

Instrumentação avançada em ciência do solo



Ladislau Martin Neto
Carlos Manoel Pedro Vaz
Silvio Crestana
Editores

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 5
Embrapa Instrumentação Agropecuária)
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 7

Instrumentação avançada em ciência do solo 4
5

Editores 5

Ladislau Martin Neto

Carlos Manoel Pedro Vaz 5

Sílvio Crestana 7

0

1

1

3

6

7

Embrapa Instrumentação Agropecuária 8

São Carlos, SP 9

2007 7

Exemplares dessa publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 – São Carlos-SP

Fone: (16) 2107-2800

Fax: (16) 2107-2902

<http://www.cnpdia.embrapa.br>

e-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz

Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,

Dr. João de Mendonça Naime,

Dr. Washington Luiz de Barros Melo,

Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Júnior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto

Normalização Bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso

Capa: Alex Paixão e Valentim Monzane

Foto da capa: Lúcio André do Castro Jorge e Valentim Monzane

Editoração eletrônica: Carlos Manoel Pedro Vaz e Emerson de Stefani

1ª edição

1ª impressão (2007): tiragem: 350

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

159 Instrumentação avançada em ciência do solo. / Ladislau Martin Neto, Carlos Manoel Pedro Vaz, Sílvio Crestana editores. – São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2007. 438 p.

ISBN: 85-86463-14-0

1. Solos. 2. Métodos Avançados. 3. Equipamentos. 4. Instrumentos. 5. Modelamento
6. Imagem. I. Martin Neto, Ladislau. II. Vaz, Carlos Manoel Pedro. III. Crestana, Sílvio.

CDD 21 ED 681.763

©Embrapa 2007

Metodologias avançadas para estudos da matéria orgânica e seqüestro de carbono em solos

Ladislau Martin Neto

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Luiz Alberto Colnago

Marcelo Luiz Simões

Introdução

As alterações climáticas no planeta são atribuídas, em grande parte, ao aumento da concentração dos gases CO₂ (gás carbônico), CH₄ (metano) e N₂O (óxido nitroso) na atmosfera, os quais apresentam reconhecida capacidade em contribuir para o chamado efeito estufa¹, pela habilidade em absorver a radiação na região do infravermelho emitida pela terra. Nesse sentido, o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), em janeiro de 2001, declarou oficialmente que a causa principal do aumento do aquecimento nos últimos 50 anos se deve principalmente ao aumento na concentração desses gases do efeito estufa (GEE) (HOUGHTON, 2002).

O aumento anual na concentração do GEE na atmosfera tem sido estimado em 0,5% para o CO₂, 0,8% para o CH₄ e 1% para o N₂O (BOWMAN, 1990). Segundo estimativas, mantidas as condições atuais de emissão de GEE, a taxa de aumento da temperatura média global neste século será de aproximadamente 0,3 °C por década (considerando uma margem de erro de 0.2 a 0.5 °C por década), ou seja, aumento maior que o observado nos últimos 10.000 anos (HOUGHTON, 2002). Nessas

¹ O efeito estufa é um fenômeno natural que se dá devido à presença de alguns gases (vapor de água, CO₂, CH₄, CFC, NOx) na atmosfera, formando uma camada de proteção, permitindo que a luz do sol chegue à superfície terrestre, mas impedindo que a radiação solar retorne ao espaço. Assim, a temperatura global é mantida em torno dos 15° C, criando as condições de vida existente. Sem o efeito estufa, a temperatura da terra seria inferior a -18 °C. A concentração desses gases vem aumentando e mantendo mais radiação solar do que deveria, contribuindo para aumentar a temperatura global.

condições, a agricultura brasileira será seriamente afetada pelo aquecimento global (CANZIANI et al., 1998) com aumento na incidência de temporais intercalados por anos de seca prolongada (FEARNSIDE, 2001; GARRITY e FISHER, 2001).

De acordo com o estudo realizado por Fischer e van Velthuisen (2002) são esperados drásticos aumentos dos períodos de seca na Região Nordeste, bem como de intensa precipitação na Região Sul. A Região Amazônica sofrerá com significativas reduções em seus índices pluviométricos, o que implicará em períodos de queimadas mais frequentes.

Segundo o IPCC (2001), 2/3 da emissão total desses gases são provenientes da queima de combustíveis fósseis e das atividades industriais, sendo o restante atribuído às atividades agrícolas e ao uso do solo, o qual, dependendo do manejo, altera significativamente as propriedades físicas e químicas da matéria orgânica do solo (MOS).

Por isso, considerando-se os impactos ambientais e as conseqüências socioeconômicas decorrentes do aumento do efeito estufa, este capítulo explorará este tema: a agricultura como fonte emissora de GEE, o uso do solo como uma alternativa de retenção de GEE e a utilização de metodologias avançadas para estudo da MOS.

Principais atividades e países emissores de gases do efeito estufa

A queima de combustíveis fósseis, derivados do petróleo, e as atividades industriais contribuem com aproximadamente dois terços da emissão total de gases responsáveis pelo efeito estufa, sendo o restante (1/3) atribuído às atividades agrícolas e à mudança no uso da terra.

