriedade intrínseca das SH é o nível de radicais livres do tipo semiquinona.^{52, 53, 61, 59, 60} Estes radicais apresentam grande importância como catalisadores de reações de polimerização de SH. A técnica utilizada para detectar e quantificar os radicais livres do tipo semiquinona, e conseqüentemente o grau de humificação das SH, é a ressonância paramagnética eletrônica, sendo uma técnica bastante sensível à espécies químicas com elétrons desemparelhados.

O sinal de radicais livres das SH é produzido por grupos semiquinona (Figura 3.5) formados pela dehidrogenação oxidativa de compostos fenólicos. As SH contêm radicais livres muito estáveis que são relacionados com reações de polimerização – despolimerização, grau de aromaticidade e humificação da MO.⁶¹

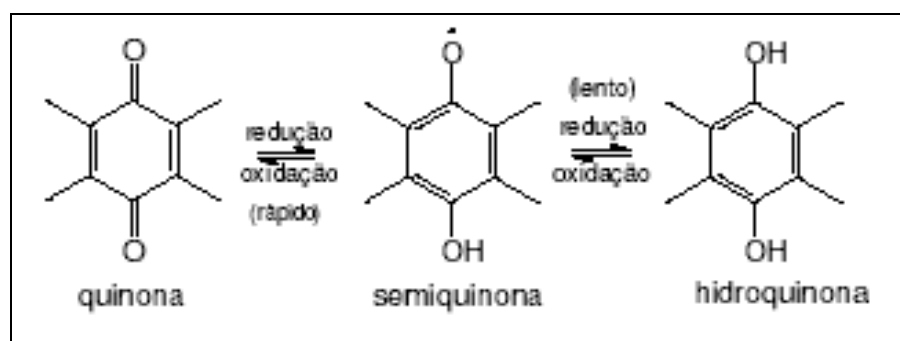


Figura 3.5: Esquema de estabilização do radical livre do tipo semiquinona.⁶⁰

O grau de humificação está associado à estabilidade e complexidade das moléculas de SH, o que significa cadeias maiores com maior conteúdo de grupos

aromáticos. Um dos poucos parâmetros que reflete essa propriedade intrínseca é o nível de radicais livres do tipo semiquinona.

3.3.2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

O fenômeno de RMN tornou-se relevante para os químicos quando foi descoberto que núcleos da mesma espécie, mas em situação diferente na molécula, absorvem (e reemitem) energia em radiofrequências diferentes. Grupos de um dado núcleo ocupando configurações diferentes numa molécula podem ser distinguidos em regiões diferentes do espectro, o que possibilita estudos estruturais, que tornam a espectroscopia de ^{13}C RMN uma técnica extremamente poderosa para a identificação de substâncias químicas.

Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra.⁶² A absorção é função de determinados núcleos das moléculas. Essencialmente, um experimento de ^{13}C RMN consiste em posicionar uma amostra entre os pólos de um campo eletromagnético e aplicar uma radiofrequência variável. A excitação do núcleo do estado fundamental para um estado de energia mais alto resulta na absorção de radiação a uma frequência própria, dando um espectro o qual consiste de uma ou mais linhas de ressonância. Um espectro de ^{13}C RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades. O número e a intensidade dessas linhas estão relacionados com a estrutura da molécula.⁶²

Da espectroscopia de ^{13}C RMN podem ser observados níveis de energia, quando o isótopo do ^{13}C é colocado na presença de um campo magnético e radio-

freqüência ressonante com a transição. A freqüência de absorção dos núcleos do ^{13}C é dependente do ambiente químico em torno do núcleo e a intensidade é proporcional a quantidade de grupos funcionais analisados.

Através da RMN podemos identificar grupos funcionais que possibilitam caracterizar a estrutura das SH. O espectro de ^{13}C RMN de um AH e um ácido fúlvico, fornece um inventário de diferentes componentes dos quais o material é composto.

Os principais grupos funcionais detectados por ^{13}C RMN no estado sólido em AH são (Figura 3.6):⁶³ grupos alifáticos (0-45 ppm), N-alifáticos e metoxílicos (45-60 ppm), O-alifáticos (60-110 ppm), aromáticos (110-140 ppm), O-aromáticos (140-160 ppm), carboxílicos (160-185 ppm) e carbonílicos (185-230 ppm).

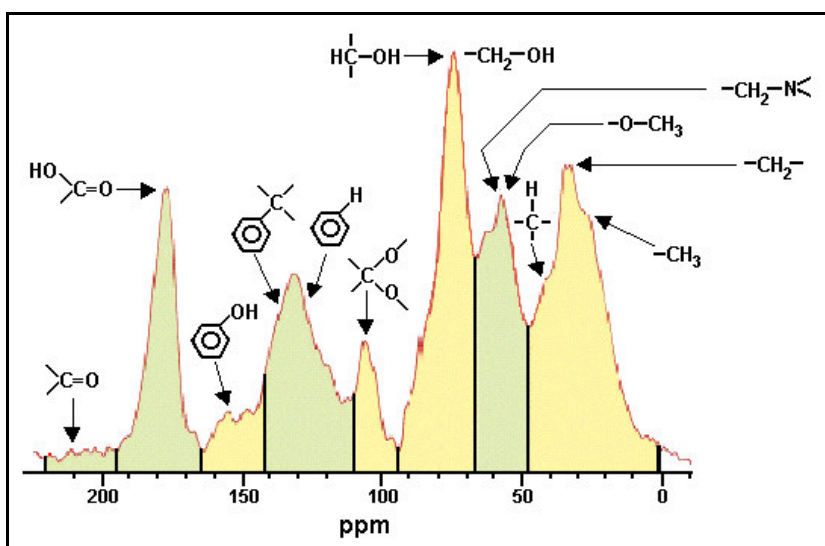


Figura 3.6: Espectro de ^{13}C RMN típico de AH mostrando os grupos funcionais associados às bandas correspondentes.⁶³

Com a técnica de ^{13}C RMN podemos fazer um estudo direcionado para um determinado núcleo, sendo esta uma das grandes vantagens da técnica.

A ^{13}C RMN é atualmente a técnica instrumental mais usada para caracterização das SH do solo, sendo possível a utilização de amostras sólidas e líquidas.⁶²

Uma das observações de grande interesse na avaliação da estrutura de compostos húmicos é a possível mudança estrutural destes, que reflete em alteração de suas propriedades nos solos. Tanto a ^{13}C RMN quanto a de ^1H RMN têm sido aplicadas em estudos relativos a conformações e estruturas moleculares da MO com grande sucesso.

A utilização de espectroscopia de RMN ^{13}C de estado sólido é cada vez maior porque possibilita o estudo de substâncias que são pouco solúveis ou mesmo insolúveis. A técnica não é destrutiva, preservando a amostra para outras análises, economizando solventes e permitindo a avaliação in situ da MOS.

Esta técnica apresenta algumas limitações tais como: baixa sensibilidade devido a pequena abundância natural da maioria dos núcleos, entre eles o ^{13}C (~1,1%), chamado de núcleo raro, e os tempos de relaxação muito longos que exigem experimentos com longa duração.

No caso de medidas de estado sólido, para obter espectros de alta resolução, devem resolver-se os três problemas seguintes:

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

Estas três interações anisotrópicas estão presentes nos líquidos mas, felizmente, são eliminadas pelo rápido movimento isotrópico das moléculas. Com o desenvolvimento de técnicas novas e sofisticadas tais como: desacoplamento de

alta potência, técnica de rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP), estas limitações da ^{13}C RMN do estado sólido tem sido melhoradas.

A utilização do desacoplamento de alta potência permite eliminar o alargamento das linhas no espectro de ^{13}C provocado principalmente pelas interações dipolares entre os núcleos de ^{13}C e ^1H . Estas interações dipolares heteronucleares surgem devido à influência dos prótons que são abundantes e originam um campo local sob os núcleos raros de ^{13}C . O desacoplamento é feito através da redução do momento magnético dos núcleos de ^1H que são abundantes, pela aplicação de sua radiofrequência de ressonância, que mantém o momento de dipolo magnético em alta rotação.⁶²

A técnica de rotação segundo o ângulo mágico (MAS) elimina os vestígios da interação dipolar $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ e os efeitos da anisotropia sobre o deslocamento químico através da rotação da amostra segundo um determinado ângulo, denominado ângulo mágico ($54,74^\circ$) em relação ao campo magnético aplicado.

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

A utilização das três técnicas: desacoplamento de alta potência, rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP), combinadas simultaneamente, conduz a obtenção de espectros de alta resolução em sólidos.

No entanto, um espectro característico de SH mostra bandas largas e sobreposição que impede uma atribuição exata (Figura 3.6). Mas existe a possibilidade da obtenção de uma informação semiquantitativa mediante a

integração dos picos largos e a associação com grupos funcionais característicos das SH. Quanto ao aspecto geral dos espectros de ^{13}C RMN, em função do aumento da humificação, observa-se um alargamento dos picos de ressonância com perda de resolução devido à alta complexidade estrutural.

A espectroscopia de RMN, especialmente a de ^{13}C , permite diferenciar, de forma quantitativa, estruturas alifáticas e aromáticas, sendo, por isso, a melhor técnica para determinação do nível de aromaticidade (e humificação) de SH.

3.3.2.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO NO UV-VIS

A espectroscopia na região do Ultravioleta (200-400 nm) e do visível (400-800 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 excitado⁶⁴ (Figura 3.7). O AH apresenta absorbâncias em λ na região de UV-Vis devido a grande quantidade de condensações aromáticas e outros sistemas π conjugados presentes na cadeia. Cadeias maiores tendem a absorver em λ maiores.

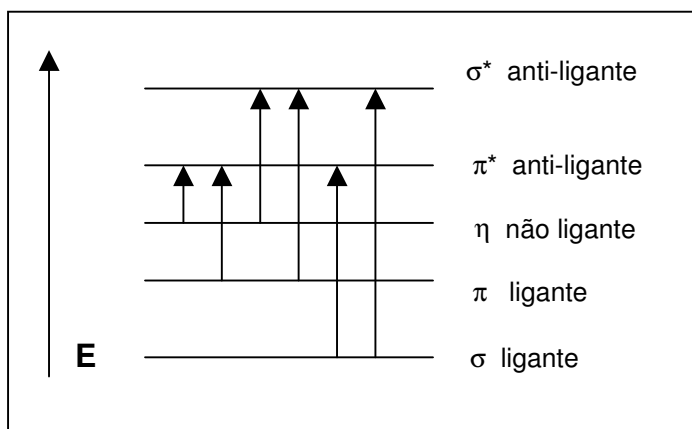


Figura 3.7: Diagrama dos níveis de energia relativa de orbitais moleculares e possíveis transições entre os orbitais.

Compostos contendo elétrons desemparelhados nos átomos de oxigênio ou enxofre mostram absorção de energia na faixa UV-Vis, assim como sistemas contendo duplas ligações conjugadas. Os grupos que contêm estes elétrons são chamados cromóforos, pois emitem a cor característica da molécula e podemos exemplificá-los: NO_2 , $\text{C}=\text{C}$ ou $\text{C}=\text{O}$. Agora é bom lembrar que as SH contêm na estrutura abundantes espécies com ligações insaturadas, em conseqüência os principais cromóforos identificados nas SH, podem ser estruturas aromáticas discretas (anéis) e substituídas por grupos carboxila e hidroxila e cromóforos não aromáticos como grupos cetona e carbonila (Figura 3.8).

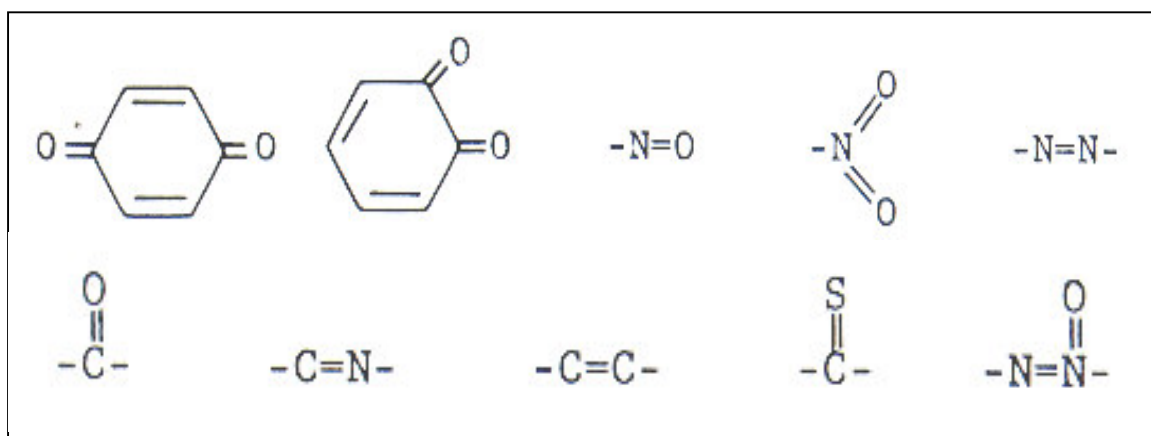


Figura 3.8: Alguns cromóforos presentes nas estruturas das SH.

Em função da grande quantidade e variabilidade de grupos cromóforos existentes nas macromoléculas húmicas, os espectros obtidos são geralmente formados pela sobreposição de várias bandas sem picos definidos, apresentando absorção decrescente com o aumento do comprimento de onda.

A espectroscopia de luz UV-Vis fornece informações que podem ser usadas para identificar estruturas moleculares e funcionalidades, sendo sensível a metais

pesados e a presença de contaminantes orgânicos. A técnica é utilizada para observar estruturas estáveis presentes nas SH, tais como, grupos aromáticos.

Para muitas das estruturas eletrônicas, esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta. Na prática, a espectroscopia é limitada, na maior parte aos sistemas conjugados. A seletividade da absorção no UV é uma vantagem, uma vez que se pode reconhecer grupos característicos em moléculas de complexidade bastante variável. Como uma grande porção de uma molécula relativamente complexa pode ser transparente no ultravioleta, pode-se obter espectro semelhante ao de moléculas mais simples.⁶⁵

Na região do visível a razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm, chamada de razão E_4/E_6 , tem sido amplamente usada para caracterização das SH. Segundo Stevenson (1994) esta razão decresce com o aumento da massa molecular e da condensação dos anéis, sendo utilizada como um indicador do grau de condensação dos anéis aromáticos das SH e, portanto, grau de humificação.

Os dados obtidos a partir da razão E_4/E_6 são controversos na literatura e devem ser utilizados e correlacionados com o devido cuidado com outros parâmetros espectroscópicos mais precisos.

3.3.2.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A chamada radiação infravermelha (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A região de maior interesse espectroscópico está situada entre $4000-400\text{ cm}^{-1}$.⁸

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

Essencialmente, existem duas vibrações fundamentais: estiramento, onde os átomos permanecem no mesmo eixo da ligação, porém a distância entre os átomos aumenta e diminui, e, deformação, onde as posições dos átomos mudam em relação ao eixo de ligação original. Quando luz infravermelha de mesma frequência de vibração de estiramento ou de deformação incide na amostra a energia é absorvida e a amplitude de vibração é aumentada. Devido à energia de absorção na frequência de ressonância, o detector do espectrômetro de infravermelho grava um pico de absorção naquele comprimento de onda.⁸ Vibrações típicas de um grupo de átomos são ilustrados na Figura 3.9.



Figura 3.9: Vibrações típicas de átomos. Os sinais + e - significam vibrações perpendiculares ao plano do papel⁶⁶.

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é muito utilizada para identificar grupos funcionais presentes na macromolécula de AH. A principal aplicação da técnica na caracterização estrutural da SH é a identificação dos principais grupos funcionais.

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

O espectro de IV é característico da molécula como um todo, porém certos grupos funcionais dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independentemente da estrutura do resto da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permitem a obtenção, através da consulta de tabelas do simples exame do espectro, de informações sobre a estrutura das moléculas.

Tem contribuído para a identificação de grupos funcionais como hidróxidos, grupos carboxílicos, carboxilatos, polissacarídeos, alifáticos, aminas, entre outros.⁸

⁶⁷ Estas informações são úteis, pois permitem identificar possíveis processos de oxidação e alteração de grupos funcionais, associados aos efeitos de manejos, devido por exemplo, ao aumento ou redução de aeração do solo, mudança no pH, complexação com micronutrientes, provenientes de fertilizantes ou naturalmente ocorrendo no solo, e ainda com metais pesados.

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

O estudo das SH por FTIR permite observar a natureza, a reatividade e o arranjo estrutural de grupos funcionais que possuem oxigênio, o grau de pureza da amostra quanto a contaminantes inorgânicos como argilas, metais e sais, e a ocorrência de carboidratos e proteínas.⁸ Os espectros de infravermelho podem revelar as interações entre grupos orgânicos, como os carboxílicos e metais pesados, visto que a coordenação dos grupos funcionais orgânicos com metais provoca deslocamento na frequência de absorção das ligações do íon carboxilato, o que permite a identificação da natureza (iônica ou covalente) da ligação organometálica.^{68,69}

A técnica de Transformada de Fourier foi introduzida na aquisição de espectros de IV proporcionando maior velocidade de leitura, permitindo obter um somatório de muitos espectros, melhorando a resolução e definição dos sinais e a exatidão da análise. A execução de várias varreduras para diminuição dos ruídos é facilitada devido a utilização de um computador na obtenção da Transformada de Fourier. Uma Transformada de Fourier converte o domínio de tempo na forma de domínio de frequência.

Tabela 3.1: Bandas típicas observadas em espectros de FTIR de SH⁷⁰

Região em comprimento de onda (cm⁻¹)	Origem
3400	Vibração de estiramento de grupos OH e NH
2900	Vibração de estiramento assimétrico de grupos CH – alifático
1715	Vibração de estiramento de grupos C=O
1600	Vibração de estiramento assimétrico de íons COO ⁻
1400	Vibração de estiramento simétrico de íons COO ⁻
1200	Vibração de estiramento de grupos C-O
1000	Torção de COH, vibração de estiramento de grupos CO de polissacarídeos ou grupos Si-O

3.3.2.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-Vis

A fluorescência está baseada na absorção de fótons e a conseqüente emissão destes, ocasionados pelas transições de elétrons, que tem tempo característico menor que 10⁻⁹s. Para que ocorra determinada transição, a energia absorvida deve ser equivalente a diferença entre o estado eletrônico inicial e o excitado. Este valor representa o λ de excitação e é característico de uma estrutura molecular em particular, no caminho de retorno ao estado basal, o elétron emite energia que pode manifestar-se em forma de calor ou emissão de fótons com um λ

específico chamado λ de emissão, logo a energia emitida é menor que a absorvida por causa das perdas na forma de calor ou vibrações moleculares.

Se a energia absorvida por uma molécula não for suficiente para ionizá-la ou dissociá-la, ela permanecerá no estado excitado por um determinado tempo, chamado de tempo de vida do estado excitado. Para retornar ao estado fundamental a energia absorvida deve ser dissipada, o que normalmente ocorre por decaimentos não radioativos em que o excesso de energia é transferida na forma de vibrações, rotações e translações. Esta degradação térmica converte a energia de excitação em movimento térmico do ambiente “aquecendo-o”. Porém quando o descarte de energia pela molécula é feito pela emissão de um fóton temos um decaimento radioativo que é chamado de fotoluminescência.

O fenômeno de luminescência tem sido classificado de acordo com a duração da emissão que ocorre depois que cessa a excitação. Na fluorescência, a emissão da radiação cessa quase que imediatamente (10^{-8} s), já na fosforescência pode durar vários segundos. O tempo 10^{-8} s, é o tempo de vida de um átomo no estado excitado para o qual o retorno ao estado fundamental é freqüentemente utilizado para diferenciar fluorescência de fosforescência.

Na fluorescência transições típicas deste tipo envolvem a promoção de elétrons não ligantes (η) ou ligantes (π) para orbitais antiligantes (π^*), é um processo rápido. Esses processos são altamente prováveis em sistemas moleculares contendo átomos com pares de elétrons não compartilhados, tais como, oxigênio e nitrogênio e em estruturas aromáticas e/ou sistemas alifáticos conjugados de insaturações com alto grau de ressonância, isto é, deslocalização eletrônica de elétrons, como é o caso das SH.⁷¹

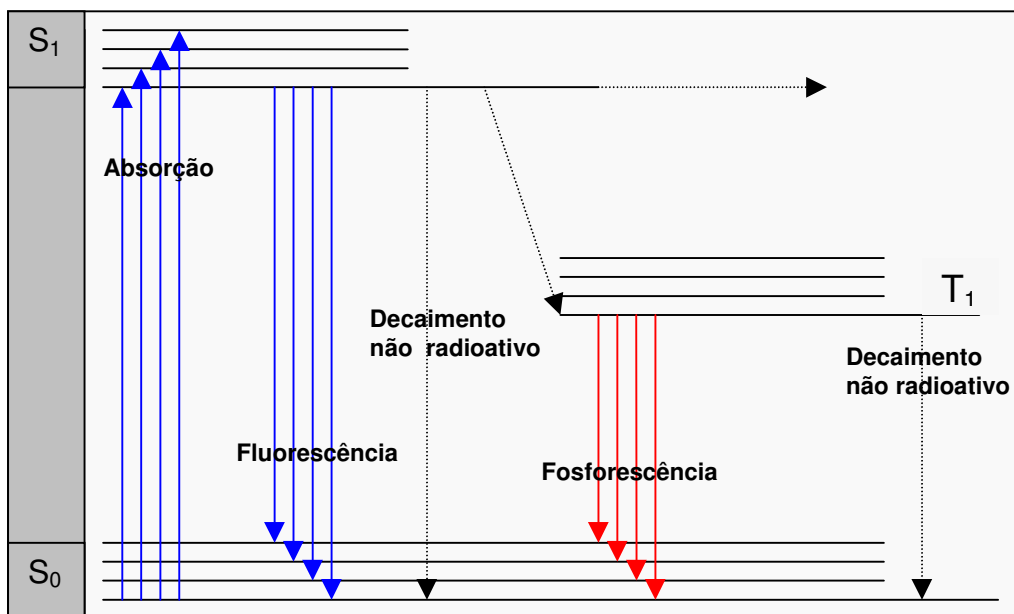


Figura 3.10: Esquema da transição eletrônica fluorescência molecular.

Essa técnica sensível é aplicada para o estudo seletivo de fluoróforos: (grupos cromóforos que apresentam fluorescência em λ específico). No entanto, conhecendo-se a complexidade das estruturas das SH e a sua heterogeneidade, é previsível em espectro de bandas largas e superpostionadas.

A potencial utilidade dessa técnica para o estudo das estruturas e grupos funcionais dos materiais húmicos é devido à presença de uma variedade de estruturas fluorescentes, a qual incluem aromáticos condensados, que significa vários grupos funcionais e cadeias alifáticas insaturadas.

A fluorescência dos compostos orgânicos envolve transições singlete-singlete onde não há mudanças de spin, já a fosforescência requer um estado intermediário tripleto, devido a reversão do spin entre o estado fundamental e o excitado, que retarda a emissão, devido as regras de seleção de spin (Figura 3.10).

A espectroscopia de fluorescência de luz UV-Visível fornece informações que podem ser usadas para diferenciar e classificar a MO natural de acordo com a sua

origem, gênese e natureza, também para identificar estruturas moleculares e funcionalidades, sendo sensível à presença de metais pesados e contaminantes orgânicos.

As principais vantagens são alta sensibilidade e seletividade, somente aqueles grupos funcionais que fluorescem podem ser observados. A intensidade da fluorescência aumenta com o decréscimo do tamanho molecular e o incremento de grupos C=O, COOH e C aromático. Essa técnica é utilizada para estudar a idade das SH e mostra que o conteúdo de grupos COOH é maior para AH “mais velhos”.

Estruturas fluorescentes nativas ou incorporadas às SH, constituem apenas uma pequena porção da macromolécula húmica, entretanto, sua variedade e a dependência de suas propriedades, de parâmetros moleculares e ambientais moleculares, permitem a obtenção de informações sobre seu comportamento fluorescente e sobre a natureza química das SH.⁴⁴ O comportamento fluorescente médio da molécula é o resultado da soma de todos os espectros individuais dos diferentes fluoróforos da molécula.

A análise da fluorescência de um composto é uma técnica muito sensível devido à capacidade de se detectar o sinal proveniente de moléculas quando excitadas por um comprimento de onda específico. É também bastante seletiva, uma vez que os comprimentos de onda de excitação e emissão dependem do mesmo composto de interesse, fazendo com que o sinal de fluorescência coletado seja característico de cada molécula em estudo.

O uso da técnica de fluorescência nos estudos sobre SH está apoiado pela presença estável de várias estruturas fluorescentes intrínsecas à molécula húmica e a seus precursores particularmente aromáticos, fenóis e grupos quinona.⁷¹

Baseado nestes fatos, é possível propor a fluorescência como técnica para estudar os processos de humificação.⁵⁵

Algumas metodologias tem sido sugeridas na literatura^{55,72,73} no sentido de aplicar esta técnica para avaliação de humificação das SH.

Os espectros de fluorescência podem ser de três modos: varredura síncrona, excitação e emissão.^{74,75} O espectro de emissão é obtido medindo-se a intensidade relativa da radiação emitida como uma função do comprimento de onda mantendo-se constante o comprimento de onda de excitação, enquanto que os espectros de excitação são obtidos pela medida da intensidade de emissão, fixando o seu comprimento de onda de emissão e variando o comprimento de onda de excitação. Os espectros de excitação com varredura sincronizada são obtidos medindo a intensidade de fluorescência, quando a molécula é varrida por ambos os comprimentos de onda, mas mantendo uma diferença de $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$, entre eles. Quando essa diferença é usada, esta técnica pode aumentar a intensidade de alguns picos, aumentando a sensibilidade do método.

Na metodologia proposta por Zsolnay et al. (1999), o índice de humificação é baseado na localização de espectro de fluorescência no modo de emissão. Este índice leva em consideração a área de 570-641 nm (A_4) e a área de 356-432 nm (A_1), quando os espectros são obtidos através da excitação em 240 nm e pH da solução igual a 2,0. A idéia básica de Zsolnay et al. (1999) foi de que se as moléculas fluorescentes tornam-se mais condensadas, seus espectros de emissão (com excitação em 240nm) tenderão e exibir um deslocamento sobre comprimentos de onda mais largos.

Na metodologia proposta por Milori et al. (2002), utiliza-se o comprimento de onda no azul (465 nm) como fonte de excitação. Esta absorção é mais ressonante

com estruturas cuja concentração aumenta com o grau de humificação de AH. A partir desses estudos, definiu-se a área total do espectro de fluorescência (A_{465}) sendo proporcional ao grau de humificação. Este estudo foi realizado com amostras de AH extraído de diferentes solos brasileiros, sob condições climáticas distintas e com diferenças texturais e mineralógicas.

A metodologia proposta por Kalbitz et al. (2000), fez-se um espectro de varredura sincronizada. De acordo com esta metodologia, os espectros de fluorescência sincronizados das SH apresentam dois picos ao redor de 360 ou 400nm e um ombro em torno de 470nm. Esses perfis mudam dependendo do grau de humificação, isto é, pode ser medido através da razão entre os picos da fluorescência. Então, a razão da intensidade de fluorescência em 400 e 360nm, ou 470 e 360nm, pode ser usada para medir o grau de humificação de SH.

Os espectros de emissão fluorescente das SH consiste em uma banda larga de total intensidade e um máximo de intensidade no λ variando de acordo com a origem da amostra. A emissão fluorescente e intensidades de excitação diminui com o aumento do peso molecular.

O modo sincronizado foi escolhido para obter a melhor informação espectral. O espectro de excitação da varredura síncrona é obtido pela medida da intensidade fluorescente simultaneamente sobre ambos os comprimentos de onda excitação e emissão observado entre eles.

Os espectros de fluorescência das SH são constituídos pela soma dos espectros dos diferentes tipos de fluoróforos presentes nelas, conseqüência da complexidade molecular e heterogeneidade das mesmas.

A espectroscopia de fluorescência de luz UV-Vis é uma técnica muito promissora, sensível, devido à capacidade de se detectar o sinal proveniente de

moléculas quando excitadas por um λ específico e também muito seletiva, uma vez que o λ_{exc} e λ_{em} dependem do mesmo composto de interesse, fazendo com que o sinal de fluorescência coletado seja característico de cada molécula em estudo e bastante útil para estudar amostras ambientais, aquelas que contém SH.

Geralmente os espectros de fluorescência permitem diferenciar os AH pela sua natureza e origem.⁷¹ Uma intensidade de fluorescência baixa e comprimentos de onda longos, característica típica de AH naturais com independência de origem, pode ser associada a compostos de alto peso molecular que possuem um sistema grande de elétrons π conjugados e anéis aromáticos condensados, substituídos por grupos que atraem os elétrons tais como carbonila e carboxila.^{75,76,77}

3.3.2.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

As técnicas citadas anteriormente exigem a extração e fracionamento químico das SH do solo, resultando na geração de resíduos químicos e tornando as análises de solos um processo lento e trabalhoso. Além disso, os produtos deste tratamento (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) podem sofrer modificações em relação a sua forma in situ.⁷⁸ Em contrapartida, a Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL) aplicada a solos é uma metodologia que tem se mostrado eficiente na análise da MO de solos, fornecendo resultados precisos de uma maneira ágil, limpa e em condições próximas das naturais em vista do fato que as amostras de solo não precisam ser submetidas a tratamento prévio.^{79,80,81}

Baseados neste fato, é possível propor a FIL como parâmetro para estudar os processos de humificação.

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

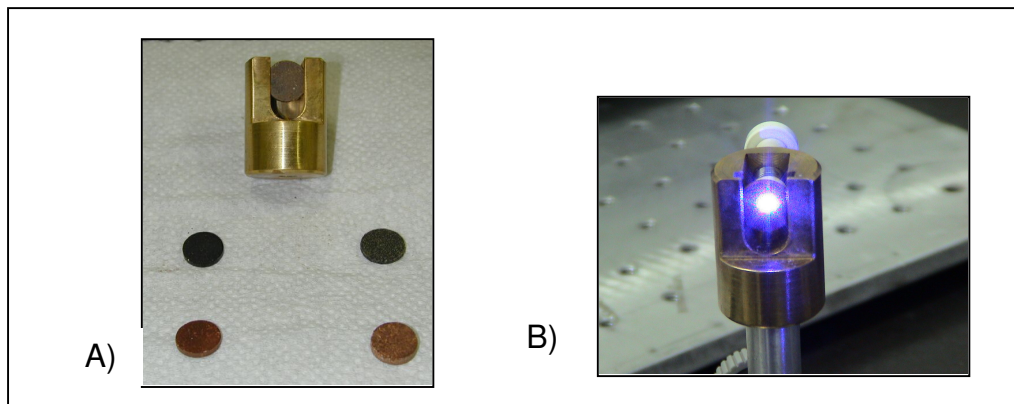


Figura 3.11: A) pastilhas de solo utilizadas para a obtenção dos espectros de FIL. B) laser incidindo sobre a pastilha de solo.

A metodologia de FIL tem como proposta de cálculo para obtenção do índice de humificação a razão entre o valor da área (ACF) sobre espectro de emissão de fluorescência (com excitação em 458 nm) e o valor do carbono orgânico total (COT) presente na amostra de solo,^{80,81} ou seja,

$$H_{FIL} = (ACF) / (COT) \quad (3.2)$$

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

O sistema para medir a FIL (Figura 3.12) é constituído de um laser de argônio (1), de um prisma para separação da emissão laser da fluorescência do gás (2), de espelhos para condução da excitação até a amostra de solo (3, 4 e 5), de uma lente para coletar a fluorescência (6), de um modulador óptico (optical chopper) (7), de um

filtro para suprimir a excitação no sistema de detecção (8), de um monocromador (CVI, L=25 cm) (9), de uma fotomultiplicadora (10), de um amplificador lock-in (11), e de um microcomputador dotado de uma placa de aquisição e software de controle e aquisição de dados (12). O laser de argônio foi sintonizado na linha de 458 nm com potência de 300 mW. A resolução espectral do sistema foi avaliada em 4 nm. Neste sistema, a emissão de fluorescência espalhada é medida e fornece informações sobre as estruturas orgânicas presentes na superfície da amostra.

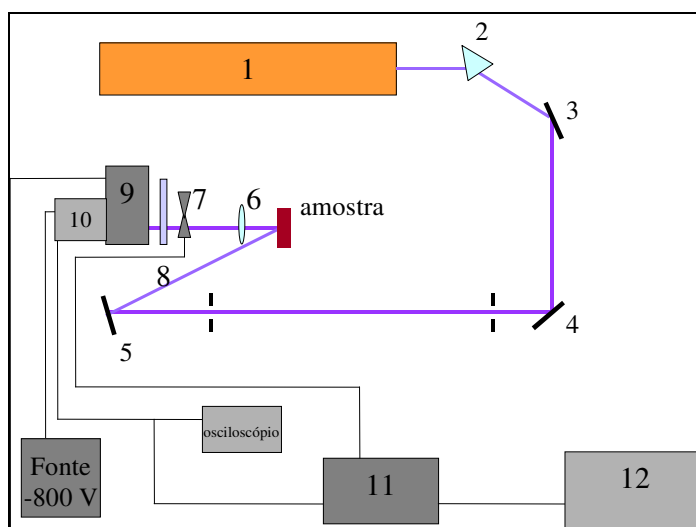


Figura 3.12: Esquema do sistema para medida de FIL de amostras de solo.

CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho baseou-se na caracterização química e espectroscópica das seguintes amostras:

- Lodo de esgoto;
- Solo de mata nativa (MT);
- Solo sem adição de lodo de esgoto, com adubação mineral (testemunha, T0);
- Solos com adição de lodo de esgoto (tratamentos T1, T2, T3 e T4);
- E respectivos ácidos húmicos (do lodo de esgoto, MT, T0, T1, T2, T3 e T4).

4.1 ÁREA EXPERIMENTAL

O experimento foi instalado e conduzido em outubro de 2000 na Fazenda Retiro, localizada no município de Monte Azul Paulista - SP, em condições de campo, cultivado com Laranjeira Natal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). A área experimental apresenta as seguintes coordenadas geográficas: altitude 575 m, longitude 48° 18' 58" WGr e latitude 21° 15' 22" S, na região tropical. O clima da região, segundo a classificação de KOEPPEN é mesotérmico, com inverno seco (Cwa) e com chuvas no verão, apresentando precipitação média anual de 1600 mm e temperatura média anual em torno de 24°C.

Na montagem do experimento foram utilizados 5 tratamentos constituídos por uma testemunha (fertilização mineral com base na análise do solo) e 4 doses de lodo de esgoto, T1 - 1,0 Mg ha⁻¹; T2 - 2,0 Mg ha⁻¹; T3 - 3,0 Mg ha⁻¹ e T4 - 4,0 Mg ha⁻¹, perfazendo uma dose acumulada do resíduo de T1 - 3,0 Mg ha⁻¹; T2 - 6,0 Mg ha⁻¹; T3 - 9,0 Mg ha⁻¹ e T4 - 12,0 Mg ha⁻¹. As doses de lodo de esgoto se referem ao resíduo em base seca a 110°C. Utilizaram-se essas doses devido ao fato do lodo de

esgoto ter sido aplicado de forma concentrada em sulcos rasos aberto ao lado das plantas e na linha de projeção da copa da laranjeira e a necessidade de incorporação do resíduo pela presença de ovos de helmintos. O lodo de esgoto foi aplicado três vezes, em três anos consecutivos. A dose anual de lodo de esgoto foi dividida em duas aplicações iguais, a primeira realizada no mês de outubro e a segunda, 60 dias após.

O lodo de esgoto foi aplicado com sua umidade natural em dois sulcos, um para cada uma das aplicações. Os sulcos foram abertos com um cultivador ao lado da linha de plantio, na linha de projeção da copa das plantas, sendo um deles localizado na parte superior do terreno em relação à declividade, e o outro, na parte inferior, a uma profundidade de 10 cm. A primeira aplicação do lodo de esgoto foi feita no sulco localizado na parte superior do terreno.

A aplicação do resíduo no sulco foi feita manualmente, utilizando-se baldes com capacidade para 20kg.

4.2 CARACTERÍSTICAS DO SOLO E DO LODO DE ESGOTO

O solo utilizado no experimento é classificado como Argissolo Vermelho Amarelo distrófico, de textura média, ao qual foi incorporado lodo de esgoto.

Antes da instalação do experimento, foi realizada amostragem de solo para avaliação do nível atual de fertilidade do solo em maio de 2000, tendo sido coletadas 20 amostras simples para se obter a amostra composta representativa da área. As amostras foram coletadas na linha de projeção da copa das plantas com trado tipo rosca na profundidade de 0 - 20 cm. Os resultados obtidos na análise de fertilidade revelaram: P = 12 (mg dm^{-3}), MO = 18 (g dm^{-3}), pH em CaCl_2 = 5,5, K = 4,3, Ca = 24, Mg = 12, H+Al = 18, SB = 40,3 e T = 58,3 ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$) e V% = 69.

O lodo de esgoto utilizado no experimento foi obtido na ETE da SABESP, em Franca, a qual trata apenas esgoto doméstico. Considerando que o experimento em campo iniciou-se há mais de 5 anos, não foi possível efetuar a análise nas amostras de lodo de esgoto usado em cada uma das aplicações, de tal forma que as avaliações na fração AH do lodo de esgoto foram feitas com material proveniente da mesma ETE. Portanto, os resultados obtidos são somente indicativos das características do material que foi incorporado ao solo.

4.3 AMOSTRAGEM

A amostragem foi realizada em dezembro de 2004 (quarto ano do experimento). Considerando que o preparo do solo foi realizado com um trado rotativo na camada superficial (plantio convencional) e uma enxada rotativa para incorporação do lodo de esgoto ao solo. A amostragem do solo foi realizada na linha de projeção da copa sobre o sulco de aplicação do lodo de esgoto, nas camadas 0-10, 10-20 e 20-30cm, onde está concentrada a quase totalidade da MOS. As amostras foram coletadas em duplicata.

O solo da mata nativa próxima ao pomar e o lodo de esgoto também foram amostrados. Foram coletadas amostras sem e com aplicação de lodo de esgoto.

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO E LODO PARA A EXTRAÇÃO

Para que o material se tornasse o mais homogêneo possível, e de textura fina, foi seco ao ar e à sombra e peneirado, então submetido à moagem em moinho tipo Willey com peneira de 40 mesh.

Na preparação das amostras para extração, o solo foi acondicionado em bandejas de plástico, seco à sombra, em seguida foi realizada uma limpeza manual para retirada das raízes e restos de plantas, e passado em peneira de 0,5mm para homogeneização do material e remoção de partículas maiores.

4.5 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS ÁCIDOS HÚMICOS

Os experimentos iniciaram-se com o fracionamento químico da MOS para obtenção das SH (ácido húmico, ácido fúlvico e humina).

As SH são usualmente fracionadas com base em características de solubilidade, sendo o AH a fração solúvel em álcalis e insolúvel em meio ácido. O percentual de material húmico extraído varia consideravelmente de um tipo de matriz para outro, e, em geral, é maior quando se aumenta o pH do extrator e a temperatura de extração.⁸ As várias frações obtidas são compostas de uma mistura heterogênea de moléculas polidispersas, com massa molar variando de centenas até milhares.

De acordo com Stevenson (1994), o método de extração ideal seria aquele que permitisse o isolamento do AH inalterados, livres de contaminantes e representativos de toda a amplitude de massas moleculares, e que fosse aplicável a qualquer tipo de matriz. Entretanto, tal método ainda não fora desenvolvido e, provavelmente, nunca o será, dada a complexidade da matriz.

Dentre os vários solventes empregados nos processos de extração do AH em matrizes sólidas, a solução de NaOH é a mais utilizada e é a sugerida pela International Humic Substance Society (IHSS). Sua principal vantagem é extrair uma maior quantidade de material do que qualquer outro extrator disponível. No entanto, esse extrator tem recebido diversas críticas,⁸ como o fato de dissolver a sílica e

tecidos orgânicos frescos que contaminariam o extrato, e promover alterações químicas, como auto-oxidação de alguns componentes orgânicos e condensação entre aminoácidos e carbonilas de aldeídos aromáticos, decorrentes da absorção de oxigênio da atmosfera.

Comparando a capacidade de extração de SH por vários solventes, alguns autores verificaram que a maior capacidade de extração simultânea do AH e ácido fúlvico é por NaOH diluído. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Schnitzer e Preston (1986).

A solução mais diluída promove uma extração mais branda, com menores possibilidades de alterações da estrutura original. O objetivo da extração é a obtenção do composto isolado.

Todas as amostras de solos, foram submetidas a um processo de extração e fracionamento químico das SH por diferença de solubilidade, seguindo a metodologia recomendada pela IHSS, o qual utiliza solução de NaOH diluído para dissolver AH e HCl para sua precipitação.

Durante o fracionamento químico a fração ácido fúlvico foi descartada, devido à pequena quantidade que seria obtida ao final do processo. Essa pequena quantidade de ácido fúlvico purificado não seria suficiente para a preparação de amostras a serem utilizadas nas técnicas propostas no plano de trabalho. Apenas o AH obtido foi analisado.

Para a extração das SH,⁸² foram utilizadas aproximadamente 100g de terra fina seca ao ar (TFSA) para cada amostra, passada em peneira de 0,5 mm.

Inicialmente, o pH de cada amostra foi ajustado para 1-2 com a adição de HCl 1mol.L⁻¹. O volume da solução foi ajustado com HCl 0,1mol.L⁻¹ até atingir uma concentração final com uma relação de 10mL de líquido/1g de TFSA. A solução foi

agitada manualmente durante 1 hora e, após deixar a solução em repouso, separou-se o sobrenadante por sifonação.

O sobrenadante separado (**AF Extrato 1**), que seria utilizado para a extração de ácido fúlvico, foi descartado após neutralização.

Ao solo residual foi adicionado NaOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$, resultando no final uma relação solo-solução 10:1. A solução sofreu agitação intermitente durante 4 horas. A seguir, a suspensão ficou em repouso por 16 horas e o sobrenadante foi isolado através de uma centrifugação (10.000 rpm – 20 min) e reservado para posterior acidificação. O material insolúvel, denominado humina, também foi descartado.

O sobrenadante isolado foi acidificado com HCl 6mol.L^{-1} , com agitação simultânea até atingir pH 1,0 e mantido novamente em repouso por 16 horas. Na seqüência, a solução foi centrifugada (10.000 rpm – 20 min) para separar o AH (precipitado) e as frações de ácido fúlvico (sobrenadante – **AF Extrato 2**). O sobrenadante foi neutralizado e descartado.

A fração de AH foi redissolvida através da adição de um pequeno volume conhecido de KOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$. A seguir, adicionou-se KCl na forma sólida, atingindo uma concentração de $0,3\text{mol.L}^{-1}$ $[\text{K}^+]$. Após, centrifugou-se a solução sob alta velocidade (13.000 rpm – 20 min) para que os sólidos suspensos fossem removidos.

O AH foi então reprecipitado, adicionando-se HCl 6mol.L^{-1} com agitação simultânea até que fosse atingido pH 1,0 – 1,5, e após, a suspensão foi mantida em repouso por 16 horas. Centrifugou-se a solução (10.000 rpm – 20 min) e o sobrenadante foi então descartado.