Da emissão de C-CO₂ pela queima de combustíveis fósseis, os países industrializados contribuem com mais do que 75% do total. Os Estados Unidos com apenas 4% da população mundial é responsável por 20% da emissão total, valor semelhante à emissão atribuída a todos os países em desenvolvimento em conjunto. Na Figura 1, são apresentados os 15 países considerados maiores emissores de C-CO₂.

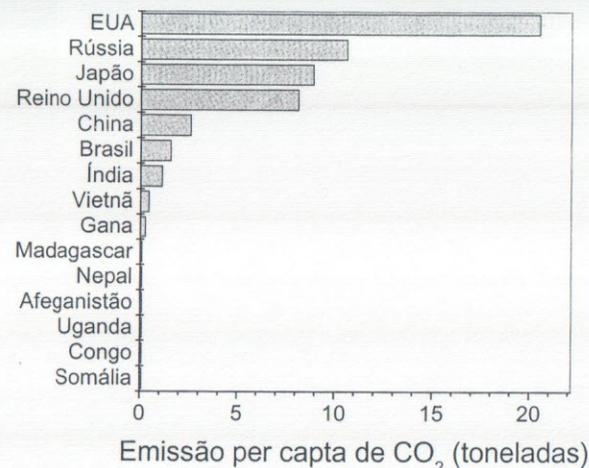


Figura 1. Emissão de CO₂ dos países mais emissores (Fonte: IPCC).

Balizadores legais - Protocolo de Kyoto

Sete anos e quase dois meses após ser assinado, o Protocolo de Kyoto começou a vigorar a partir de 16 de fevereiro de 2005, envolvendo 141 países que o ratificaram. Seu início foi marcado pela ratificação da Rússia, um dos países responsáveis pelas maiores emissões de gases do planeta. O acordo, cujo objetivo é reduzir entre 2008 e 2012, 5,2% das emissões de GEE, relativo aos níveis do ano de 1990, deixa de fora o maior poluidor do planeta, os Estados Unidos, já que, alegando riscos econômicos, não foram a favor da participação no Protocolo.

O Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL) foi uma solução possível para que países em desenvolvimento, como o Brasil, também participassem das reduções nas emissões, obtendo “créditos de carbono” (NOGUEIRA e LOPES, 2005). Criado com base em uma proposta brasileira durante a Conferência de Kyoto, em 1997, o MDL prevê investimentos dos países com metas a cumprir na reformulação do modelo energético das nações pobres, para a obtenção desses créditos.

Contudo, a questão de acúmulo de carbono pelo solo, via manejo conservacionista não foi considerada, neste primeiro período, como atividade elegível para MDL, mas há evidências do potencial de contribuição para o seqüestro de carbono no solo. Também vale destacar que, mais que o mecanismo MDL, as atividades conservacionistas promovem uma agricultura sustentável e, portanto, é altamente

recomendável sua adoção. Adicionalmente, uma segunda etapa do Protocolo de Kyoto, a partir de 2013, começa a ser negociada e de novo a questão do seqüestro de carbono no solo deve vir a ser discutida como uma atividade elegível.

Os Solos: fonte e sumidouro de carbono

A Matéria Orgânica dos Solos (MOS) é reconhecida como um importante sumidouro e fonte no ciclo global do carbono. Considerando-se que os solos contêm cerca de três vezes mais carbono que a atmosfera, o balanço entre as entradas e saídas de carbono neste compartimento possui uma influência crítica nas concentrações do CO₂ da atmosfera e, possivelmente, no clima global (POST et al., 1997; JOBBAGY e JACKSON, 2000; KIRSCHBAUM, 2000; POST e KWON, 2000).

Como pode ser visto na Figura 2, os solos constituem um dos cinco principais compartimentos globais de carbono. Esses compartimentos incluem: compartimento oceânico, contendo 38000 Pg (1 Pg = 10¹⁵ g) de C; compartimento geológico (ou fóssil) com 5000 Pg (4000 Pg de carvão, 500 Pg de óleo e 500 Pg de gás natural); solo, com 2500 Pg; compartimento atmosférico com 760 Pg e compartimento da biomassa terrestre, com 620 Pg. O reservatório de carbono no solo contém dois componentes, um orgânico com 1550 Pg de C na profundidade de 1 m de solo e o inorgânico, que contém 950 Pg de C na forma de carbonatos (SCHLESINGER, 1991). Portanto, o reservatório de carbono no solo é cerca de 3,3 vezes maior do que o atmosférico e 4 vezes o compartimento de carbono na biomassa terrestre. Esses cinco compartimentos de carbono na natureza são interconectados, havendo, sistematicamente, troca de carbono entre eles.

O incremento de carbono do compartimento atmosférico se situa na faixa de 3,2 Pg ano⁻¹. São três as principais atividades antropogênicas que contribuem para o acréscimo no reservatório de carbono na atmosfera: i) combustão de combustíveis fósseis; ii) manufatura de cimento; iii) desmatamento, mudança de uso do solo e o cultivo, que resulta em diminuição dos estoques de carbono associados à MOS.

Até a década de 1950, 75 a 80% do aumento de carbono atmosférico era devido ao desmatamento e à mudança no uso do solo. Nos anos 70, a contribuição dessas práticas caiu para próximo de 50% do aumento anual na concentração de carbono na atmosfera. Na década de 90, em regiões fortemente industrializadas, somente 20% do acréscimo anual de carbono

na atmosfera pode ser atribuído ao desmatamento, à mudança de uso e ao cultivo do solo. Contudo, há fortes indícios de que, em agroecossistemas tropicais, o fluxo de carbono do solo para a atmosfera seja maior que o registrado em países mais desenvolvidos (LAL, 1999; ROSENZWEIG e HILLEL, 2000).



Figura 2. Esquema mostrando os diferentes compartimentos de carbono na Terra e os respectivos conteúdos de carbono em cada um deles e o fluxo estimado entre os compartimentos (SCHLESINGER, 1991).

Historicamente, as perdas de carbono dos compartimentos solo e biomassa terrestre têm se situado na faixa de 50 a 100 Pg e de 100 a 150 Pg, respectivamente. Por outro lado, o potencial de seqüestro de carbono pode ser estimado em 50 a 75% das perdas históricas de carbono (LAL, 1999). A magnitude e a taxa de diminuição de carbono do solo aumentam como conseqüência da degradação e declínio da qualidade do solo (LAL, 1999; 2004). De fato, perdas líquidas de C, consistentes no tempo, podem ser consideradas como indicadores de processos de degradação, uma vez que a MOS está direta ou indiretamente vinculada a todas as suas funções. Todavia, há um grande potencial em reverter esses processos de degradação e, ao mesmo tempo, aumentar o seqüestro de C no solo.

A matéria orgânica do solo

Origem, armazenamento e perda da matéria orgânica do solo

A matéria orgânica do solo (MOS) engloba resíduos de plantas, animais e

microrganismos em diversos estádios de decomposição, em íntima associação com os minerais do solo (CHRISTENSEN, 1992, 1996).

A adição de matéria orgânica (MO) no solo ocorre pela deposição de resíduos orgânicos, principalmente de origem vegetal. Via fotossíntese, as plantas captam o CO₂ atmosférico, fixando-o no tecido vegetal. Por meio da liberação de exsudatos radiculares no perfil do solo, durante a fase de crescimento dos vegetais, parte do carbono fixado fotossinteticamente é depositado no solo. O restante é incorporado ao solo pela deposição de folhas ou de toda a parte aérea das plantas, após a sua senescência e, principalmente, das raízes senescentes.

A quantidade de carbono adicionada ao solo em um agroecossistema depende das condições edafoclimáticas e da produtividade biológica das plantas utilizadas em cada sistema de cultura. Quando os resíduos vegetais são depositados sobre o solo, sofrem, inicialmente, a ação da fauna e, posteriormente, dos microorganismos decompositores. Para os microorganismos, os compostos orgânicos presentes nos resíduos são fonte de carbono para seu metabolismo. A oxidação desses substratos na cadeia respiratória dos microorganismos resulta na perda de grande parte do carbono na forma de CO₂, que retorna à atmosfera. Uma pequena porção dos produtos resultantes da decomposição é convertida em compostos orgânicos amorfos, complexos e de aparente massa molar alta (PICCOLO e CONTE, 2000), mais resistentes à decomposição, denominadas substâncias húmicas (SH) (STEVENSON, 1994). O estoque de MOS depende, assim, da intensidade dos processos de adição de resíduos vegetais e da decomposição destes, sendo vários os fatores biológicos, químicos e físicos que conferem às frações orgânicas proteção ao ataque de microrganismos (SCHLESINGER, 1991).

Enquanto as adições de carbono são diretamente dependentes da taxa de adição de resíduos vegetais ao solo, as perdas de carbono do solo ocorrem principalmente pela oxidação microbiana dos resíduos vegetais e da MO do solo e pela lixiviação de compostos orgânicos solúveis e erosão. A magnitude de adições e perdas de carbono num determinado agroecossistema determina sua direção à sustentabilidade ou à degradação. Ambos, adição e perda de carbono do solo, dependem, direta ou indiretamente, do manejo do solo. Quando as taxas de adição e perda se equivalem, o sistema atinge um estado estável (ADDISCOT, 1992). Geralmente, o revolvimento do solo potencializa as perdas por erosão e oxidação biológica, especialmente sob ambiente tropical e subtropical. Portanto, sob altas temperaturas e umidade, o mínimo revolvimento do

solo é determinante para o acúmulo de carbono e nitrogênio (N) no solo.

O homem, pelo manejo adotado aos resíduos e ao solo, pode contribuir para o aumento da capacidade do solo para reter carbono por mais tempo. Por exemplo, sistemas de culturas que possuem a capacidade de alocar carbono nas profundidades maiores no perfil, via sistema radicular, representam uma importante contribuição para o armazenamento de carbono no solo (BALESDENT e BALABANE, 1996; BOLINDER et al., 1999). Por outro lado, quando sistemas naturais são alterados pelo revolvimento do solo, perdas importantes de carbono podem ocorrer em poucos anos de cultivo (CASTRO FILHO et al., 1991; PICCOLO, 1996; ANDREUX, 1996).