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

A seguir, a solução foi centrifugada (10.000 rpm – 20 min) e o precipitado foi transferido para uma membrana de diálise (Spectra/Por 6000 – 8000 D), preparada segundo a metodologia de Mc Phie (1971), utilizando água deionizada. Procedeu-se a diálise contra água deionizada até que a água da diálise apresentasse teste negativo de Cl⁻ com nitrato de prata (AgNO₃). Para isso, tal procedimento foi mantido durante aproximadamente 5 dias, fazendo-se a troca da água deionizada duas vezes por dia.

Todas as amostras de AH foram extraídas nas mesmas condições de acordo com a metodologia.

A extração de AH das amostras de lodo de esgoto seguiu a mesma metodologia adotada para as amostras de solo.

4.6 PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS

O AH extraído de acordo com o procedimento utilizado contém íons metálicos que podem interferir em sua caracterização. Alguns AH, dependendo de suas origens, podem apresentar um teor de cinzas de até 30%. Considerável redução nesta quantidade pode ser obtida por diálise, utilizando-se membranas específicas.

A purificação do AH é feita geralmente com solução mista de HCl e HF, que promove a quebra das ligações Si-O entre a argila e a MO, solubilizando dessa forma os argilo-minerais. Sánchez-Monedero et al. (2002)⁸³ verificaram que o tratamento com HCl-HF reduz significativamente o teor de cinzas dos AH sem grande alteração na sua composição química e na sua estrutura.

As amostras foram purificadas por diálise usando membranas Spectra/Por 6 - 8000D, durante 5 dias, em água deionizada.

Antes de serem utilizadas na purificação do AH, as membranas foram devidamente tratadas para remoção de glicerina, traços de compostos sulfurosos e metais, seguindo o procedimento estabelecido⁸⁴:

1. Removeu-se a quantidade de tubos de diálise necessária para o experimento e deixou-se ferver por 1 hora em 2-5 litros de etanol 50%;
2. Repetiu-se a preparação seqüencialmente por períodos de 1 hora em outro volume igual de etanol 50%, em 2 trocas de bicarbonato de sódio 10mmol^{-1} , EDTA 1mmol^{-1} e em 2 trocas de água deionizada à temperatura ambiente;
3. Estocou-se a 4°C em água deionizada.
4. Antes do uso, os tubos foram rigorosamente enxaguados com água deionizada.

Após a purificação, as amostras de AH foram liofilizadas em liofilizador Savant Speed Vac e estocadas em dessecador.

O processo de purificação adotado foi aplicado tanto para o AH extraído do solo sem tratamento como para aqueles submetidos à aplicação de lodo de esgoto e também para o lodo de esgoto.

4.7 TESTE DE PUREZA: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

Terminada a diálise, o AH foi liofilizado e procedeu-se então a análise do teor de cinzas. Tal procedimento consistiu na queima de 20mg de AH em mufla (800°C – 2 horas) do ácido humico liofilizado, sendo o teor de cinzas calculado por diferença entre massa final e inicial de cada amostra.

O AH extraído dos solos, freqüentemente contém uma considerável quantidade de impurezas inorgânicas. Uma redução satisfatória do teor de cinzas pode ser obtida por repetidas etapas de dissolução -precipitação -centrifugação e

utilização da diálise. Para a retirada da argila é necessário fazer-se centrifugação em alta velocidade, após redissolver o AH em solução levemente alcalina. Medidas do teor de cinzas das amostras foram feitas anteriormente às análises elementares.

Os AH foram analisados com relação à composição elementar, absorção de radiação no UV-Vis, FTIR, ^{13}C RMN, EPR e fluorescência, e as amostras de solo foram caracterizadas por TOC e FIL.

A utilização em conjunto dos métodos químicos e espectroscópicos fornecem significativos avanços na identificação e caracterização dos diferentes compostos húmicos, e na avaliação das alterações estruturais das SH e da MOS.⁸⁵

4.8 ANÁLISE ELEMENTAR

Foram realizadas as análises químicas de C, N, H e S das diferentes amostras de AH obtidas usando equipamento CE – Instruments EA1110, pertencente ao CAQUI (Centro de Análises Químicas) do Instituto de Química de São Carlos - SP. O oxigênio foi obtido por diferença [%O={C+N+H+S}-100}%] (4.1). Para cada amostra foram feitas medidas em duplicata.

O cálculo da razão C/N foi efetuado a partir dos percentuais de C e N. Esta razão fornece informações sobre o processo de humificação das SH.

4.9 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL

A determinação da porcentagem de carbono total (COT) também foi realizada. O equipamento utilizado foi o equipamento Total Organic Carbon Analyzer, modelo TOC-V, marca Shimadzu, acoplado ao Solid Sample Module,

SSM-500A, marca Shimadzu, pertencente ao laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos (USP).

Esta técnica foi utilizada para determinação de carbono orgânico total das amostras de solo. Por ser o solo um material bastante heterogêneo e devido a grande quantidade de material utilizado, quando comparado a outras técnicas apresenta resultados mais confiáveis.⁸⁶

4.10 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

4.10.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

As medidas de EPR foram realizadas segundo metodologia de Martin-Neto et al. (1991). A potência de microondas utilizada foi de 0,2 mW, amplitude de modulação de 1G_{pp} (Gaus pico a pico), frequência de modulação de 100 KHz, 16 varreduras e temperatura ambiente. Foram utilizados aproximadamente 20mg de AH para efetuar-se o experimento, as quais foram inseridas em tubos de quartzo com diâmetro interno de 3,5mm. Apesar de haver uma pequena diferença entre as massas, o volume das amostras dentro dos tubos de quartzo foram bem semelhantes para minimizar possíveis variações no fator de preenchimento da cavidade. A semelhança entre os volumes das amostras (e das referências) e sua geometria são um dos principais fatores que envolvem o cálculo da concentração de radicais livres, bem como temperatura da amostra e amplitude de modulação. As medidas do nível de radicais livres do tipo semiquinona nas SH, foram realizadas utilizando-se o método do padrão secundário.⁸⁷

Foi utilizado um espectrômetro EPR de onda contínua da Bruker, modelo EMX de cavidade retangular, banda X ($\approx 9,0$ GHz), pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária.

A concentração de radicais livres do tipo semiquinona (spin g^{-1}) foi obtida através da integral dupla do espectro de RPE e utilizando a aproximação $I \times \Delta H^2$, onde I corresponde a intensidade do sinal e ΔH a largura de linha tomadas pico a pico.⁸⁸ Posteriormente, comparou-se à um padrão “Strong Pitch” com concentração de spins conhecida (3×10^{15} spins cm^{-1}) fornecido pela Bruker, utilizando rubi sintético como padrão secundário.^{53,89} A quantidade de radicais livres do tipo semiquinona foi normalizada pela massa de cada amostra.

Uma das principais informações a respeito das SH é a medida do grau de humificação. Um parâmetro que reflete essa propriedade intrínseca das SH é o nível de radicais livres do tipo semiquinona. A técnica de RPE permite detectar e quantificar os radicais livres do tipo semiquinona, e conseqüentemente o grau de humificação das SH.⁸⁵ Assim usando metodologia bem conhecida, esse parâmetro foi acompanhado em todas as amostras de interesse.

Oferece informações sobre a natureza e concentração dos radicais livres presentes nas SH e as mudanças produzidas em função dos fatores ambientais. Permite ainda identificar, sem a destruição das amostras, átomos ou grupos.

4.10.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ^{13}C RMN em estado sólido foram obtidos utilizando a seqüência de ^{13}C RMN, CP com VA e MAS, empregando uma sonda para amostras sólidas com marca Doty. A freqüência de ressonância foi 100,58MHz (^{13}C), a banda espectral utilizada para a CP foi de 50 KHz, tempo de contato de 1 ms, tempo de

repetição de 500 ms, tempo de aquisição de 0,0128 ms. A varredura foi de 0-230 ppm. As amostras de AH foram medidas em rotores de zircônia de 5 mm, com MAS de 6,4 KHz. A rampa no canal de ^1H foi de 110-60% (em KHz) da condição de Hartman-Hahn.⁹⁰ Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao tetrametilsilano e referenciados em relação ao hexametilbenzeno.

Para a realização dos experimentos foi utilizado em torno de 300 mg de AH. Foram feitas medidas de ^{13}C RMN com amostras sólidas utilizando-se as técnicas de rotação segundo o ângulo mágico, amplitude variável e polarização cruzada monitorando os núcleos do isótopo ^{13}C .

A partir das áreas dos espectros foram calculadas as intensidades relativas dos grupos: alifáticos não substituídos (0-45 ppm), metoxil e N-alifáticos (45-60 ppm), O-alifáticos (60-110 ppm), aromáticos (110-140 ppm), fenólicos (140-160 ppm), carboxílicos (160-185 ppm) e carbonílicos (185-230 ppm).^{8,91}

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

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

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

As informações obtidas com as medidas de ^{13}C RMN foram do grau de aromaticidade e alifaticidade das amostras, caracterização estrutural com identificação de compostos como ligninas, taninos, carboidratos, grupos metoxílicos e carboxílicos entre outros. Foi utilizado um espectrômetro Varian 400 MHz Unity da Embrapa Instrumentação Agropecuária.

4.10.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO NO UV-VIS

Foi feita a varredura do espectro na região de 200 a 800 nm, com velocidade de varredura de 300nm/min e as leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 465 e 665nm. Para obtenção dos espectros de absorção de radiação no UV-Vis foram preparadas soluções de 2 mg de amostra de AH em 10 mL de solução 0,05 mol L⁻¹ de NaHCO₃ e ajustando o pH em torno de 8,⁸ e por diluição foram preparadas soluções de 10 mg Kg⁻¹. Foi utilizado um equipamento Shimadzu UV-1601-PC, pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária.

4.10.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

As medidas foram feitas segundo metodologia bem estabelecida na literatura,⁸ utilizando pastilhas de 1,0±0,1mg de AH em 100,0±1mg de KBr seco. Os espectros foram obtidos utilizando 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹, na escala de comprimento de onda de 4000 a 400 cm⁻¹. No momento da leitura dos espectros procedeu-se à correção automática da linha de base em 4000, 2000 e 200cm⁻¹, igualando-se a zero. Utilizou-se o espectrômetro de FTIR Perkin-Elmer modelo Spectrum 1000, pertencente a Embrapa Instrumentação Agropecuária de São Carlos.

4.10.5 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-Vis

Cada amostra de AH foi dissolvida em uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,05 mol L⁻¹ com concentração de 20 mg L⁻¹. Essa concentração foi utilizada para minimizar o efeito de reabsorção de fluorescência e reduzir interações

entre moléculas. O pH final das soluções ficou em torno de 8. Após a preparação das soluções, os espectros de emissão de fluorescência e varredura sincronizada foram medidos utilizando-se espectrômetro de luminescência Perkin Elmer LS-50B. A abertura das fendas de entrada e saída foi 9 nm e a velocidade de aquisição foi de 500 nm/min.

Os espectros de fluorescência foram adquiridos nos modos de emissão e varredura sincronizada, segundo as metodologias propostas por Zsolnay et al. (1999), Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (2000).

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

Na metodologia proposta por Milori et al. (2002), foram obtidos os espectros de emissão com excitação em 465 nm, intervalo de varredura entre 480-700 nm e com filtro aberto. A determinação do índice de humificação foi baseada na absorção em 465 nm (A_{465}). O índice de humificação foi calculado da seguinte forma: A_4/A_1 , sendo A_4 a integral da região compreendida entre 553 e 620nm nos espectros de emissão dos AH com comprimento de onda de excitação $\lambda_{ex}=240$ nm, e A_1 a integral da região compreendida entre 350 e 418nm.

A partir da metodologia de Kalbitz et al. (2000), foram obtidos espectros de varredura sincronizada entre 300-520 nm simultaneamente com excitação e emissão com filtro aberto e diferença de comprimento de onda $\Delta\lambda = 55$ nm. A determinação do índice de humificação foi realizada a partir da razão entre as intensidades de fluorescência em 400 e 360 nm, ou 470 e 360 nm.

4.10.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

O grau de humificação da MOS pode ser medido através da espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL).⁸⁰

Para FIL, as amostras de solo foram secas ao ar, moídas e peneiradas em malha de 0,5 mm. Antes de serem submetidas à espectroscopia de FIL, as amostras foram prensadas (em uma forma de aço) em pastilhas com 1 cm de diâmetro, 2 mm de espessura e 0,5 g de massa (Figura 3.11A), a fim de facilitar a colocação das mesmas no sistema utilizado para análise. A utilização de pastilhas de solo é devido à sua fácil manipulação em laboratório e a superfície plana das suas faces, ideal para a análise da fluorescência emitida.

Como cada pastilha de solo intacto possui duas faces ideais para as medidas de FIL, para cada pastilha, foram obtidos dois espectros de FIL. Havendo duas pastilhas por amostra, foi obtido um total de quatro espectros para cada amostra.

A montagem experimental do sistema de FIL está mostrada na Figura 3.12. A excitação da fluorescência foi feita com um laser de argônio (Coherent – modelo Innova 90C - 458 nm – 300mW), sintonizado na linha de 458 nm com uma potência de 300 mW.

Conforme ilustra a Figura 3.12, na saída do laser foi colocado um prisma para remover a fluorescência do gás de fundo. A fluorescência das amostras é coletada por uma lente convergente e focalizada sobre a fenda do monocromador da marca CVI (1200 g mm^{-1} e “blaze” em 500 nm). A detecção é feita através de uma fotomultiplicadora Hamamatsu com pico de resposta espectral em 530 nm. O sinal da fotomultiplicadora foi amplificado e retificado por um amplificador Lock-in e em seguida enviado para o sistema de aquisição de dados, controlado por um micro computador. A resolução espectral deste sistema para fluorescência de solos é em

torno de 4 nm. Um software foi desenvolvido para a aquisição de dados e controle do sistema. Neste sistema a emissão de fluorescência espalhada é medida providenciando informações sobre estruturas presentes na superfície da amostra.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE ELEMENTAR E TEOR DE CINZAS

Os valores obtidos para composição elementar dos AH e os teores de cinzas estão apresentados na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Carbono (C), nitrogênio (N), hidrogênio (H) e oxigênio (O), cinzas em amostras de AH extraídos do solo e do lodo de esgoto

Profundidades (cm)	C (%)	N (%)	H (%)	O (%)	Cinzas (%)
Lodo de esgoto					
-	51,4 ± 0,4	7,6 ± 0,2	6 ± 2	28,9 ± 2,6	4,1
Solo de Mata					
0 - 10 cm	43,3 ± 0,4	3,9 ± 0,1	5,0 ± 0,8	43,2 ± 1,3	3,6
10 - 20 cm	43,6 ± 0,2	4,1 ± 0,3	5,3 ± 0,6	42,8 ± 1,1	3,0
20 - 30 cm	42,7 ± 0,5	4,4 ± 0,1	4,9 ± 0,2	43,4 ± 0,8	4,5
Testemunha (sem adição de lodo de esgoto)					
0 - 10 cm	49,4 ± 0,5	4,8 ± 0,4	4,9 ± 0,2	34,8 ± 1,1	3,8
10 - 20 cm	51,3 ± 0,1	5,4 ± 0,4	5,0 ± 0,1	33,6 ± 0,6	3,3
20 - 30 cm	48,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1	3,8 ± 0,1	35,4 ± 0,3	4,8
Tratamento com 3 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto⁽¹⁾					
0 - 10 cm	49,9 ± 0,1	5,0 ± 0,2	4,7 ± 0,3	33,1 ± 0,6	5,0
10 - 20 cm	50,1 ± 0,3	5,2 ± 0,2	5,7 ± 0,4	33,3 ± 1,0	4,5
20 - 30 cm	49,7 ± 0,6	5,2 ± 0,3	5,5 ± 0,2	35,4 ± 1,1	4,2
Tratamento com 6 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto⁽¹⁾					
0 - 10 cm	47,7 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,1	39,0 ± 0,3	3,8
10 - 20 cm	47,6 ± 0,1	4,5 ± 0,1	5,0 ± 0,1	38,9 ± 0,3	4,0
20 - 30 cm	45,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1	5,2 ± 0,1	39,4 ± 0,3	4,8
Tratamento com 9 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto⁽¹⁾					
0 - 10 cm	49,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,5 ± 0,1	37,8 ± 0,3	3,3
10 - 20 cm	48,6 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,2 ± 0,1	37,8 ± 0,3	3,4
20 - 30 cm	48,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,2 ± 0,1	37,6 ± 0,3	3,4
Tratamento com 12 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto⁽¹⁾					
0 - 10 cm	49,3 ± 0,1	4,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1	36,0 ± 0,3	4,3
10 - 20 cm	48,8 ± 0,1	4,6 ± 0,1	5,4 ± 0,1	37,1 ± 0,3	4,2
20 - 30 cm	48,7 ± 0,1	4,1 ± 0,1	5,3 ± 0,1	37,8 ± 0,3	4,3

⁽¹⁾ Doses acumuladas de lodo de esgoto aplicadas nos três anos de experimentação.

As análises elementares proporcionaram informações sobre a distribuição dos elementos químicos principais (C, N, H e O) no AH, cuja concentração não variou significativamente com os tratamentos e com as profundidades de amostragem (Tabela 5.1).

Esse método é relevante para análise de amostras homogêneas como AH, fornecendo resultados satisfatórios com baixo desvio padrão, quando comparado ao solo que é um material bastante heterogêneo, o qual apresenta altos desvios nas médias das réplicas, devido a pouca quantidade de amostra utilizada.

O teor de cinza de todas as amostras ficou abaixo de 5%, conforme a Tabela 5.1. Os baixos teores de cinzas encontrados, se deve ao fato de terem sido tratadas com HF/HCl,⁸² no processo de purificação durante o processo de extração.

Na Tabela 5.2 estão apresentadas as razões C/N calculadas a partir dos dados obtidos por análise elementar.

A relação C/N do AH extraído do lodo de esgoto apresentou valor mais baixo que os obtidos para o solo, ou seja, o lodo de esgoto apresentou proporcionalmente concentração mais elevada de compostos nitrogenados.

Adicionado ao solo, o lodo de esgoto vai ser utilizado pelos organismos do solo, de tal modo que sua relação C/N vai se alterar e no final o que se vai obter é a relação C/N do solo. Na mata, a relação C/N do AH diminui com a profundidade, o que está ligado ao aporte contínuo do material orgânico na superfície do solo. Tal fato não ocorreu no solo cultivado com citros, o que se deve à movimentação do solo nas camadas superficiais no sistema de manejo convencional.

Tabela 5.2: Relações C/N das amostras de AH extraídos do solo e do lodo de esgoto

Profundidades	C/N
Lodo de esgoto	
6,7	
Mata	
0 – 10 cm	11,1
10 – 20 cm	10,6
20 – 30 cm	9,7
Testemunha	
0 – 10 cm	10,3
10 – 20 cm	9,5
20 – 30 cm	10,0
Tratamento 3 Mg ha⁻¹ (1)	
0 – 10 cm	10,0
10 – 20 cm	9,6
20 – 30 cm	9,6
Tratamento 6 Mg ha⁻¹ (1)	
0 – 10 cm	10,4
10 – 20 cm	10,6
20 – 30 cm	10,0
Tratamento 9 Mg ha⁻¹ (1)	
0 – 10 cm	10,0
10 – 20 cm	9,9
20 – 30 cm	10,0
Tratamento 12 Mg ha⁻¹ (1)	
0 – 10 cm	10,7
10 – 20 cm	10,6
20 – 30 cm	11,9

(1) Dose acumulada de lodo de esgoto aplicadas nos três anos de experimentação.

5.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Para as SH, o sinal do radical livre orgânico dado por RPE é atribuído possivelmente aos radicais livres do tipo semiquinona, contudo os resultados obtidos não estão em consenso com Senesi, (1990); Marques, (1998); Novotny, (2000); González-Pérez, (2003); Santos, (2006).

Os valores do número de spin (g C^{-1}) de radicais livres do tipo semiquinona, que foram obtidos a partir dos espectros, são apresentados na Figura 5.1.

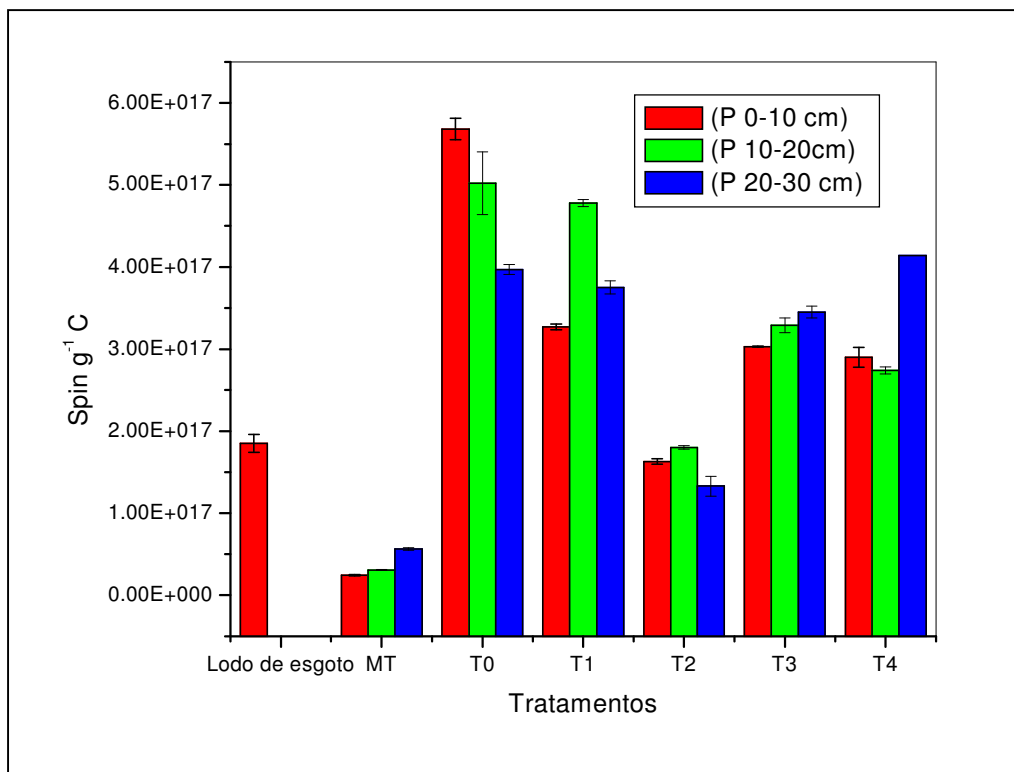


Figura 5.1: Dados da concentração de radicais livres do tipo semiquinona em spin (g C^{-1}) obtidos para os AH extraídos do solo e lodo de esgoto, em diferentes profundidades e tratamentos.