A estabilização da MO pela interação com minerais do solo, segundo Zech et al. (1997), é mais importante em solos tropicais, do que em temperados, devido às condições climáticas prevalentes na primeira região favorecerem a rápida decomposição dos componentes orgânicos. As barreiras físicas à decomposição resultam da oclusão de compostos orgânicos pelos minerais de argila e pela exclusão de organismos decompositores de determinados poros do solo. As frações orgânicas lábeis (polissacarídeos, proteínas, etc.), mais sujeitas à rápida decomposição, são protegidas no interior dos agregados, o que resulta em maior perenização dessas substâncias no solo (ZECH et al., 1997).

Qualidade e dinâmica da matéria orgânica do solo

Diversos mecanismos químicos (complexidade química intrínseca), físicos (grau de associação com a fração mineral) e biológicos podem proteger os diferentes compartimentos da MO da ação dos microorganismos decompositores (SOLLINS et al., 1996; PICCOLO et al., 1999). Esses mecanismos podem determinar que moléculas de mesma composição e complexidade constituam diferentes frações da MO do solo. Em função disso, é relevante caracterizar os compartimentos da MO, suas reações e como as diferentes práticas de manejo e sistemas de culturas podem afetar a estabilização da MO. Pois, além de determinar quanto de carbono orgânico está no solo é relevante identificar o grau de estabilidade do material orgânico em que está associado, já que disso dependerá por quanto tempo o carbono estará “seqüestrado” no solo.

A fração leve consiste de frações orgânicas com grau de decomposição intermediário entre resíduos de plantas e o húmus, apresentando densidade relativamente baixa, cerca de 1,0 g cm⁻³ (ANDERSON e

INGRAM, 1993). Essa fração, também denominada de matéria macroorgânica ou MO particulada, constitui-se num dos menores compartimentos da MO e contém, normalmente, de 10% a 30% do carbono orgânico total (COT) (SILVA e RESCK, 1997). Contribuindo com a maioria do carbono presente nos solos, a fração pesada engloba frações mais processadas, em íntima associação com os minerais do solo, e apresenta grau avançado de decomposição e densidade ($> 2 \text{ g cm}^{-3}$) mais elevada do que a fração leve.

Os teores de C-fração leve variam com o tipo de solo, o clima e com as práticas de manejo adotadas (JANZEN et al., 1992). Em solos tropicais, a taxa de perda de carbono da fração leve é de duas a onze vezes maior que a da fração pesada (DALAL e MAYER, 1986). Essa taxa mais acentuada de decomposição da fração leve se deve à natureza lábil de seus constituintes e à ausência de proteção pelos colóides dos solos (DALAL e MAYER, 1986). Em função de sua maior biodisponibilidade, JANZEN et al. (1992) sugerem que a fração leve da MO se constitui numa importante fonte de energia e carbono para microrganismos do solo. Em solos arenosos cultivados, o C-fração leve é a principal fonte de carbono para os microrganismos decompositores (CHRISTENSEN, 1992, 1996). Em áreas de solos argilosos, a contribuição de carbono associado à fração leve é também importante, muito embora seja verificada a utilização pelos microrganismos, de carbono associado à argila (FELLER e BEARE, 1997). No estudo de LARNEY et al. (1997), o uso de plantio direto por cerca de oito anos em área com trigo sem pousio resultou em acréscimos de até 27% no teor de C-fração leve, em relação às áreas com aração do solo. Esses autores concluíram que o cultivo sem o revolvimento do solo aumenta os teores de carbono facilmente mineralizável.

A dinâmica da fração leve, além de ser influenciada pelo tipo de preparo de solo, se mostra bastante dependente do aporte de carbono ao solo, de modo que esquemas de rotação que priorizam o retorno de resíduos vegetais às áreas de plantio determinam maior disponibilidade de matéria macroorgânica no solo (JANZEN et al., 1992). De modo geral, os efeitos de manejo sobre os teores de fração leve ficam restritos à camada de aração. Em áreas sob plantio direto, oscilações nos teores de C-fração leve da MO são mais notadas nas camadas superficiais, normalmente nos 5 cm iniciais de solo, onde ocorre a maior deposição de resíduos vegetais (JANZEN et al., 1992).

Em áreas com maior revolvimento e baixo retorno de carbono ao solo, a

decomposição da MO é acelerada, sendo notadas perdas drásticas da fração leve e enriquecimento relativo de carbono na fração pesada da MO (CHRISTENSEN, 1992; SILVA et al., 1999). Como consequência, há uma diminuição na biodisponibilidade da MO como um todo e uma redução na atividade de microrganismos (ZECH et al., 1997). Sob essas condições, a produtividade das culturas tende a ser reduzida, pois a qualidade do solo é comprometida. Na recuperação dessas áreas, é necessário que sejam adotados sistemas de rotação de culturas que priorizem um maior aporte de carbono ao solo, como meio de aumentar a biodisponibilidade da MO.