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

O lodo de esgoto apresentou uma concentração de radicais livres do tipo semiquinona da ordem de $1,9 \times 10^{17}$ spin (g C^{-1}) (Figura 5.1), o que sugere que sua aplicação deveria provocar um aumento na concentração de radicais livres do solo. Na realidade, até a dose de 6 Mg ha^{-1} , o lodo de esgoto causou diminuição na concentração de radicais livres do solo, enquanto as doses mais elevadas (9 e 12 Mg ha^{-1}) provocaram aumento em relação à dose 6 Mg ha^{-1} (Figura 5.1). Comparando-se o solo de mata com o solo cultivado com citros (tratamento

testemunha) verifica-se que a concentração de radicais livres do tipo semiquinona é muito menor no solo cultivado em sistema convencional. Desta forma, o uso agrícola do solo causa aumento nos radicais livres do tipo semiquinona. É preciso considerar, contudo, o sistema de amostragem adotado, que pode não estar espelhando fielmente o que realmente ocorreu nos diferentes tratamentos avaliados.

Sendo o lodo de esgoto um material com característica alifática, verifica-se que sua alifaticidade causa, a princípio, um efeito de diluição dos radicais livres do tipo semiquinona do solo, que teoricamente, deveria tender ao limite do número de radicais livres do tipo semiquinona do lodo de esgoto com uma dose extremamente elevada do resíduo. Este comportamento foi observado para as doses mais baixas de lodo de esgoto (3 e 6 Mg ha⁻¹). Tal comportamento talvez possa ser explicado pela atividade microbiana, ou seja, à medida que se aumentam as doses de lodo de esgoto, os microorganismos foram degradando a MO proveniente do lodo de esgoto, chegando ao momento que a qualidade do carbono que sobrava não era mais suficiente para degradação, ocasionando um aumento no nível de radicais livres do tipo semiquinona.

Vários fatores podem contribuir para explicar os resultados obtidos e devem ser considerados. Entre eles pode-se citar o tipo de solo estudado, o manejo empregado, o tipo de cultura, as condições climáticas do local e, principalmente, a origem e forma de decomposição de lodo de esgoto adicionado ao solo.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

É a principal técnica para identificar alterações estruturais, que refletem alterações nas propriedades do solo.

A análise quantitativa das regiões do espectro correspondentes aos grupamentos funcionais e as mudanças no grau de aromaticidade das SH tem sido usadas como parâmetros na avaliação dos impactos do manejo sobre as alterações qualitativas da MOS. Com a RMN ^{13}C no estado sólido com polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP/MAS), o tempo de obtenção de espectros quantitativos diminui bastante.⁹²

Os experimentos de ^{13}C RMN foram realizados a fim de se obter informações sobre a composição de grupos funcionais, dos AH extraídos dos solos e do lodo de esgoto.

As possíveis atribuições de sinais foram baseadas no conhecimento acumulado pela ^{13}C RMN em solos e AH nos trabalhos de vários autores.^{18,42,93,94,95,96,97,98,99,100}

Na Tabela 5.3 são mostrados os percentuais dos grupos funcionais associados as bandas correspondentes: grupos alifáticos (0-45ppm), N-alifáticos e metoxílicos (45-60ppm), O-alifáticos (60-110ppm), aromáticos (110-140ppm), O-aromáticos (140-160ppm), carboxílicos (160-185ppm) e carbonílicos (185-230ppm).

A partir dos resultados contidos na Tabela 5.3, não se observa diferença significativas entre o AH extraído do solo que recebeu e que não recebeu lodo de esgoto. Apenas o AH extraído do lodo de esgoto apresentaram diferenças em relação ao AH extraídos dos solos.

Na Tabela 5.4 são apresentadas as porcentagens de radicais alifáticos e aromáticos, calculados a partir dos espectros de ^{13}C RMN segundo Preston (1996). O lodo de esgoto apresentou menor porcentagem de aromáticos, o que mostra que o AH extraído do lodo de esgoto é menos humificado, quando comparado ao AH extraído do solo, incluindo altas porcentagens de grupos alifáticos. Com o aumento

das doses de lodo de esgoto não foram observadas variações significativas nos valores de aromaticidade e alifaticidade.

Tabela 5.3: Porcentagem da área total das bandas nos espectros de ^{13}C RMN com VACP/MAS de amostras sólidas de AH

Profundidades	0-45	45-60	60-110	110-140	140-160	160-185	185-230
Lodo de esgoto							
Lodo de esgoto	38	13	21	10	4	11	3
Mata							
0 – 10 cm	30	11	28	12	7	8	4
10 – 20 cm	25	10	28	13	7	11	6
20 – 30 cm	24	9	28	14	7	11	7
Testemunha							
0 – 10 cm	25	11	26	15	6	11	6
10 – 20 cm	26	12	26	14	6	11	5
20 – 30 cm	26	12	25	16	5	12	4
Tratamento com 3 Mg ha⁻¹							
0 – 10 cm	29	11	24	15	6	11	4
10 – 20 cm	27	11	25	15	5	12	5
20 – 30 cm	27	11	25	15	5	12	5
Tratamento com 6 Mg ha⁻¹							
0 – 10 cm	31	10	21	12	5	11	10
10 – 20 cm	28	10	25	15	6	11	5
20 – 30 cm	28	10	25	14	6	12	5
Tratamento com 9 Mg ha⁻¹							
0 – 10 cm	28	12	25	14	6	11	4
10 – 20 cm	26	11	26	15	6	11	5
20 – 30 cm	27	12	25	15	5	12	4
Tratamento com 12 Mg ha⁻¹							
0 – 10 cm	25	11	26	15	6	11	6
10 – 20 cm	24	11	26	16	6	12	5
20 – 30 cm	24	11	26	16	6	12	5

⁽¹⁾ Tratamentos com 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ indicam as doses acumuladas de lodo de esgoto aplicadas nos três anos de experimentação.

Tabela 5.4: Grupos aromáticos e alifáticos em amostras sólidas de AH obtidas através dos espectros de ^{13}C RMN de lodo de esgoto e de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto

Amostra	% aromáticos	% alifáticos
Lodo de esgoto		
	14	86
Mata		
MT – 1	19	81
MT – 2	20	80
MT – 3	20	80
Testemunha		
T0 – 1	21	79
T0 – 2	20	80
T0 – 3	21	79
Tratamento com 3 Mg ha⁻¹ (1)		
T1 – 1	21	79
T1 – 2	21	79
T1 – 3	21	79
Tratamento com 6 Mg ha⁻¹ (1)		
T2 – 1	17	83
T2 – 2	20	80
T2 – 3	20	80
Tratamento com 9 Mg ha⁻¹ (1)		
T3 – 1	20	80
T3 – 2	21	79
T3 – 3	21	79
Tratamento com 12 Mg ha⁻¹ (1)		
T4 – 1	22	78
T4 – 2	22	78
T4 – 3	22	78

(1) Tratamentos com 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ indicam as doses acumuladas de lodo de esgoto aplicadas nos três anos de experimentação.

As medidas de ^{13}C RMN VACP/MAS mostraram que os AH são bastante alifáticos, ou seja, alto conteúdo de grupos O-alkil-C e alkil C em relação aos aromáticos (Tabela 5.4).

O grau de aromaticidade é menos acentuado para o AH extraído do lodo de esgoto (14%), quando comparado ao AH extraído do solo (17-22%), sendo esta sua característica natural. Isso indica que o AH extraído do lodo de esgoto é menos humificado que o AH extraído do solo.

Em todos os casos, os espectros de ^{13}C RMN VACP/MAS obtidos para as amostras de diferentes tratamentos são semelhantes.

O AH é uma substância com aparente alta massa molecular, de estruturas complexas, que apresentam bandas largas nos espectros de RMN, como mostrado nas Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5.

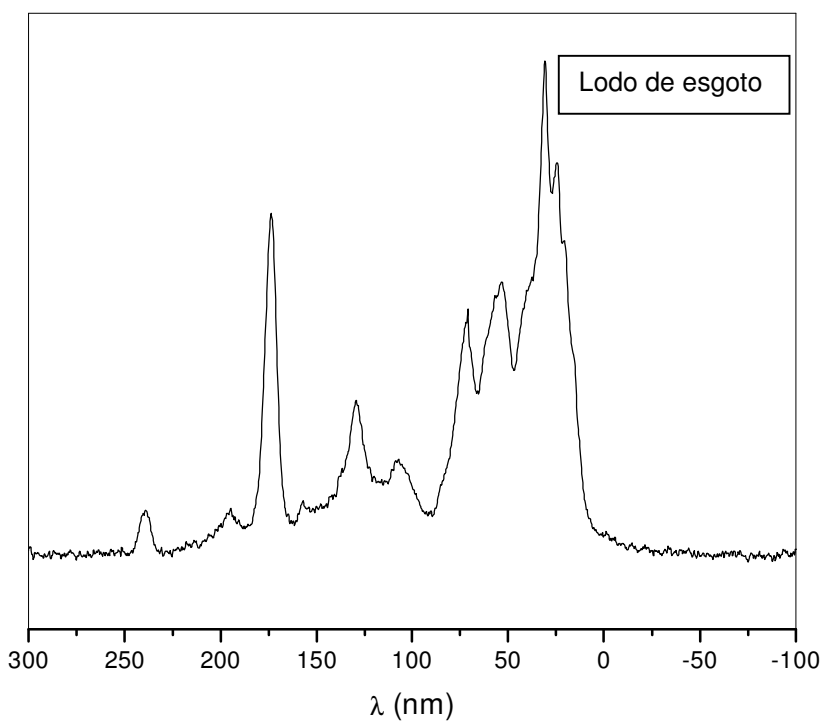


Figura 5.2: Espectro de ^{13}C RMN do AH extraído de lodo de esgoto.

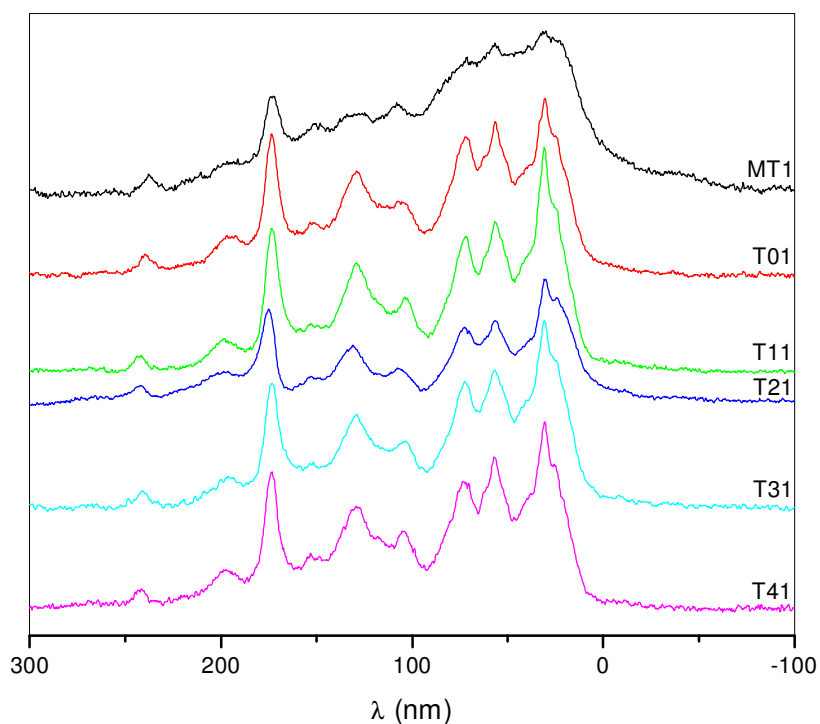


Figura 5.3: Espectros de ^{13}C RMN dos AH extraídos do solo para todos os tratamentos das amostras da camada superficial (0-10 cm). MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos).

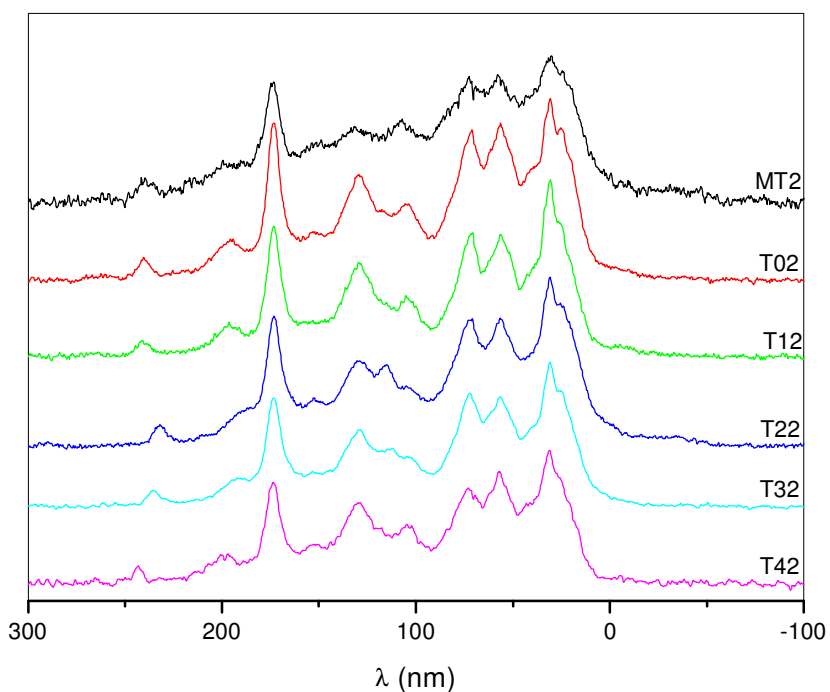


Figura 5.4: Espectros de ^{13}C RMN dos AH extraídos do solo para todos os tratamentos das amostras da camada 10-20 cm.

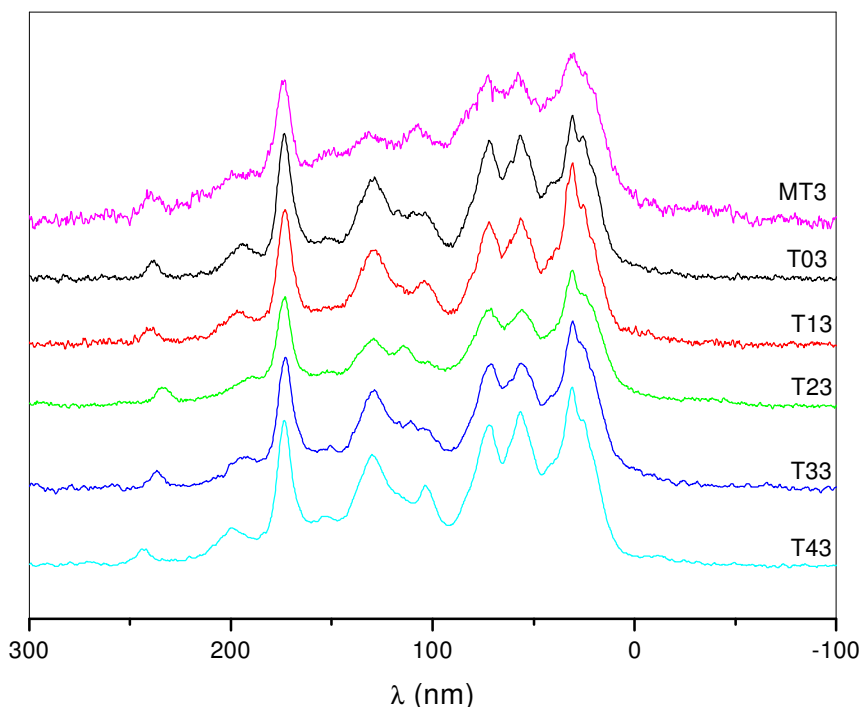


Figura 5.5: Espectros de ^{13}C RMN dos AH extraídos do solo para todos os tratamentos das amostras da camada 20-30 cm.

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos).

Medidas de ^{13}C RMN feitas indicaram que o lodo é um material bastante alifático enquanto que o solo cultivado com citros em sistema convencional, sem adição de lodo de esgoto, possui AH com maior concentração de grupos aromáticos.

As variações nas porcentagens de aromáticos e alifáticos são mínimas, ou seja, evidenciado anteriormente pelos resultados de análise elementar (Tabela 5.1), já que não foram observadas variações nos espectros dos AH, através do ^{13}C RMN.

Não foram observadas variações significativas nos grupos funcionais do AH através da espectroscopia de RMN ^{13}C no solo após aplicação de lodo de esgoto. O lodo de esgoto é incorporado, mas efetivamente, no tempo investigado, não causou alteração na fração húmica da MOS. A ausência de picos definidos nos espectros de RMN ^{13}C do solo de mata nativa é uma característica da amostra.

5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO NO UV-VIS

Experimentos de absorção de radiação na região UV-Vis foram realizados afim de se obter informações sobre o grau de condensação dos grupos aromáticos dos AH extraídos dos solos e do lodo de esgoto, cujos espectros encontram-se apresentados na Figura 5.6.

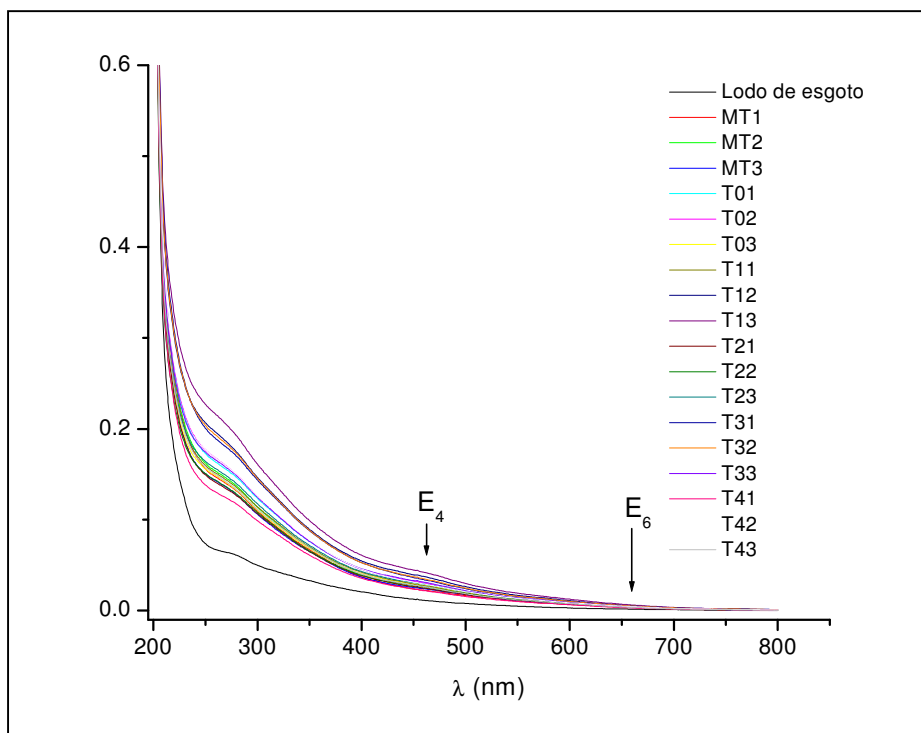


Figura 5.6: Espectros de absorção de radiação no UV-Vis das amostras de AH extraídas do solo e lodo de esgoto.

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

Em função da grande quantidade e variabilidade de grupos cromóforos existentes no AH, os espectros são geralmente formados pela sobreposição de bandas, sem máximos definidos, apresentando absorção decrescente com o

aumento do comprimento de onda, fato ocorrido tanto para os AH do solo, como do lodo de esgoto.

Com isso, nos espectros obtidos não se distingue qualquer banda que possa ser atribuída a determinado cromóforo ou grupo principal.

A informação obtida do espectro de UV-Vis é a razão entre as absorbâncias do AH em 465nm e 665nm. Este valor, conhecido como razão E_4/E_6 , tem sido usado na avaliação do grau de condensação grupos aromáticos e por sua vez ao grau de humificação²⁶ e para indicar diferenças nas massas moleculares dos AH.⁸ É assumido na literatura que o valor da razão E_4/E_6 é inversamente proporcional a massa molecular, assim uma alta razão E_4/E_6 infere uma massa molecular baixa, além disso baixo grau de condensação aromática, e conseqüentemente, a presença de proporções relativamente altas de cadeias laterais.¹⁰¹

Para todas as amostras analisadas, os espectros foram parecidos e as absorbâncias nos comprimentos de onda maiores de 500nm foram muito baixas e praticamente iguais em todos os casos (Figura 5.6).

Segundo alguns autores^{58,102} a razão E_4/E_6 pode ser utilizada como uma forma de estimar a aromaticidade, sendo que quanto menor a razão E_4/E_6 maior é o grau de aromaticidade das SH.