Resultados de grupos de pesquisa brasileiros também têm constatado que o carbono orgânico está presente em diferentes compartimentos do solo e que apresentam diferentes potenciais de emissão de carbono para a atmosfera (FREITAS et al., 1998; FREIXO et al., 2002a; FREIXO et al., 2002b). Uma pequena proporção (em torno de 20%-40%) do carbono orgânico se encontra na forma de frações leves ou particuladas não-associadas aos minerais do solo (FREIXO et al., 2002a,b).

É importante frisar que, por meio do fracionamento físico do solo, tem sido possível observar que a sua agregação pode oferecer importante mitigação na emissão de GEE e que a agregação pode ser controlada pelo seu manejo (SIX et al., 1999; SIX et al., 2000).

Num estudo sobre o efeito do tipo de preparo e da rotação de culturas na agregação e acúmulo de carbono orgânico em Latossolo de Londrina, PR e de Santo Antônio de Goiás, GO, Sá et al. (2002) observaram que solos sob plantio direto condicionam uma maior macroagregação (agregados de 19 mm a 8 mm) e dentro desses agregados estáveis há acúmulo significativo de carbono orgânico protegido da decomposição.

Experimentos de longo-prazo oferecem valiosa possibilidade para avaliações pormenorizadas destes compartimentos, principalmente visando contribuir para a simulação das transformações da MO pela modelagem computacional. Leite et al. (2004), utilizando modelo Century, constataram variações nas emissões de CO_2 dos diferentes compartimentos de carbono orgânico de um Argissolo Vermelho Amarelo de Viçosa, MG.

Alternativa viável para reduzir a emissão de gases do efeito estufa

Como alternativas viáveis à emissão de GEE para a atmosfera, poderiam ser incluídos os seguintes itens: emprego de biocombustível (álcool da

cana-de-açúcar, por exemplo); fontes alternativas de energia (solar, eólica e outras); na agricultura, ações para reduzir emissões de gases e/ou possibilitar seqüestro de carbono, que incluem reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e, eventualmente, utilização de práticas conservacionistas de manejo, como o sistema plantio direto.

O seqüestro de carbono em solos tem sido considerado uma estratégia potencialmente importante (LAL et al., 1998). Estima-se que com as atividades agrícolas com práticas conservacionistas (ex. plantio direto, rotação de culturas, plantas de cobertura e manejo da fertilidade) pode-se alcançar uma taxa de ganho de carbono no solo de $0,36 \text{ t C ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ (SAMPSON e SCHOLLS, 2000).

O Brasil, atualmente, tem uma área de 20 milhões de hectares (ha) em plantio direto, equivalente a aproximadamente 40% da área cultivada com grãos no país. Algumas estimativas de acúmulo de carbono têm sido realizadas nas regiões Sul (BAYER et al., 2000a,b,c; AMADÓ et al., 2001) e Centro-Oeste (CORAZZA et al., 1999; BAYER e MARTINETTO, 1999; BAYER et al., 2006a). Essas duas regiões agrícolas apresentam um grande potencial de seqüestro de C-CO₂ pelo solo. A primeira, devido à grande área cultivada em plantio direto ($\approx 75\%$) e viabilidade climática de adoção de sistemas de rotação de culturas com alto aporte de resíduos vegetais ao solo e; a segunda, pela grande extensão territorial (200 milhões de ha, representando $\approx 25\%$ da área total do país) e pelo aumento exponencial da área cultivada em sistema de plantio direto, estimada em 28% de uma área total cultivada de 10 milhões de ha (PEREIRA, 2002).

Uma vez consolidados os acordos internacionais, tudo indica que o Brasil, pela sua grande extensão territorial e aptidão agrícola e florestal, terá grande oportunidade para obter divisas junto aos países desenvolvidos.

Estratégias de seqüestro de carbono nos solos

Segundo Lal (1997), as seguintes práticas poderiam contribuir para o aumento do seqüestro de carbono no solo: o aumento de áreas cultivadas sob sistema de plantio direto; o incremento no aporte de carbono ao solo; a permanência de resíduos vegetais nas áreas de plantio; o controle da erosão; a diminuição do desmatamento; o aumento dos índices de produtividade como fator relevante à restrição de criação de novas fronteiras agrícolas; a melhoria da fertilidade do solo como fator

essencial ao aumento da produção de resíduos vegetais; a revegetação de solos degradados e a preservação ambiental de solos orgânicos em ambientes de várzea.

Nas áreas brasileiras de cerrado, o incremento nos teores de MO em solos cultivados pode até superar os níveis originais de carbono estocados nesses mesmos solos sob vegetação natural. Para que isso ocorra, é necessário manejar adequadamente os solos, sendo bastante importante corrigir a acidez e aplicar, de forma correta, fertilizantes, no sentido de eliminar a toxidez de alumínio e a deficiência severa de fósforo. Com essas ações, sempre há aumento da produtividade das culturas. Contudo, para que os estoques de MO aumentem, é necessário que a maior passagem de carbono no solo e a permanência de resíduos culturais nas áreas de plantio sejam priorizadas (RESCK et al., 1991).

Apesar dos dados mencionados, há consenso de que no Brasil são escassos os resultados de pesquisa procurando quantificar o potencial para seqüestro de carbono no solo, o qual deve ser determinado regionalmente, pois é dependente do tipo de solo, principalmente textura e mineralogia, e das condições climáticas, principalmente da temperatura e umidade (PAUSTIAN et al., 1997; ELLERT e JANZEN, 1999; BALESIDENT et al., 2000; SIX et al., 2000).

Deve ser ressaltado ainda que, nas estimativas feitas, as perdas de MO por erosão, em geral, não são computadas, e a diferença no conteúdo de MO no solo entre sistemas de manejo tem sido atribuída exclusivamente à oxidação biológica do carbono orgânico a CO₂. Isso implica em superestimar a emissão de CO₂ em situações onde a magnitude do processo erosivo é significativa. Outra questão que deve ser salientada é que o CO₂ contribui com aproximadamente 55% da contribuição da agricultura no potencial de aquecimento global, sendo os restantes 45% devidos às emissões, principalmente, de N₂O e CH₄ (COLE et al., 1997).

Portanto, estudos que objetivem avaliar o impacto das atividades agrícolas, bem como do manejo do solo, na contribuição da agricultura no potencial de aquecimento global devem necessariamente quantificar, além do CO₂, as emissões de N₂O e CH₄.

Também informações sobre o potencial de gramíneas em áreas tropicais são de grande relevância, conforme ressaltado por Fisher et al. (1994). No Brasil se encontram as maiores áreas de terras agropastoris, onde mais de 50% das áreas agrícolas são constituídas de pastagens, e dessas mais de 70% na forma de capim-braquiária (MACEDO, 1995). Estudos

que envolvem práticas de manejo que estimulem a produção de biomassa vegetal são estrategicamente importantes para o seqüestro de carbono.

Boddey et al. (1996) relataram que pastagens de braquiária estimuladas para o desenvolvimento mais intenso com o uso plantas fixadoras de nitrogênio, com reflexo não somente no teor de MO nas camadas superficiais do solo, mas sobre a biomassa radicular, que pode ser aumentada de 1,8 para 6,2 t ha⁻¹, pode se constituir num excelente meio de armazenamento de carbono atmosférico no solo. Além disso, em sistemas intensificados de produção de bovinos rotacionados a pasto, em que pode ocorrer competição intra-específica elevada entre as forrageiras, esta é menos impactante com gramíneas rasteiras e decumbentes, como o capim-braquiária (PRIMAVESI et al., 1999).

Nos sistemas intensificados a pasto, com uso de fontes nitrogenadas e de calcário, pode ocorrer enriquecimento do perfil do solo com cálcio (PRIMAVESI et al., 1999), o que também estimula o desenvolvimento radicular em profundidade (PRIMAVESI e PRIMAVESI, 1997).

Dados recentes de pesquisa desenvolvida em experimentos envolvendo diferentes sistemas de preparo do solo, conduzidos em fazendas da Empresa Agropecuária Scheneider Loghemann Ltda em Costa Rica (MS) e Luziânia (GO), em solos representativos da Região dos Cerrados (Latossolo vermelho-escuro e Latossolo vermelho-amarelo), reforçam a contribuição do sistema plantio direto no seqüestro de carbono pelo solo. Por comparação com o estoque de carbono orgânico da camada de 0-20 cm do solo sob cerrado nativo, foi quantificado um influxo líquido de 0,67 Mg C-CO₂ ha⁻¹ ano⁻¹ no Latossolo vermelho-escuro e de 0,79 Mg C-CO₂ ha⁻¹ ano⁻¹ no Latossolo vermelho-amarelo em sistema de plantio direto (BAYER et al., 2006a,b). Esses dados foram semelhantes aos obtidos por Corazza et al. (1999), os quais quantificaram influxos de 0,51 to 1,84 Mg C-CO₂ ha⁻¹ ano⁻¹ em sistemas sem revolvimento do solo, incluindo reflorestamento de eucalipto, pastagem e plantio direto.

A erosão hídrica pode resultar em erros de estimativa do influxo ou efluxo de C-CO₂. Por essa razão, em estudos de seqüestro de C-CO₂ o sistema a ser tomado como referência deve ser a condição nativa, a qual não sofre perdas de MO por erosão hídrica, ou pelo menos essas não são expressivas. A utilização como sistema referência, por exemplo, de um solo degradado por cultivo prolongado com grade pesada e que está sujeito a intenso processo de erosão hídrica, resulta numa superestimativa do seqüestro de C-CO₂ pelo solo. Da mesma forma, perdas por erosão em sistemas convencionais de manejo do solo resultam em superestimação

do efluxo líquido de C-CO₂ do solo para a atmosfera em comparação ao solo sob vegetação nativa.

Determinação da matéria orgânica do solo

Usualmente, a determinação do estoque de MO dos solos é baseada nos teores de COT obtidos pelo método descrito em Nelson e Sommers (1986). Os estoques de carbono no solo são calculados levando-se em consideração a densidade do solo a campo (BAYER et al., 2000a) e uma profundidade determinada.