Contudo, tem sido observado resultados contraditórios e limitações neste procedimento simples, sugerindo o devido cuidado com sua utilização.¹⁰³ Os valores determinados através da razão E_4/E_6 devem ser utilizados e correlacionados com o devido cuidado com outros parâmetros espectroscópicos mais precisos.

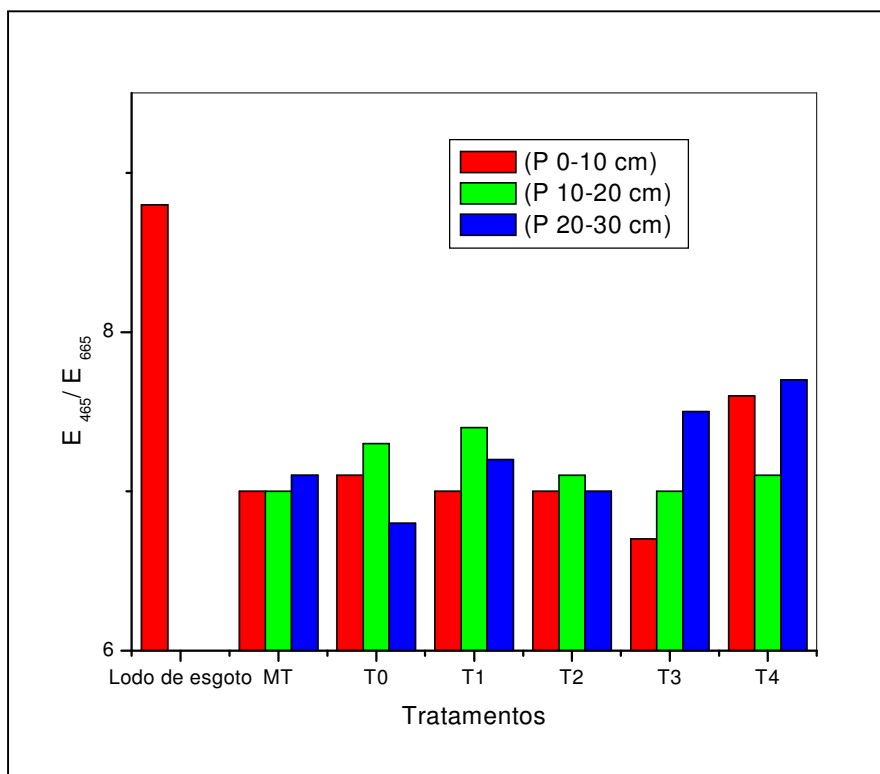


Figura 5.7: Valores da razão E_4/E_6 para os AH extraídos do solo e do lodo de esgoto. MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 $Mg\ ha^{-1}$ de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos).

Como se pode observar na Figura 5.7, os resultados para a razão E_4/E_6 não foram muito significativos, não tendo sido observada qualquer tendência e não houve correlação com outras técnicas utilizadas. Sabe-se que o decréscimo da razão E_4/E_6 está diretamente relacionada com o aumento do peso molecular, condensação de C aromáticos e aromaticidade, e inversamente relacionado à quantidade de grupos alifáticos. Apesar destas correlações serem largamente usadas na literatura, têm sido motivo de muita controvérsia.

5.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

As determinações FTIR foram realizadas objetivando obter informações sobre a composição dos grupos funcionais do AH extraído das amostras de solo e de lodo de esgoto.

A análise dos resultados baseia-se fundamentalmente na correlação, pico a pico, entre o espectro observado e as bandas de grupos funcionais identificados na literatura.

A interpretação dos espectros de FTIR foram realizadas de acordo com vários autores.^{26,65,104,105,106,107,108}

Os espectros na região do infravermelho para AH extraídos do solo e do lodo de esgoto estão apresentados nas Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11.

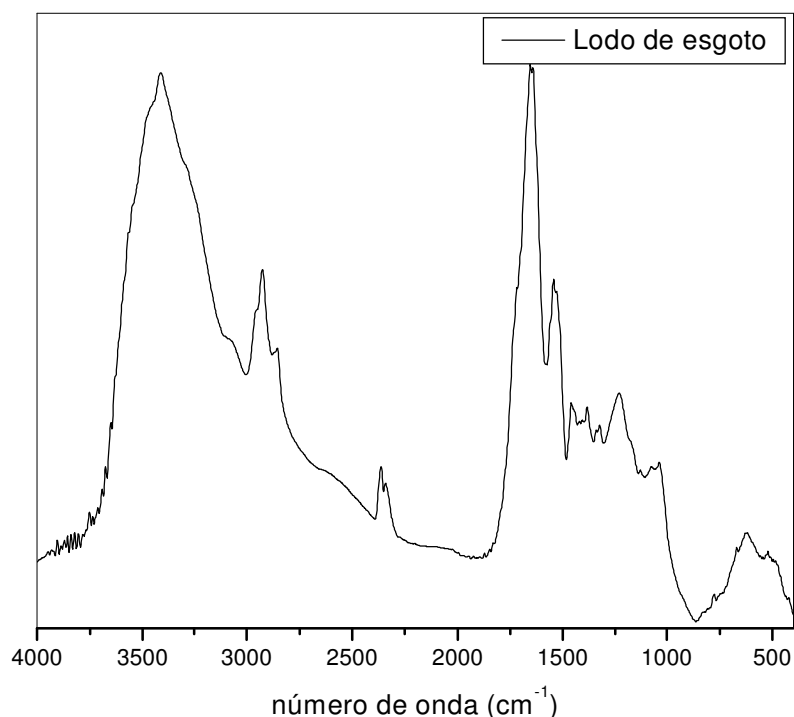


Figura 5.8: Espectros de FTIR obtido de AH extraído do lodo de esgoto.

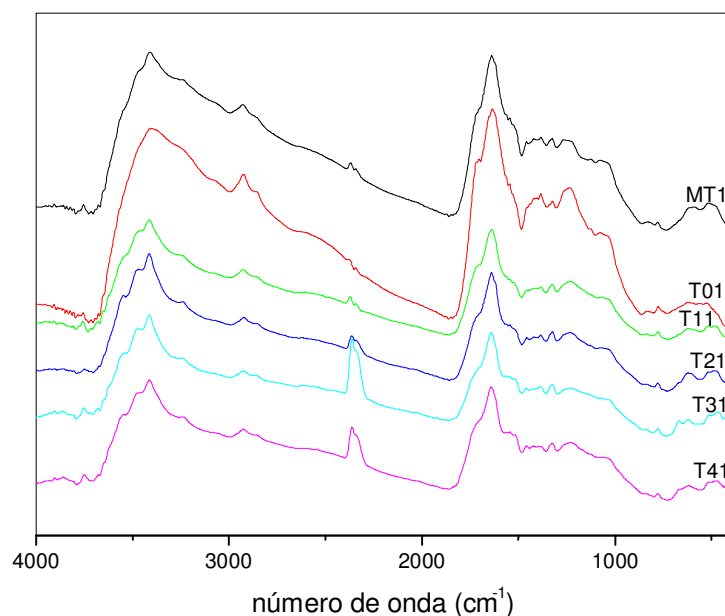


Figura 5.9: Espectros de FTIR de AH extraídos de amostras de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto e cultivado com citros em sistema convencional e obtidas na profundidade 0-10 cm.

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos).

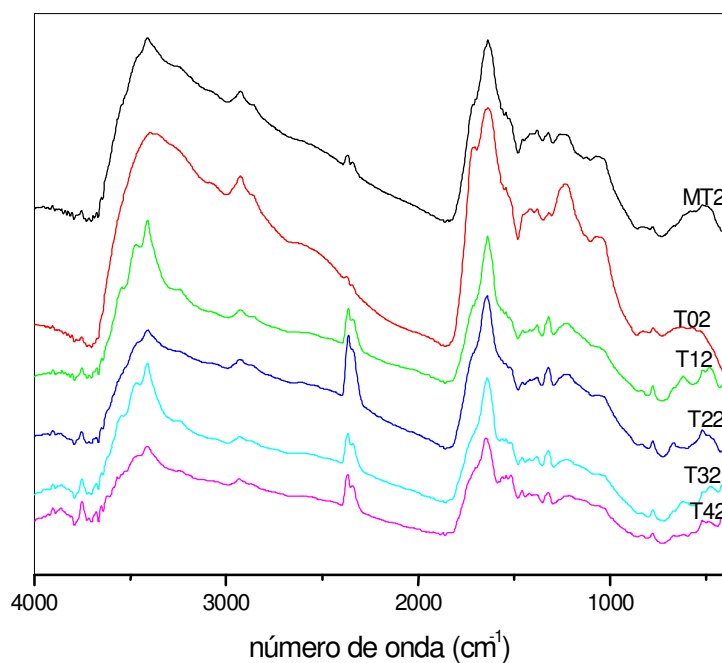


Figura 5.10: Espectros de FTIR de AH extraídos de amostras de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto e cultivado com citros em sistema convencional e obtidas na profundidade 10-20 cm.

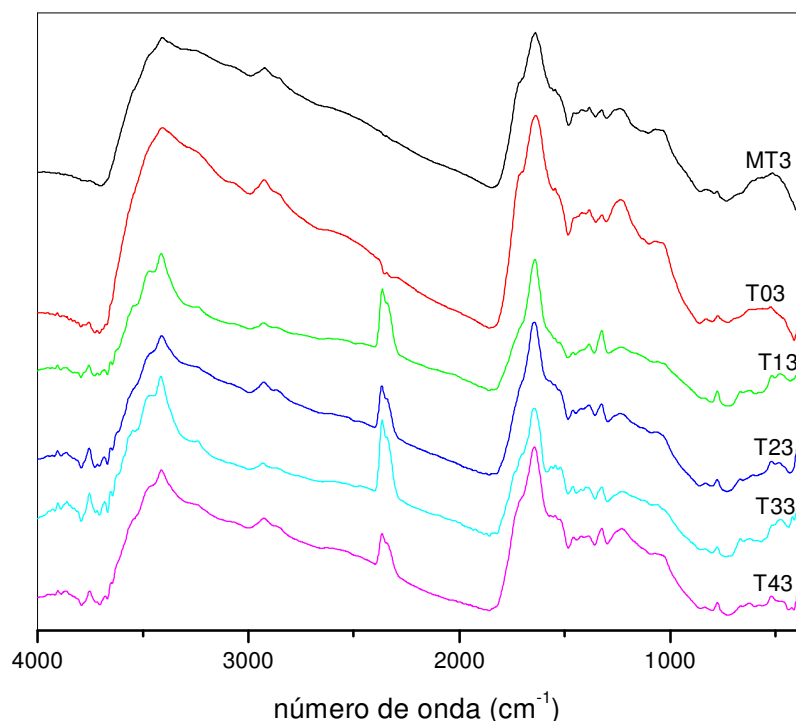


Figura 5.11: Espectros de FTIR de AH extraídos de amostras de solo tratado com doses crescentes de lodo de esgoto e cultivado com citros em sistema convencional e obtidas na profundidade 20-30 cm.

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos).

Comparando as bandas encontradas nos espectros dos AH extraídos do solo com o do AH extraído do lodo de esgoto constata-se a mesma tendência. Foi possível constatar a intensidade da banda na região de alta frequência, entre 3600 e 3070 cm⁻¹, atribuída às vibrações de estiramentos O-H, indicando a abundante presença dos grupos OH nos AH obtidos, apresentou-se mais intensa no AH obtido do lodo de esgoto.

Em todos os espectros nota-se uma banda em torno de 2924 cm⁻¹, característica da absorção assimétrica dos grupos metileno e metil, indicando a presença de cadeias alifáticas nos AH, revelando o baixo grau de humificação do AH extraído do lodo de esgoto.¹⁰⁷

Nas amostras de AH também foram observadas uma absorção adicional em 2854 cm^{-1} , também atribuída aos C-H alifáticos, mas é característico dos grupos CH_2 .

Observou-se também, na região de 1654cm^{-1} uma banda que pode ser atribuída ao estiramento C=O de cetonas e a presença de íons carboxilatos (deformação axial assimétrica).¹⁰⁷

Nos espectros é observada uma banda na região de 2364 cm^{-1} , banda que pode ser atribuída às vibrações do grupo carboxila (COOH).

Na região de 1700 cm^{-1} , observou-se uma banda referente ao estiramento COO^- assimétrico e/ou estiramento C=C de hidrocarbonetos aromáticos.¹⁰⁹ Segundo Piccolo (1982), a vibração de estiramento assimétrico COO^- ocorre em $1630\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$. Porém, quando ligações são formadas com metais, o número de onda se transfere para $1650\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$, fato observado em todos os espectros, apresentando pico em torno de 1654 cm^{-1} .

A banda próxima de 1530 cm^{-1} é atribuída aos estiramentos C=C dos anéis aromáticos.

A banda em 1408 cm^{-1} refere-se ao estiramento assimétrico C-O e/ou a deformação C-O-H dos COOH e estiramento simétrico dos íons COO^- .

A banda próxima de 1232 cm^{-1} é atribuída para deformação axial C-O dos COOH ¹⁰⁹ e estiramento simétrico C-O.

Em todos os espectros foram observados um sinal de absorção na região de 1036 cm^{-1} , que pode ser atribuído aos C-O de polissacarídeos e impurezas dos silicatos Si-O no AH.

A absorção na região de 500 cm^{-1} é geralmente atribuída à presença de impurezas minerais no AH.¹⁰⁶

No espectro referente ao AH do lodo, observou-se também, o aparecimento de bandas em 1530 e 1036 cm^{-1} referente à presença de amida. A banda referente à amida (1530 cm^{-1}) em AH mais alifáticos foi observada por diversos pesquisadores.^{45,110,111,112} Mikki et al. (1997), Garcia et al. (1992)¹¹³ e Gigliotti et al. (1997), constataram a diminuição das bandas em 1530 e 1036 cm^{-1} referentes à amida II e deformação axial CO de polissacarídeos e concluíram que com o aumento da humificação, ocorria provável perda de moléculas de estruturas simples como carboidratos.

Nos espectros de FTIR, assim como nos espectros de RMN ^{13}C , não foram observadas diferenças significativas na composição de grupos funcionais dos AH provocados pela aplicação das diferentes doses de lodo de esgoto, porém alguns picos se apresentaram pouco mais intensos quando comparado entre amostras diferentes.

5.6 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE LUZ UV-Vis

A fluorescência tem sido reconhecida como uma técnica relativamente simples, sensível e útil para o estudo estrutural e funcional do AH.

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

Os experimentos de fluorescência foram realizados a fim de se obter informações sobre o grau humificação das SH. Basearam-se nas metodologias propostas por Zolnay et al. (1999), Milori et al. (2002) e Kalbitz et al. (2000).

Os espectros de AH obtidos através da fluorescência em solução estão apresentados nas Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15.

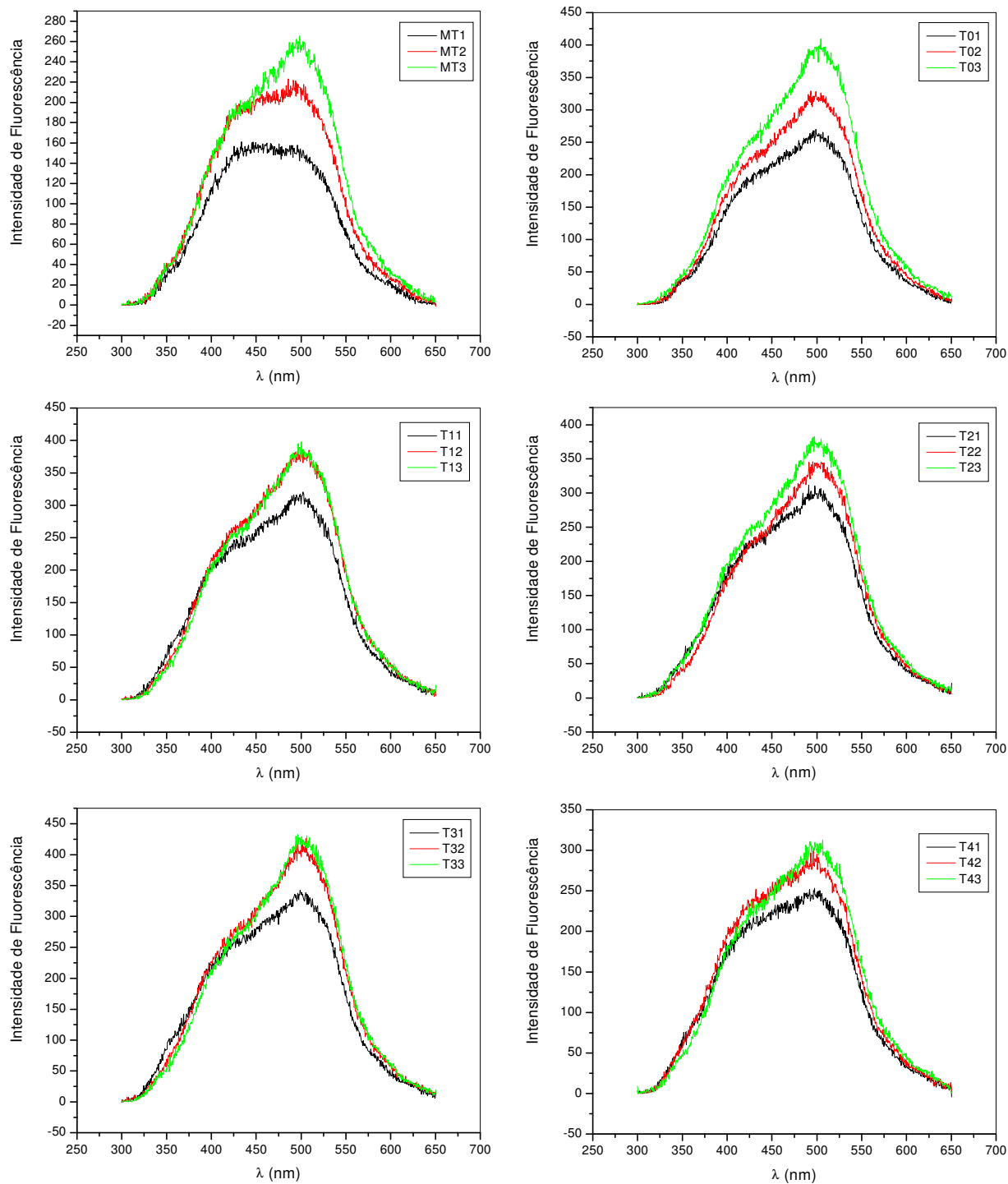


Figura 5.12: Espectro de emissão de fluorescência de AH extraídos do solo, com comprimento de onda de excitação $\lambda_{ex}=240\text{nm}$, e com intervalo de varredura de 300 a 700nm.⁷²

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

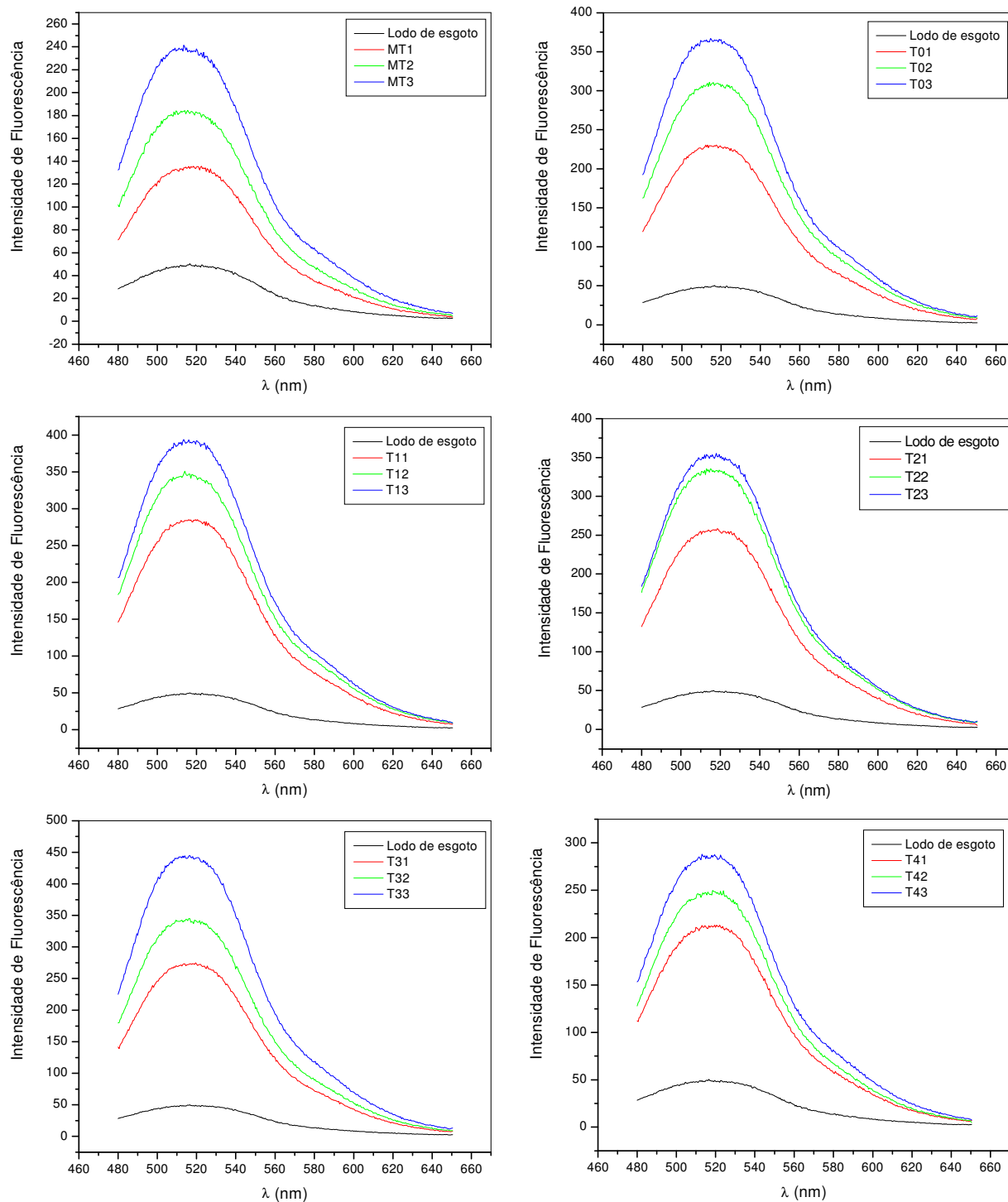


Figura 5.13: Espectro de emissão de fluorescência de AH extraído do solo e lodo de esgoto, com comprimento de onda de excitação $\lambda_{ex}=460\text{nm}$ e com intervalo de varredura entre 480 e 700nm.⁵⁵

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

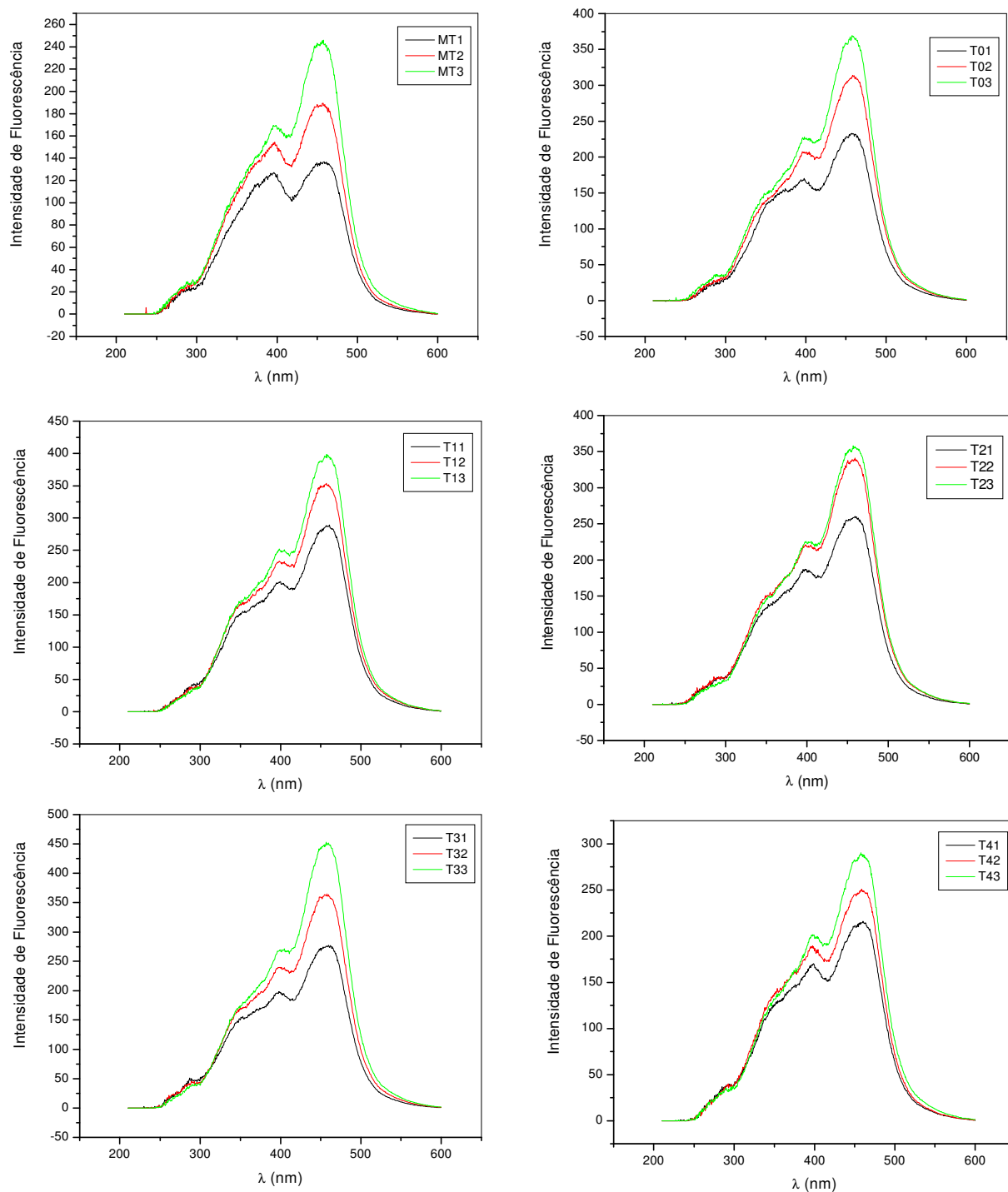


Figura 5.14: Espectro de varredura sincronizada de AH extraído do solo, medidos com diferença de comprimento de onda de emissão e excitação, $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 55\text{nm}$.⁷³

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

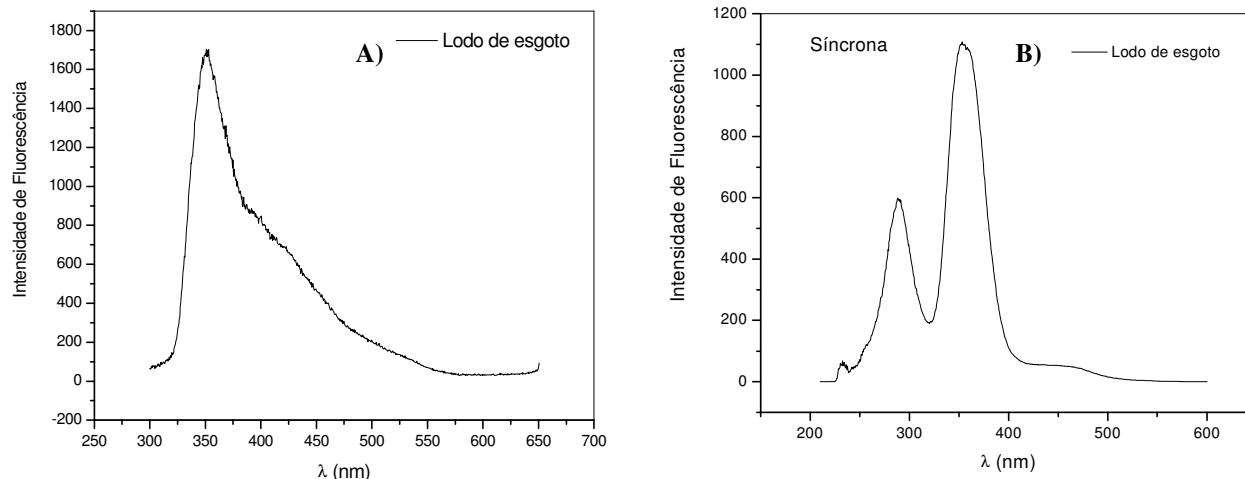


Figura 5.15: Espectros de AH do lodo de esgoto obtido: A) no modo de emissão ($\lambda_{em}=240nm$)⁷² e B) varredura sincronizada ($\Delta\lambda=55nm$)⁷³ respectivamente.

Segundo Senesi et al. (1991) os espectros de fluorescência permitem diferenciar os AH pela sua natureza e origem. Neste caso os espectros para os diferentes tratamentos foram semelhantes, pois tem a mesma origem. Observou-se diferença apenas na intensidade relativa da fluorescência.

Os espectros de emissão com excitação em 240nm mostrados na Figura 5.12 apresentam uma banda larga, resultante da sobreposição de pelo menos duas bandas centradas em 473 e 500nm, enquanto que os de emissão com excitação em 465nm (Figura 5.13) são, aparentemente, uma única banda larga, centrada em 510nm.

Observando os espectros da Figura 5.12, nota-se que o espectro do AH extraído do lodo de esgoto apresenta baixa intensidade, quando comparado ao AH extraído do solo. Porém a primeira camada para todos os tratamentos apresenta baixa intensidade de fluorescência, o que é explicado, no caso dos tratamentos com lodo de esgoto, pelo fato do resíduo ter sido aplicado na superfície e se acumular preferencialmente na superfície do solo.

A fluorescência de AH em comprimentos de onda longos, como neste caso, é associada à sistemas insaturados conjugados (hidrocarbonetos aromáticos condensados tipo tetraceno, de estrutura linear ou perileno, de estrutura cíclica), e/ou a núcleos aromáticos altamente substituídos por grupos C=O e COOH.^{75,77,114,115}

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

Na Figura 5.15 observam-se espectros mais estruturados onde a banda em 458 nm é intensa, a banda em 402 nm também é intensa e bem definida e aparece um ombro em 353 nm.

A análise espectroscópica dos AH através da fluorescência permitiu a obtenção de índices de humificação pelas técnicas de fluorescência, utilizando as metodologias de Milori et al. (2002), Zsolnay et al. (1999) e Kalbitz et al. (2000).

A metodologia de Milori et al. (2002), propõe que a absorção é mais ressonante com estruturas cuja concentração aumenta com o grau de humificação de amostras de AH. A área total sob o espectro de fluorescência resultante da luz de excitação azul, feita nas mesmas condições experimentais (concentração 20 mg L⁻¹, pH 8,0), é proporcional ao grau de humificação. Esta seria uma medida relativa a quantidade de compostos mais condensados e mais aromáticos da amostra.

Denominados de A_{465} o índice de humificação determinado segundo Milori et al. (2002) é igual a integral da região total dos espectros de emissão dos AH com comprimento de onda de excitação $\lambda_{ex}=465\text{nm}$.

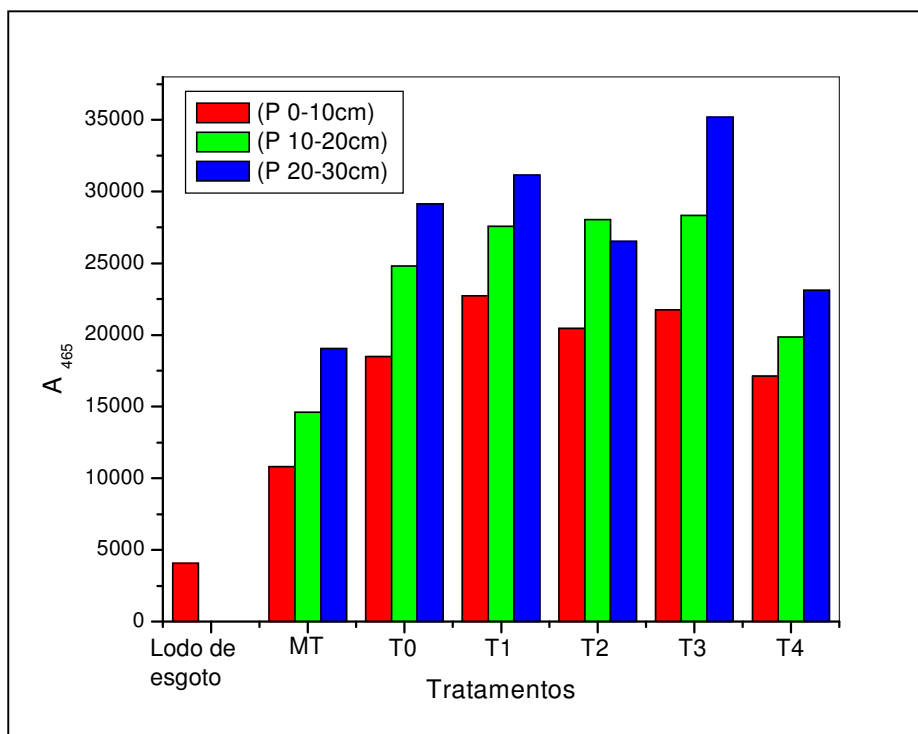


Figura 5.16: Valores do índice de humificação (A_{465}) obtido pela metodologia de Milori et al., 2002 para os AH extraídos do solo e lodo de esgoto. MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha^{-1} de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

Zsolnay et al. (1999), baseados no mesmo fato de que, quando as moléculas fluorescentes passam a ser mais condensadas, seu espectro de emissão se desloca para maiores comprimentos de onda, propuseram um índice de humificação baseado na localização de espectro, onde a área do quarto do espectro localizado em maior comprimento de onda (chamado de A_4) é dividida pela área do quarto do espectro localizado em menor comprimento de onda (chamado de A_1). Este parâmetro depende só das medidas e não precisa ser padronizado.

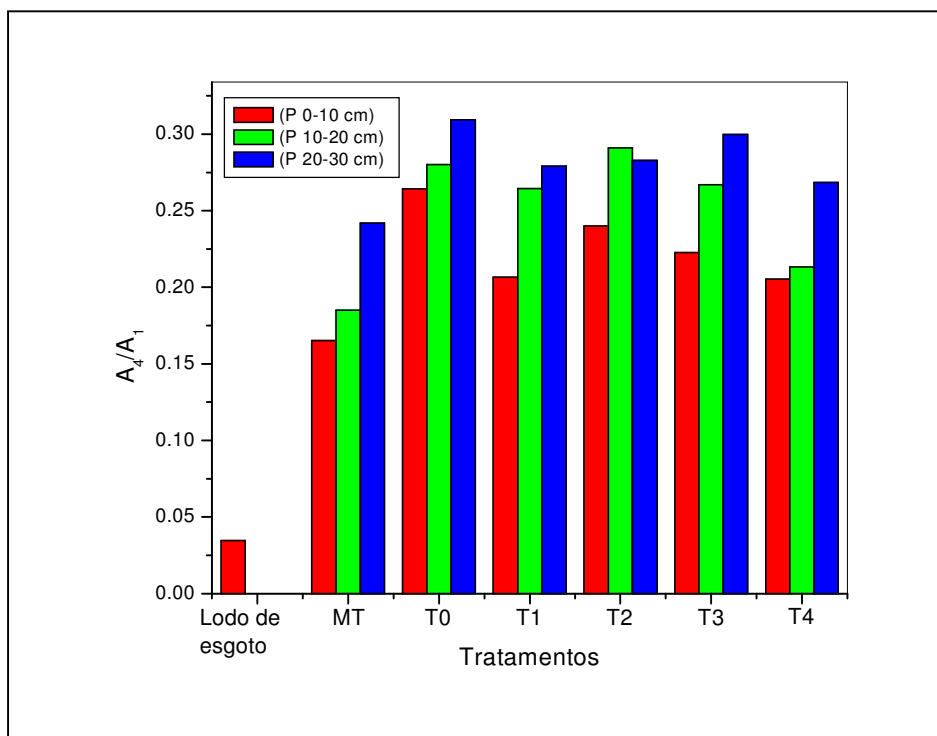


Figura 5.17: Valores do índice de humificação obtido pela metodologia de Zsolnay et al. 1999, para os AH extraídos do solo e lodo de esgoto. MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que quanto maior a área na região de maiores comprimentos de onda, maior é o índice de humificação.

Kalbitz et al. (2000), baseados no fato de que o deslocamento das bandas de fluorescência de menores para maiores comprimentos de onda está associado ao incremento do número de núcleos aromáticos altamente substituídos, propuseram utilizar a razão entre as intensidades relativas de 2 bandas claramente distinguidas, uma em torno de 360 e outra em torno de 465nm, e um ombro em torno de 470nm. Esses perfis mudam dependendo do grau de humificação, e isto pode ser medido pela razão dos picos de fluorescência. Então, a razão de intensidade de fluorescência em 400 e 360 nm pode ser usada para medir o grau de policondensação ou humificação das SH. No presente estudo, foi possível identificar

claramente dois picos médios, um em 459 nm e outro em 398 nm, e com isso usá-los como índice de humificação a razão I_{459}/I_{398} .

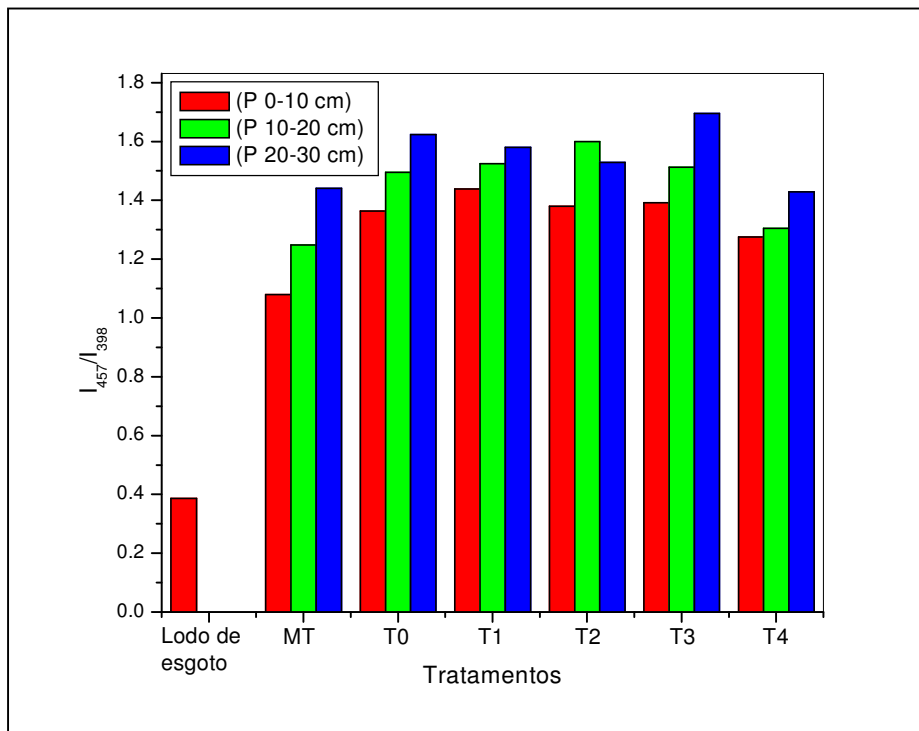


Figura 5.18: Valores do índice de humificação (I_{457}/I_{398}) obtido pela metodologia de Kalbitz et al. (2000) para os AH extraídos do solo e do lodo de esgoto.

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 $Mg\ ha^{-1}$ de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

A partir dos resultados obtidos para o índice de humificação pelas 3 metodologias utilizadas^{55,72,73} foi observada uma diferença no grau de humificação devido à adição de lodo de esgoto, sendo encontrado um baixo valor de humificação para o AH extraído do lodo de esgoto, comprovando, assim, o baixo grau de humificação do resíduo.

Todas as 3 metodologias apontaram que os AH extraídos de solo onde foi aplicada a maior dose de lodo de esgoto eram menos humificados, fato que pode ser explicado pela diluição dos compostos aromáticos mais condensados com a incorporação de outros menos humificados procedentes do resíduo.

As correlações entre as diferentes metodologias utilizadas foram significativas, e estão apresentadas nas Figuras 5.19, 5.20 e 5.21.

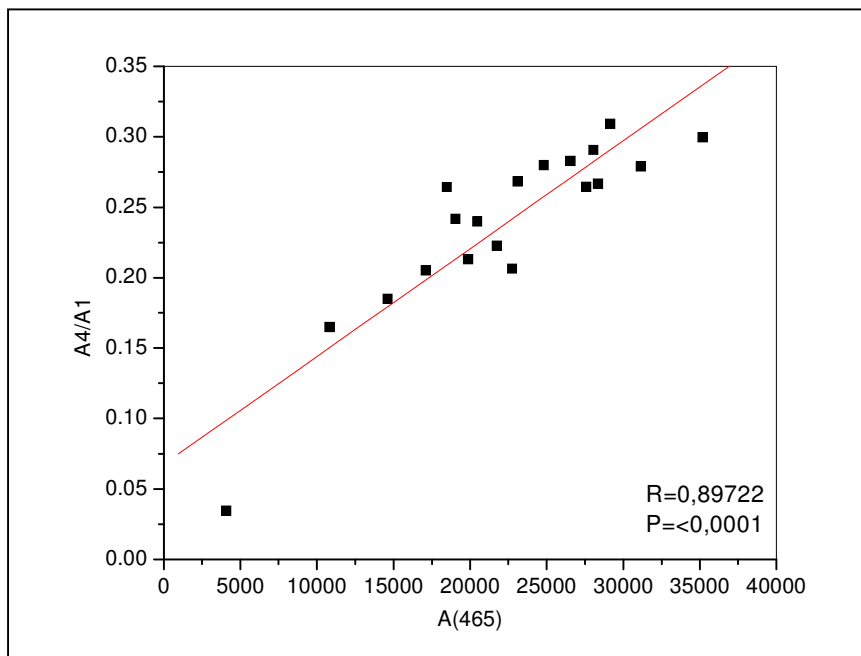


Figura 5.19: Correlação entre as metodologias de Zsolnay et al. (1999) e Milori et al. (2000).

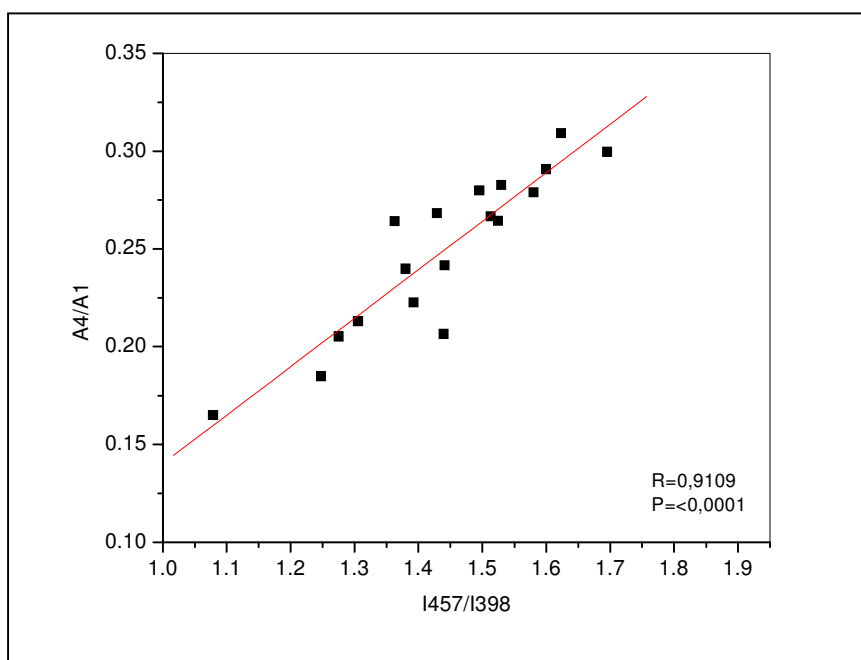


Figura 5.20: Correlação entre as metodologias de Zsolnay et al. (1999) e Kalbitz et al. (2000).