Vários estudos têm apresentado a eficiência dos diferentes tipos de uso no acúmulo de MO nos solos do Brasil. Todavia, as profundidades avaliadas são distintas entre os trabalhos realizados, dificultando possíveis comparações. Entretanto, conforme exposto por Watson et al. (2000), estabelecer *a priori* uma profundidade única para todos os solos visando analisar o acúmulo de carbono não parece ser razoável. A profundidade de amostragem deve abranger até abaixo daquela onde a mudança significativa do teor de carbono possa ocorrer (WATSON et al., 2000; MACHADO, 2002). A ausência de informação sobre o histórico de uso nos últimos 20-25 anos e as poucas considerações a respeito do tipo de solo contribuem para aumentar a controvérsia nas comparações de resultados de estoque de carbono do solo.

Com relação às determinações dos teores de carbono orgânico, normalmente tem-se recomendado a combustão por via seca, mas, devido aos altos custos, avaliações em grandes áreas podem ficar impedidas. SANTOS et al. (2002) constaram para diversos tipos de solos do Brasil que a análise por combustão via úmida (EMBRAPA, 1997) pode ser ainda de grande utilidade.

Os métodos espectroscópicos, especialmente a ressonância magnética nuclear (RMN), vêm sendo empregados, principalmente internacionalmente, para investigar as possíveis mudanças estruturais na composição da MO, ocasionadas por alterações de uso e manejo no solo inteiro (DIECKOW et al., 2005), em frações de tamanhos de partículas (PRESTON et al., 1994), e por densidade da MO (BALDOCK et al., 1992; GOLCHIN et al., 1994), no acompanhamento da decomposição de resíduos vegetais no solo (WERSHAW et al., 1996) e nas frações mais humificadas da MO (PRESTON, 1996).

No Brasil, estudos dessa natureza são bastante recentes. Basicamente, a EMBRAPA Instrumentação Agropecuária, em colaboração com instituições

do país e do exterior, iniciou há alguns anos estudos estruturais e de reatividade da MO e SH extraídas de solos brasileiros usando várias técnicas espectroscópicas, principalmente a ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (MARTIN-NETO et al., 1991; MARTIN-NETO et al., 1994a; MARTIN-NETO et al., 1994b; MARTIN-NETO et al., 1998; MARTIN-NETO et al., 2001; BAYER et al., 2000a; BAYER et al., 2002a; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004; BAYER et al., 2006b) e, mais recentemente, a RMN (PILLON, 2000; DICK et al., 2005; DIECKOW et al., 2005).

Os resultados são promissores e demonstram o grande potencial dessas técnicas, juntamente com técnicas de fracionamento químico e físico da MO, no avanço do entendimento da dinâmica da MO em agroecossistemas brasileiros, com comparações de áreas sob diferentes manejos (plantio direto, manejo convencional e vegetação nativa) e incluindo situações que configuram seqüestro de carbono no solo (BAYER et al., 2002b).

Outro aspecto a considerar abrange o monitoramento da atividade biológica diretamente envolvida nos processos de decomposição. Apesar da pequena contribuição relativa da biomassa microbiana no COT, é do estudo de sua atividade que se pode explicar o nível de sustentabilidade de solos, uma vez que dela depende a disponibilidade de energia e de nutrientes aos organismos superiores e autotróficos, bem como a capacidade de drenar CO₂ da atmosfera.

A biomassa microbiana do solo (BMS), que corresponde ao carbono contido nas macromoléculas dos microrganismos vivos, apesar de conter apenas uma pequena quantidade do carbono do solo, é um dos indicadores biológicos mais sensíveis ao manejo (POWLSON et al., 1987). A relação BMS/C-org total é um bom indicador da disponibilidade relativa de substrato para os microrganismos e plantas (ANDERSON e DOMSCH, 1985), e valores elevados sugerem uma maior taxa de mineralização.

Fracionamento da matéria orgânica

A MO pode ser fracionada fisicamente em MO particulada (>53 µm) e MO leve (<1,6 g cm⁻³), conforme técnicas apresentadas por Cambardella e Elliot (1992) e Bremner et al. (1995), respectivamente. O fracionamento por diferença em densidade, usando-se combinação de ultra-som e iodeto de sódio (NaI), é feito conforme descrito por Golchin

et al. (1994). Mais recentemente, Conceição et al. 2006 têm mostrado vantagens do uso do politungstato de sódio em relação ao iodeto de sódio, particularmente na recuperação da fração leve da MO. É possível também fracionar quimicamente a MO, onde as SH (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) são extraídas a partir da sua solubilidade em meio ácido e alcalino (STEVENSON, 1994). O fracionamento da MO extraída do solo usando um extrator brando (solução de Na₄P₂O₄ 0,02 mol L⁻¹) em classes de tamanho molecular é realizado de acordo com Machado e Gertzebek (1993), numa coluna cromatográfica empacotada com vidro de porosidade controlada de 120-200 mesh e um diâmetro de poros de 17 µm.