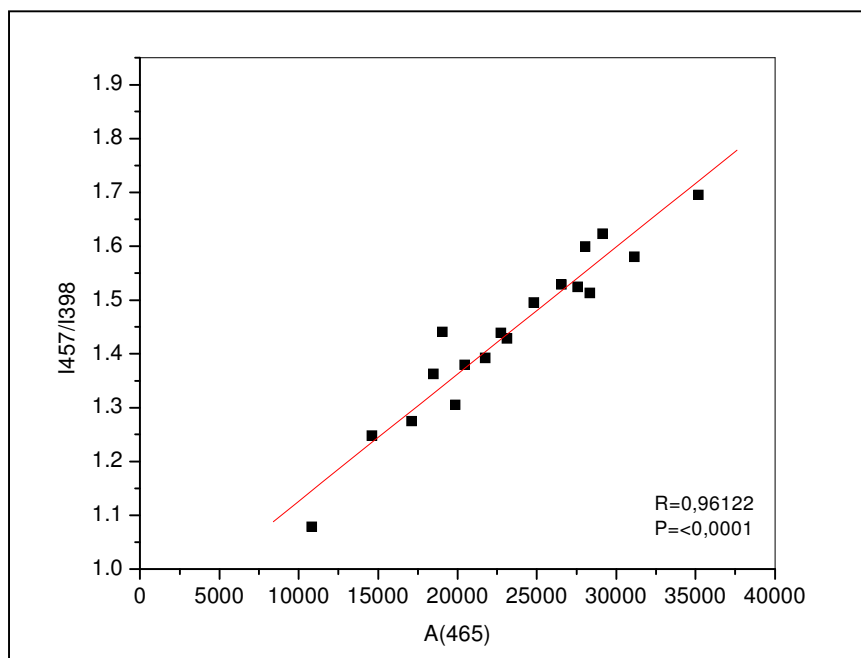


Figura 5.21: Correlação entre as metodologias utilizadas de Kalbitz et al. (2000) e Milori et al. (2000).

5.7 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (TOC)

Os valores obtidos para carbono total (TOC) nas amostras de solo e do lodo de esgoto são mostrados na Tabela 5.5 e Figura 5.22. O resultado final foi obtido a partir de média aritmética de experimentos em duplicata.

Tabela 5.5: Carbono total nas amostras de solo e do lodo de esgoto obtido pelo método de TOC

Tratamentos	Carbono Total (%)		
	(0 - 10 cm)	(10 - 20 cm)	(20 - 30 cm)
Mata	2,04 ± 0,09	1,36 ± 0,02	0,96 ± 0,04
Testemunha	1,10 ± 0,01	1,18 ± 0,07	1,02 ± 0,05
3 Mg ha ⁻¹	1,21 ± 0,04	1,22 ± 0,04	1,00 ± 0,08
6 Mg ha ⁻¹	1,24 ± 0,07	1,23 ± 0,03	1,12 ± 0,04
9 Mg ha ⁻¹	1,79 ± 0,06	1,27 ± 0,06	0,96 ± 0,03
12 Mg ha ⁻¹	1,93 ± 0,09	1,3 ± 0,1	1,18 ± 0,01
Lodo de esgoto	12,2 ± 0,45		

⁽¹⁾ 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ indicam as doses acumuladas de lodo de esgoto aplicadas nos três anos de experimentação.

Mesmo em pouco tempo de experimento foi possível observar que a MO adicionada via lodo de esgoto contribui para o aumento do TOC do solo, que aumentou com a dose de lodo de esgoto aplicada, corroborando com Nascimento et al. (2004) e Leite et al. (2004)¹¹⁶. Os efeitos mais marcantes foram obtidos para as doses mais elevadas de lodo de esgoto (doses acumuladas de 9 e 12 Mg ha⁻¹), quase se aproximando do solo sob mata natural.

Tendo em vista que os efeitos sobre os teores de carbono orgânico podem ser temporários⁷ e em decorrência da decomposição da MOS, a manutenção de altos teores de MO pela adição de lodo de esgoto, dependerá de aplicações sucessivas de resíduo.¹¹⁷

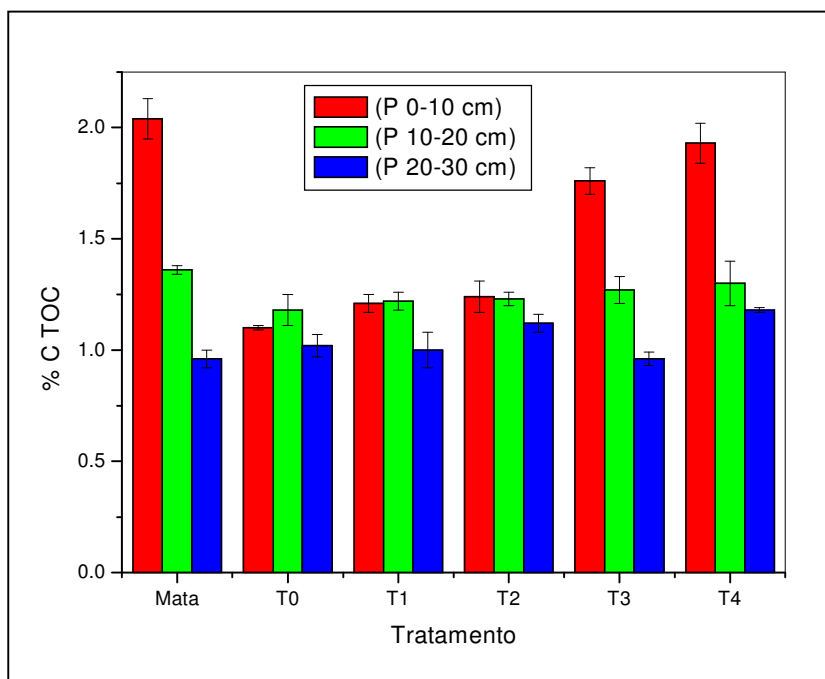


Figura 5.22: Carbono total em amostras de solo e do lodo de esgoto determinadas pelo método de TOC.

MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca (dose acumulada em 3 anos).

5.8 FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

O grau de humificação da MOS pode ser medido através da espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL).⁸⁰

Os experimentos de FIL foram realizados a fim de se obter informações sobre o grau de humificação das amostras de solo.

O grau de humificação da MO (H_{FIL}) foi obtido através 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), ou seja $H_{FIL} = (ACF/COT)$.^{55, 80} A razão entre ACF e COT visa normalizar a concentração de fluoróforos pela concentração de C orgânico na amostra. A excitação no azul é mais ressonante com estruturas humificadas conforme observado por Milori et al. (2002), e por isso foi utilizada neste estudo com FIL.

O grau de humificação obtido através da FIL está representado na figura 5.23.

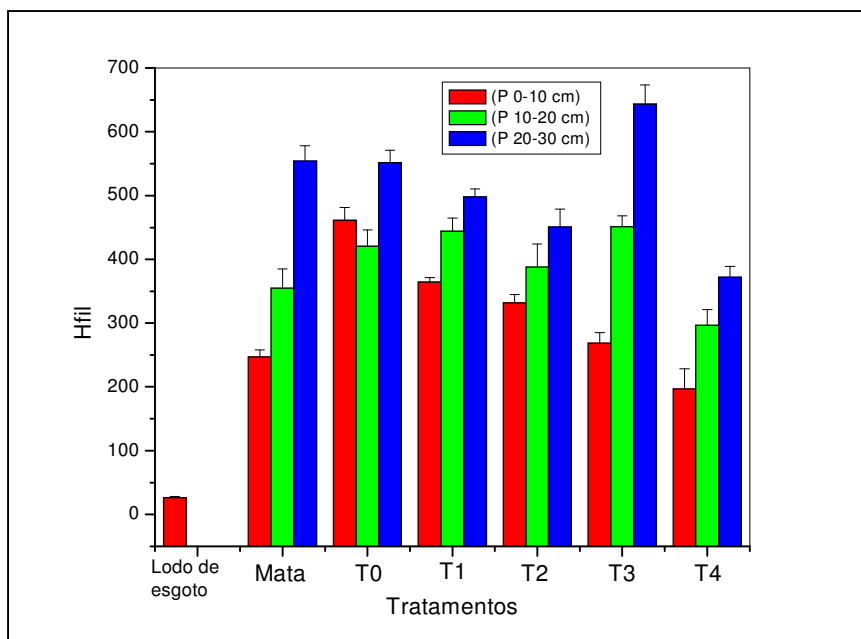


Figura 5.23: Valores de H_{FIL} obtido para as amostras de solo. MT-solo de mata; T0-tratamento testemunha, sem adição de lodo de esgoto; T1, T2, T3 e T4 – aplicação de 3, 6, 9 e 12 $Mg\ ha^{-1}$ de lodo de esgoto, base seca (dose

acumulada em 3 anos). 1, 2 e 3 referem-se às profundidades, 0-10, 10-20 e 20-30 cm.

O alto valor de H_{FIL} observado na figura indica a presença de estrutura molecular rica em fluoróforos.

Através das Figura 5.23 foi possível observar que o grau de humificação da MO diminui gradualmente com o incremento da dose de lodo de esgoto, sendo que o grau de humificação observado no T4 (18 Mg ha⁻¹ lodo de esgoto) foi menor inclusive do que o observado no solo de mata. Essa diminuição no grau de humificação pode ser atribuída à incorporação de compostos alifáticos menos humificados procedentes do lodo de esgoto.⁵⁶ Na mata, o baixo grau de humificação pode ser atribuído à elevada adição de resíduos vegetais pela vegetação nativa.¹¹⁸

De maneira geral, em cada tratamento observou-se um incremento do grau de humificação em profundidade, o que é explicado pelo fato do resíduo vegetal ou do lodo de esgoto acumular-se na superfície do solo,¹¹⁸ porém a diminuição do grau de humificação também foi observada na segunda e terceira profundidades e não somente na superfície onde foi aplicado o lodo de esgoto.

A mata apresenta maior humificação com o aumento da profundidade, já nos tratamentos T0, T1, T2, T3 e T4 o aumento da humificação não é tão acentuado como o observado para a mata nas profundidades 0-10cm e 10-20cm, porém na profundidade 20-30cm, ocorre um aumento significativo na humificação, pois o solo permanece em repouso e mantém estruturas mais humificadas.

Comparando os resultados acerca da labilidade da MO entre solo temperado e tropical, Shang et al. (1997)¹¹⁹ observaram que a MO de solos de clima tropical é menos estável que a MO de solos de clima temperado, sofrendo decomposição mais rapidamente. Sendo assim, a aplicação de lodo de esgoto ao solo deve ter sofrido um rápido processo de decomposição da MO, tendo como consequência o rápido

aumento da humificação. Em solos de clima temperado, este processo é bem mais lento, exigindo maior tempo para que ocorra humificação e alterações significativas sejam observadas.

Nas correlações entre fluorescência em solução e FIL, os índices de humificação refletem de maneira satisfatória as características da MO, já que as medidas são realizadas com solo. Os valores dos coeficientes de correlação obtidos foram significativos.

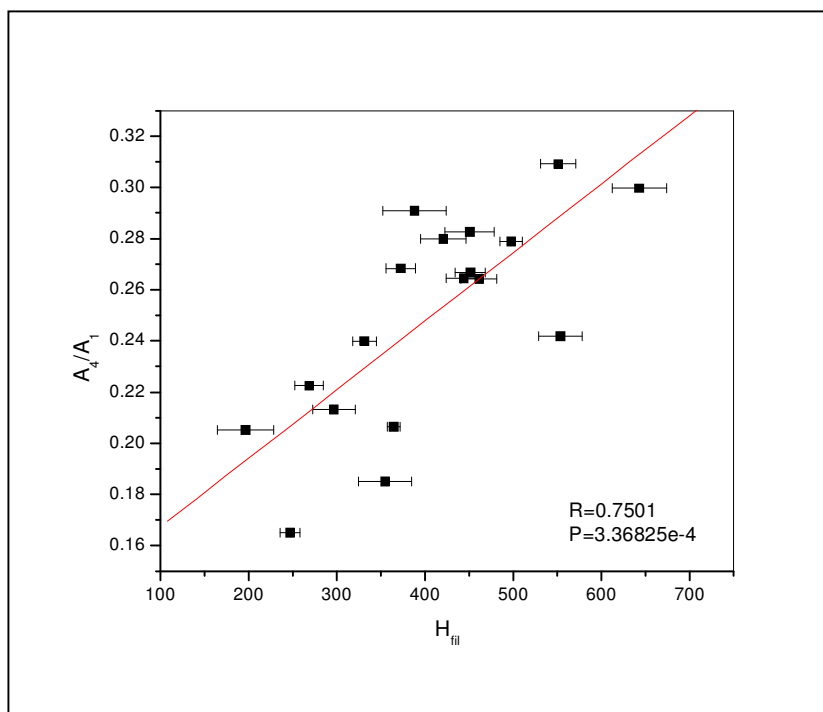


Figura 5.24: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1).

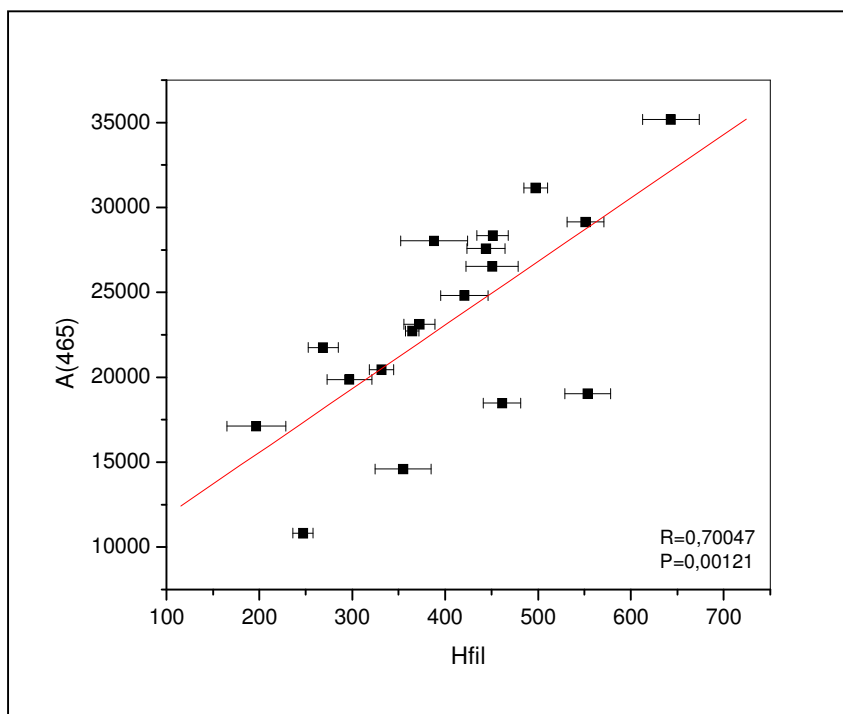


Figura 5.25: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Milori et al. (2002) (A_{465}).

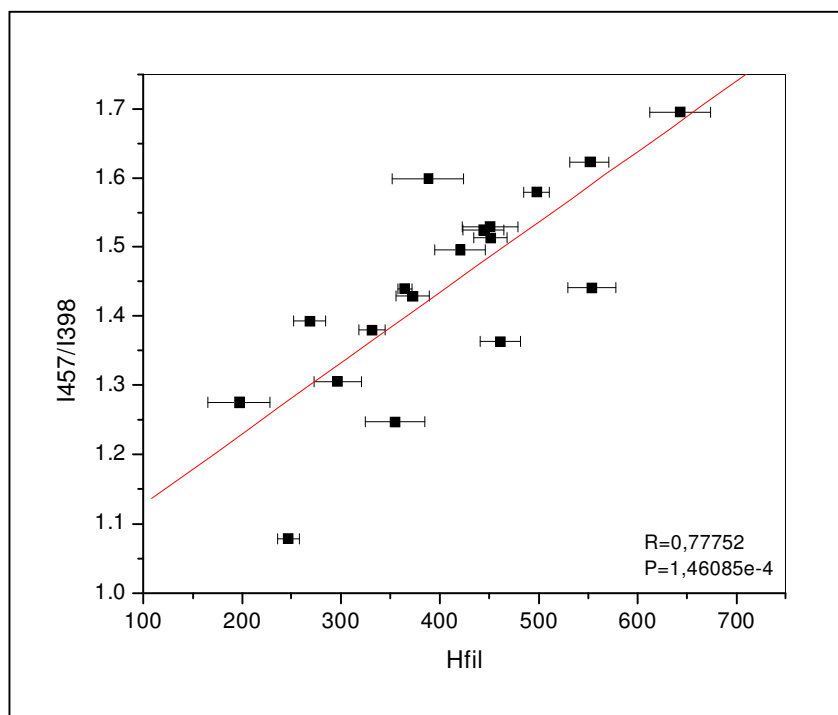


Figura 5.26: Correlação entre o grau de humificação determinado por FIL (H_{FIL}) e a metodologia de Kalbitz et al. (2000) (I_{457}/I_{398}).

Estes resultados demonstram a necessidade de estudos específicos acerca das possíveis alterações no solo após a adição de lodo de esgoto, uma vez que em determinadas condições e tipos de solos, as alterações podem vir a ser bastante diferenciadas, especialmente em regiões tropicais.

Nos resultados de fluorescência e FIL, observa-se que o tratamento T3 não segue a mesma tendência dos outros tratamentos, isso provavelmente se deve a um problema de amostragem.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

Através dos resultados de análise elementar foi possível notar que não houve alterações nas estruturas dos AH após a adição de lodo de esgoto, sendo também comprovado através dos espectros de FTIR onde foram observadas mínimas variações em seus grupos funcionais e ^{13}C RMN de onde foi possível obter as porcentagens de aromáticos e alifáticos.

A razão atômica C/N foi menor para o AH proveniente do lodo de esgoto, sendo que para o AH extraído do solo, os valores mantiveram-se praticamente inalterados, independente da adição do lodo de esgoto e das doses aplicadas.

Os espectros de FTIR obtidos são típicos para AH. Neles as principais bandas estão associadas à grupos hidroxila, carboxila, carbonila e amina. Os espectros não mostraram diferenças significativas para os diferentes sistemas de manejo.

A adição de lodo de esgoto em solos sob cultivo agrícola incorporou uma MO com baixo grau de humificação que a curto prazo não altera a fração húmica (AH).

O AH do lodo de esgoto possui um caráter bastante alifático e em sua estrutura uma considerável quantidade de radicais livres do tipo semiquinona. Ao ser adicionado ao solo, observa-se que modifica a concentração do número de radicais livres do tipo semiquinona sem alterar os grupos funcionais do AH do solo. Portanto, no sistema estudado, a adição de lodo de esgoto mostra que o número de radicais livres do tipo semiquinona presentes no solo não é proporcional ao grau de humificação da MOS, sendo que os resultados obtidos pela técnica de RPE não apresentaram coerência com os resultados já existentes na literatura.^{46,47,48}

Os resultados demonstraram que a espectroscopia de fluorescência tanto em solução como a Induzida por Laser forneceu dados coerentes à cerca do grau de humificação da MO.

A fluorescência forneceu resultados à cerca do grau de humificação das amostras de AH extraídos de solo e do lodo de esgoto. As 3 metodologias apresentaram boa correlação ente si.

O H_{Fil} obtido por Fluorescência Induzida por Laser se mostrou eficiente, pois é adequada para avaliação de solos, o que poderia servir como alternativa aos procedimentos de extração e fracionamento químico de SH nos estudos de MO em sua forma natural.

Foi possível observar uma diminuição no grau de humificação no solos submetidos à adição de lodo de esgoto, aproximando-se do solo de mata utilizado como referência.

A MO adicionada através do lodo de esgoto está sendo incorporada ao solo, e isso pode ser comprovado através dos resultados de TOC. A concentração de carbono no solo aumenta, mesmo depois de ter interrompido a aplicação há 2 anos, e o grau de humificação da MO diminui, sendo menor ainda do que o solo de mata utilizado com referência. Entretanto, este tipo de manejo utilizando lodo de esgoto é considerado apropriado do ponto de vista ambiental e agrônômico. No entanto, a manutenção de altos teores de MO pela adição de lodo de esgoto dependerá de aplicações sucessivas do resíduo,¹¹⁷ visto que os efeitos sobre os teores de MO podem ser temporários,⁷ em decorrência da decomposição da MO.

Os resultados obtidos a partir das técnicas químicas e espectroscópicas mostraram que o benefício proporcionado pela adição de lodo de esgoto ao solo, mesmo em um experimento de curta duração, pode ser significativo. Adição de

resíduo com alto teor de carbono apresenta-se como fonte importante de nutrientes e MO, melhorando propriedades químicas. Com isso, podemos confirmar que a importância da adição de lodo de esgoto ao solo não é apenas de caráter ambiental.

O retorno ao ambiente deste resíduo deve ser priorizado, pois transforma um resíduo urbano de disposição problemática, em um insumo de grande valor para a agricultura, pois o lodo fornece ao solo MO, macro e micronutrientes para as plantas, atuando como condicionador de solo e fertilizante, e dessa forma contribui para uma agricultura sustentável.²

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ MELO, W.J.; MELO, G.M.P.; BERTIPAGLIA, L.M.A.; MELO, V.P. Reciclagem de resíduos orgânicos: oportunidade comercial com conservação ambiental. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2., 1997, São Carlos - SP. **Anais...** São Carlos: Sociedade Brasileira de Substâncias Húmicas/ Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. p. 106-111.
- ² BETTIOL, W. Lodo de esgoto transforma em excelente adubo para a agricultura, 2004. Disponível em: < www.cnpma.embrapa.br>. Acesso em: 03 set. 2004.
- ³ INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – Brasil 2002. Dimensão Ambiental – Saneamento. Tratamento de Esgoto. Rio de Janeiro: IBGE, 2002. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2005.
- ⁴ TSUTYA, M.T. Alternativas de disposição final de lodo de esgotos gerados em estações de tratamento de esgoto. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, A., (Eds.). **Impacto Ambiental do Uso Agrícola do Lodo de Esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p. 259.
- ⁵ CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Regulamentação do uso agrícola de lodo de esgoto. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/cb5f6214/propreslodolimpa21ctaj1.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2005
- ⁶ MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; MELO, V.P. O uso agrícola e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; ALEM SOBRINHO, P.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. de C.T. de; MELFI, A.J.; MELO, W.J de; MARQUES, M.O. (Ed.). **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 2001. p.289-363.
- ⁷ MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R.A.; LEITE, S.A.S. Efeito de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações da matéria orgânica e CTC de um latossolo cultivado com cana de açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 449-455, 1994.
- ⁸ STEVENSON, F.J. **Humics Chemistry: gênese, composition, reactions**. New York: John Wiley, 1994. p.153-158.
- ⁹ ALBIACH, R.; CANET, R.; POMARES, F.; INGELMO, F. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 109-114, 2001.
- ¹⁰ BORGES, M.R.; COUTINHO, E.L.M. Metais pesados do solo após aplicação de lodo de esgoto: I – Fracionamento. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 557-568, 2004.

-
- ¹¹ SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E.; BERTON, R.S.; ZOTELLI, H.B.; PEXE, C.A.; MENDONÇA, E. Cana de açúcar cultivada em solo adubado com lodo de esgoto – Nutrientes, metais pesados e produtividade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 1, p.1-8, 1998.
- ¹² BARRETO, M.C.V. **Degradação da fração orgânica de diferentes resíduos e efeitos em algumas propriedades químicas e físicas de dois solos**. 1995. 106 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.
- ¹³ SIMONETE, M.A.; KIEHL, J.C.; ANDRADE, C.A.; TEIXEIRA, C.F.A. Efeito do Lodo de Esgoto em um Argissolo e no Crescimento e Nutrição do Milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1187, 2003.
- ¹⁴ PAGE, A.L.; CHANG, A.C. Overview of the past 25 years: Technical perspective. In: CLAPP, C.E.; LARSON, W.E.; DOWDY, R.H., (Eds.). **Sewage sludge: Land utilization and the environment**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. 258p.
- ¹⁵ ZUFIAURRE, R.; OLIVAR, A.; CHAMORRO, P.; NERIN, C.; CALLIZO, A. Speciation of metals in sewage sludge for agricultural uses. **Analyst**, v. 123, p. 255-259, 1998.
- ¹⁶ BARBOSA, R.M. **Absorção e translocação de cromo em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), rabanete (*Raphanus sativus*) e rúcula (*Eruca sativa*) cultivados em vermicomposto de resíduos de curtume**. 1996. 179 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.
- ¹⁷ MIIKKI, V.; SENESI, N.; HANNIKEN, K. Characterization of humic material formed by composting of domestic and industrial biowastes. Part 2: Spectroscopic evaluation of humic acid structures. **Chemosphere**, v. 34, n. 8, p. 1639-1651, 1997.
- ¹⁸ ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGNBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p. 117-161, 1997.
- ¹⁹ BALESSENT, J.; CHENU, C.; BALABANE, M. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. **Soil and Tillage Research**, v. 53, p. 215-230, 2000.
- ²⁰ GLATZELA, S.; KALBITZ, K.; DALVAC, M.; MOOREC, T. Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs. **Geoderma**, v. 113, p. 397– 411, 2003.

-
- ²¹ BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C.A. Effect of no-till 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**, v. 53, p. 95-109, 2000.
- ²² MELO, W.J.; MARQUES, M.O. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Eds.). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p. 109-141.
- ²³ KIEHL, E.J. **Fertilizantes Orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1985. 492p.
- ²⁴ SCHNITZER, M. Organic matter characterization. In: **METHODS of soil analysis: Chemical and microbiological properties**. Madison: ASA-SSSA, 1982. p. 582-594 (Agronomy monograph, 9).
- ²⁵ BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.
- ²⁶ SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978. 319 p.
- ²⁷ HUMMEL, J.W.; GAULTNEY, L.D.; SUDDTH, K.A. Soil property sensing for site-specific crop management. **Computer and Electronics in Agriculture**, v. 14, p. 121-136, 1996.
- ²⁸ KULLBERG, A., BISHOP, K.H.; HARGEBY, A.; JANSSON, M.; PETERSEN, R.C. The ecological significance of dissolved organic carbon in acidified water. **Ambio**, v. 22, n. 5, p. 331-337, 1993.
- ²⁹ THURMAN, E.M. **Organic geochemistry of natural waters**. Dordrecht: Martin Nijhoff, 1985. 497 p.
- ³⁰ RAUEN, T.G.; DEBACHER, N.A.; SIERRA, M.M.; SIERRA, E.J.S. Tensoatividade da ácidos húmicos de procedências distintas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 909, 2002.
- ³¹ SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 277p.
- ³² REZENDE, M.O.O. **A importância ambiental das substâncias húmicas**. São Carlos, 1999. 147 f. Tese (Livre Docência). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.
- ³³ WERSHAW, R.L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. **Journal Contaminant Hydrolyse**, v. 1, p. 29-45, 1986.

-
- ³⁴ WERSHAW, R.L. Model for humus. **Environmental Science Technology**, v. 27, p. 414-816, 1993.
- ³⁵ CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformation arrangement of dissolved humic substances: influence of solution composition on association of humic molecules. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 1682-1690, 1999.
- ³⁶ PICCOLO, A. The supramolecular structure of humics substances. **Soil Science**, v. 166, p. 810-832, 2001.
- ³⁷ PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, v. 75, p. 57-134, 2002.
- ³⁸ SIMPSON, A.J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, p. S72-S80, 2002.
- ³⁹ SIMPSON, A.J.; KINGERY, W.L.; SWAW, D.R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 84-88, 2002.
- ⁴⁰ ANDREAUX, F.G.; CERRI, C.C.; EDUARDO, B.P.; CHONÉ, T. Humus contents and transformation in native and cultivated soils. **Science of the Total Environment**, v. 90, p. 249-265, 1990.
- ⁴¹ SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acid and soil organic matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, p. 487-498, 1995.
- ⁴² PRESTON, C.M. Applications of NMR to Soil Organic Matter Analysis: History and Prospects. **Soil Science**, v. 161, p. 44-465, 1996.
- ⁴³ SARGENTINI-JUNIOR, E.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F.; SANTOS, A. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 339, 2001.
- ⁴⁴ 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.
- ⁴⁵ SENESI, N.; SPOSITO, G.; HOLTZCLAW, K.M.; BRADFORD, G.R. Chemical properties of metal-humic acid fractions of a sewage sludge amended aridisol. **Journal of Environmental Quality**, v.18, n. 2, p. 186-194, 1989.
- ⁴⁶ MARQUES, J.C. **Caracterização química e espectroscópica de substâncias húmicas de solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. 1998. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

-
- ⁴⁷ GONZÁLEZ-PÉREZ, M. **Estudos espectroscópicos da dinâmica da matéria orgânica e complexação com íons metálicos em solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. 2003. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- ⁴⁸ SANTOS, L.M. **Dinâmica da matéria orgânica e destino de metais pesados em dois solos submetidos à adição de lodo de esgoto**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- ⁴⁹ SENESI, N.; MIANO, T.M.; BRUNETTI, G. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In: PICCOLO A. (Ed.). **Humic Substances in Terrestrial Ecosystems**. Amsterdam: Elsevier. 1996. p. 531–593.
- ⁵⁰ KIEHL, E. Matéria orgânica. In: MANUAL de Edafologia. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1979. p. 231-240.
- ⁵¹ FERNANDES, F. Estabilização e Higienização de Biossólidos. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. cap. 3, p. 45-67.
- ⁵² MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J.; POPPO, N.R. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from brazilian soil. **Soil Science**, v. 151, p. 396-376, 1991.
- ⁵³ MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A.E.; TRAGHETA, D. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol. **Soil Science**, v. 157, p. 365-372, 1994.
- ⁵⁴ BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C.A. Fracionamento da matéria orgânica e sua avaliação qualitativa por EPR num solo submetido dez anos a diferentes sistemas de cultura em plantio direto. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, 1., 1996, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. p. 115-121.
- ⁵⁵ MILORI, D.M.B.P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V.S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 167, n. 11, p. 739-749, 2002.
- ⁵⁶ GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S.C.; NOVOTNY, E.H.; MILORI, D.M.B.P.; BAGNATO, V.S.; COLNAGO, L.A.; MELO, W.J.; KNICKER, H. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, v. 118, p. 181-190, 2004.

-
- ⁵⁷ MANGRICH, A.S. Estruturas químicas de: estratégias de pesquisa. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 4., 2001, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Substâncias Húmicas/ Universidade Federal de Viçosa, 2001. p. 15-17.
- ⁵⁸ PICCOLO, A.; ZACCHEO, P.; GENEVINI, P.G. Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. **Bioresource Technology**, v. 40, p. 272-282, 1992.
- ⁵⁹ MARTIN-NETO, L.; ROSSEL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperature grassland climosequence. **Geoderma**, v. 81, p. 305-311, 1998.
- ⁶⁰ SENESI, N.; SCHNITZER, M. Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acid. **Soil Science**, v. 123, p. 224-234, 1977.
- ⁶¹ RIFFALDI, R.; SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. **Soil Science Society American**, v. 36, p. 301-305, 1972.
- ⁶² CARVALHO, E.R.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 53, p. 421, 2004.
- ⁶³ SKJEMSTAD, J.O.; JANIK, L.J.; TAYLOR, J.A. Non-Living soil organic matter: what do we know about it?. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, p. 667-680, 1998.
- ⁶⁴ SKOOG, D.A. HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
- ⁶⁵ SILVERTEIN, R. M.; BONLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387p.
- ⁶⁶ STUART, B. **Modern Infrared Spectroscopy**: analytical chemistry by open learning. New York: John Wiley, 1996. 179 p.
- ⁶⁷ SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. **Humic substances in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1972. 315p.
- ⁶⁸ VINKLER, P.; LAKATO, B.; MEISEL, J. Infrared spectroscopic investigations of humic substances and their metal complexes. **Geoderma**, v. 15, p. 231-242, 1976.
- ⁶⁹ HERNANDEZ, T.; MORENO, J.I.; COSTA, F. Infrared spectroscopic characterization of sewage sludge humic acids. Evidence of sludge organic matter-metal interactions. **Agrochimica**, v. 37, n. 1, p. 12-17, 1993.

- ⁷⁰ COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C.I.; NASCIMENTO, O.R.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H.; VIEIRA, E.M.; SEIDEL, P.R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S.J. Aplicações de ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). In: CRESTANA, S.; CRUVINEL, P.E.; MASCARENHAS, S.; BISCEGLI, C.I.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A. (Eds.). **Instrumentação Agropecuária: contribuições no limiar do novo século**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. Cap. 1, p. 15-50.
- ⁷¹ SENESI, N.; MIANO, T.M.; PROVEZANO, M.R.; BRUNETTI, G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, v. 152, p. 259-271, 1991.
- ⁷² ZSOLNAY, A.; BAIGAR, E.; JIMENEZ, M.; STEINWEG, B.; SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**, v. 38, n. 1, p. 45-50, 1999.
- ⁷³ KALBITZ, K.; GEYER, W.; GEYER, S. A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances. **Chemosphere**, v. 40, p. 1305-1312, 2000.
- ⁷⁴ SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of chemistry of fulvic acids and its interactions with metals ions and organic chemicals. Part I. the electrons spin resonance approach. **Analytica Chimica Acta**. v. 232, p. 51-75, 1990.
- ⁷⁵ SENESI, N. Application of electron spin resonance and fluorescence spectroscopies to the study of soil humic substances. In: **HUMUS, its structure and role in agriculture and environmet**. Amsterdam: Elsevier Science, 1992. p. 11-26.
- ⁷⁶ SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of chemistry of fulvic acids and its interactions with metals ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. **Analytica Chimica Acta**. v. 232, p. 77-106, 1990.
- ⁷⁷ RIVERO, C.; SENESI, N.; PAOLINI, J.; DÓRAZIO, V. Characteristics of humic acids of some Venezuelan soils. **Geoderma**, v.81, p. 227-239, 1998.
- ⁷⁸ FELLER, C.; BEARE, M. H. Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p. 69-116, 1997.
- ⁷⁹ MILORI, D.M.B.P; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C. Nova metodologia utilizando fluorescência induzida por laser para análise de solos inteiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto - SP. **Anais...** Jaboticabal: UNESP. 2003. 1 CR-ROM.
- ⁸⁰ MILORI, D.M.P.B.; GALETI, H.V.A.; MARTIN-NETO, L.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; SALTON, J. "Humification degree of organic matter in whole soil determined by laser-induced fluorescence". In: **Humic Substances and Soil and Water Environment**. São Carlos: Rima, 2004. p. 609.

- ⁸¹ MILORI, D.M.B.P.; GALETI, H.V.A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. "Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy" **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, p. 57-63, 2006.
- ⁸² MACHADO, P.L.O.A. **Método para a extração de substâncias húmicas do solo: Ácido Húmico e Ácido Fúvico**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 4p. (Comunicado Técnico, 1). 1 Folder.
- ⁸³ SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A.; ROIG, A.; CEGARRA, J.; BERNAL, M.P.; PAREDES, C. Effects of HCl-HF purification treatment on the chemical composition and structure of humic acids. **European Journal of Soil Science**, v. 53, p. 375-381, 2002.
- ⁸⁴ MCPHIE, P. Dialysis. **Methods in Enzymology**, v. 22, p.23-32, 1971.
- ⁸⁵ MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; COLNAGO, L.A.; SAAB, S.C.E.; CONCEIÇÃO, M. Estudos Espectroscópicos de Substâncias Húmicas e Matéria Orgânica em Amostras de Solos Intactas, Fracionadas Fisicamente e Quimicamente. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2., 1997, São Carlos-SP. **Anais...** São Carlos: Sociedade Brasileira de Substâncias Húmicas/ Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. p. 79-86,
- ⁸⁶ SEGNINI, A.; SILVA, W.T.L.; SANTOS, L.M.; MILORI, D.M.B.P.; MARTIN-NETO, L. Determinação de carbono e matéria orgânica em Latossolos por diferentes métodos. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 6., 2005, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Substâncias Húmicas/ Embrapa Solos, 2005. p.168-170.
- ⁸⁷ CHIEN, Y.Y.; KIM, E.G.; BLEAM, W.F. Paramagnetic relaxation of atrazine solubilized by micellar solutions. **Environmental Science Technology**, v. 31, p. 3204-3208, 1997.
- ⁸⁸ POOLE, C.P.; FARACH, H.A. **The Theory of Magnetic Resonance**. New York: John Wiley, 1972. 452p.
- ⁸⁹ SINGER, L.S. Synthetic ruby as a secondary standard for the measurement of intensities in electron paramagnetic resonance. **Journal Applied Physiology**, v. 30, p. 1463-1464, 1959.
- ⁹⁰ 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.
- ⁹¹ KNICKER, H. Biogenic nitrogen in soils as revealed by solid-state carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, n. 3, p. 715-723, 2000.

- ⁹² CANELLAS, L.P.; RUMJANEK, V.M.; SANTOS, G.A. Análise quantitativa dos grupamentos funcionais de ácidos húmicos por RMN de ¹³C em estado sólido e líquido. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Sociedade Brasileira de Substâncias Húmicas/ Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. p. 165.
- ⁹³ WILSON, M.A. Soil organic matter maps by nuclear magnetic resonance. **Journal of Soil Science**, v. 35, p. 209-215, 1984.
- ⁹⁴ SCHNITZER, M.; PRESTON, C.M.; Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Soil Science Society of America Journal**, v. 50, p. 326-331, 1986.
- ⁹⁵ PRESTON, C.M.; HEMPLING, R.; SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M.; TROFYMOV, J.A.; AXELSON, D.E. Characterization of organic matter in a forest soil of coastal British Columbia by NMR and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. **Plant and soil**, v. 158, p. 69-82, 1994.
- ⁹⁶ PRESTON, C.M.; NEWMAN, R.H.; ROTHER, P. Using ¹³C CP MAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. **Soil Science**, v. 157, p. 26-35, 1994.
- ⁹⁷ KÖGEL-KANBER, I. ¹³C AND ¹⁵N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. **Geoderma**, v. 80, p. 243-270, 1997.
- ⁹⁸ SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, v. 162, p. 115-130, 1997.
- ⁹⁹ VEEMAN, W.S. Nuclear magnetic resonance: a simple introduction to the principles and applications. **Geoderma**, v. 80, p. 225-242, 1997.
- ¹⁰⁰ KNICKER, H.; TOTSCHKE, K.U.; ALMENDROS, G.; GONZÁLEZ-VILA, F.J. Condensation degree of burnt peat and plant residues and the reliability of solid-state VACP MAS ¹³C NMR spectra obtained from pyrogenic humic material. **Organic Geochemistry**, v. 36, p. 1359-1377, 2005.
- ¹⁰¹ KONONOVA, M.M. **Soil organic matter**. Oxford: Pergamon Press, 1966. p. 400-404.
- ¹⁰² HEVIA, G.G.; BUSCHIAZZO, D.E.; HEPPEL, E.N.; URIOSTE, A.M.; ANTÓN, E.L. Organic matter in size fractions of soils of the semiarid Argentina. Effects of climate, soil texture and management. **Geoderma**, v. 116, n. 3-4, p. 265-277, 2003.
- ¹⁰³ COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; MIYAZAWA, M.; VIEIRA, E.M.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H. Estudo da razão E₄/E₆ e aromaticidade por RMN ¹³C em estados sólidos de ácido húmico de um latossolo roxo. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Sociedade Brasileira de Substâncias Húmicas/ Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. p. 167.

-
- ¹⁰⁴ NAKANISHI, K. **Infrared absorption spectroscopy**. Tokyo: Nankondo, 1962. 233p.
- ¹⁰⁵ PICCOLO, A.; STEVENSON, F. J. Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Ca^{2+} complexes of soil humic substances. **Geoderma**, v. 27, p. 195-208, 1982.
- ¹⁰⁶ BLOOM, P.R.; LEENHER, J.A. II. **In search of structure**. New York: John Wiley, 1989. p. 410-446.
- ¹⁰⁷ CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A.; RUMJANEK, V.M.; MORAES, A.A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1529-1538, 2001.
- ¹⁰⁸ POLAK, J.; SULKOWSKI, W.W.; BARTOSZEK, M.; PAPIEZ, W. Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic acid extracted from sewage sludge. **Journal of Molecular Structure**, v. 744-747, p. 983-989, 2005
- ¹⁰⁹ BAES, A.U.; BLOOM, P.R. Diffuse reflectance and transmission Fourier infrared spectroscopy of humic and fulvic acids. **Soil Science Society of America Journal**, v. 53, p. 695-700, 1989.
- ¹¹⁰ DEIANA, S.; GESSA, C.; MANUNZA, B.; RAUSA, R.; SEEBER, R. Analytical and spectroscopic characterization of humic acids extracted from sewage sludge, manure and warm compost. **Soil Science**, v. 150, p. 419-424, 1990.
- ¹¹¹ CELI, L.; SCHNITZER, M.; NEGRÉ, M. Analysis of carboxyl groups in soil humics acids by wet chemical method, Fourier transform infrared spectrophotometry, and solution-state carbon-13 nuclear magnetic resonance: a comparative study. **Soil Science**, v. 162, p. 189, 1997.
- ¹¹² 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**, v. 162, n. 12, p. 919-926, 1997.
- ¹¹³ 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**, v.59, p. 313-319, 1992.
- ¹¹⁴ LUMB, M.D. **Luminescence Spectroscopy**. New York: Academic Press, 1978. 375p.
- ¹¹⁵ OLK, D.C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Organic matter in double-cropped lowland rice soils: chemical and spectroscopical properties. **Soil Science**, v. 164, n. 19, p. 633-649. 1999.
- ¹¹⁶ LEITE, C.M.B.; BERNARDES, R.S.; OLIVEIRA, S.A. Método de Walkley-Black na determinação de matéria orgânica em solos contaminados por chorume. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 111-115, 2004.

¹¹⁷ OLIVEIRA, F.C.; MATTIAZO, M.E.; MARCIANO, C.R.; ROSSETTO, R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em um latossolo amarelo distrófico cultivado com cana de açúcar: carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 505-519, 2002.

¹¹⁸ NARIMOTO, K.M.; SANTOS, L.M.; MILORI, D.M.B.P.; MELO, W.J.; DIECKOW, J.; MARTIN-NETO, L. Caracterização da matéria orgânica de um argissolo tratado com biossólido por fluorescência induzida por laser. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005. Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. 1 CD-ROM.

¹¹⁹ SHANG, C.E.; TIESSEN, H. Organic matter lability in a tropical oxisol: Evidence from shifting cultivation, chemical oxidation, particle size, density and magnetic fractionations. **Soil Science**, v. 162, p. 795-807, 1997.