Análises químicas e microbiológicas

O estoque do carbono no solo, obtido por meio da medida do conteúdo de COT, leva em conta a densidade do solo e o volume da profundidade de amostragem. As análises de textura do solo podem ser feitas de acordo com Vaz et al. (1999), com procedimento semi-automático baseado no uso de raios Gama. Análises de raio-X das frações mineralógicas, quando necessárias, também podem ser realizadas objetivando-se associar distintas variáveis de solos. A BMS, a qual corresponde ao carbono contido nas macromoléculas dos microrganismos vivos, apesar de conter apenas uma pequena quantidade do carbono do solo, é um dos indicadores biológicos mais sensíveis ao manejo (POWLSON et al., 1987). A sua determinação e do seu metabolismo é importante na compreensão da eficiência dos processos do solo. Para tanto, utiliza-se monitorar a BMS bem como seu quociente metabólico (q_{CO2}). A BMS, conforme apontam De-Polli e Guerra (1999), é um conceito holístico uma vez que considera a totalidade da população microbiana como uma entidade única. Como ela é potencialmente uma fonte de nitrogênio e fósforo entre outros elementos, para plantas, seus fluxos têm importância no manejo de solos. O metabolismo dos microrganismos de solo, reguladores destes fluxos, é indicado pelo q_{CO2}, uma relação entre a evolução de CO₂, oriundo não da respiração radicular, mas da microbiana, e a BMS. Em geral, valores baixos de q_{CO2} indicam taxas elevadas de decomposição da MO. Manejos que continuamente apontem para perdas líquidas de carbono induzirão a um solo degradado, uma vez que, na ausência do carbono, funções do solo serão interrompidas ou prejudicadas, como a sua capacidade de armazenar água, por exemplo, ou dar sustento à vida.

Vários métodos espectroscópicos são utilizados de forma complementar na busca da adequada caracterização da dinâmica da MOS. Uma das observações de interesse na avaliação do efeito dos diferentes manejos do solo sobre os compostos húmicos e frações organominerais são as possíveis mudanças estruturais destes, que refletem em alteração de suas propriedades nos solos. Essas mudanças podem afetar significativamente a dinâmica dos elementos químicos no solo, especialmente os micronutrientes e elementos traços. Certamente, a RMN é a principal técnica para identificar essas alterações, e sua metodologia está bem estabelecida, principalmente em nível internacional (PRESTON, 1996; KNICKER et al., 1996). Experimentos de RMN com amostras sólidas geralmente são realizados utilizando-se a técnica de rotação no ângulo mágico e polarização cruzada (VA-CP/MAS, do inglês, "Variable Amplitude and Cross Polarization and Magic Angle Spinning") monitorando os núcleos do isótopo ^{13}C . As informações obtidas com as análises de RMN são: o grau de aromaticidade e alifaticidade das amostras e a caracterização estrutural com identificação de compostos como ligninas, taninos, carboidratos, grupos alquil, metoxílicos, fenólicos e carboxílicos, entre outros (PRESTON, 1996).

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 a concentração de radicais livres do tipo semiquinona (SENESI, 1990a). A espectroscopia de RPE permite detectar e quantificar os radicais livres do tipo semiquinona e, conseqüentemente, o grau de humificação das SH (MARTIN-NETO et al., 1994b; MARTIN-NETO et al., 1998; MARTIN-NETO et al., 2001; BAYER et al., 2000a; BAYER et al., 2002a). A espectroscopia de RPE é também uma das poucas dentre os métodos de laboratório que pode fornecer informações estruturais sem artefatos ou condições experimentais restritivas sobre a complexação dos íons metálicos paramagnéticos, grande parte micronutrientes (Fe, Cu, Cr, Mn, Mo, etc.) com as SH (SENESI, 1990a,b; MARTIN-NETO et al., 1991; NOVOTNY e MARTIN-NETO, 2002).

A espectroscopia de fluorescência por luz ultravioleta-visível tem sido utilizada para avaliar grau de humificação de ácidos húmicos e da MO de solos intactos (ZSOLNAY et al., 1999; KALBITZ et al., 1999; MILORI et al., 2000; BAYER et al., 2002a; MILORI et al., 2002; MILORI et al., 2006). Essas análises têm ajudado a entender os efeitos do manejo e da rotação de culturas sobre as características de SH extraídas de solos.

Princípios de RMN

A RMN é o fenômeno observado em núcleos que possuem momento magnético μ e momento angular J . Esses momentos são paralelos e se correlacionam por meio da razão giromagnética γ , que é uma constante para cada isótopo, onde $\mu = \gamma J$. O momento angular $J = hI/2\pi$, onde I é o número quântico de spin e h a constante de Planck. O spin do próton e nêutron, assim como o do elétron, é igual a $1/2$. Como um núcleo pode ter mais de um próton e ou nêutron, o spin nuclear total I pode assumir valores de números inteiros ou semi-inteiros, $0; 1/2; 1; 3/2; 2$, de acordo com os números de prótons e nêutrons e da estrutura nuclear.

Os núcleos de isótopos que contêm número ímpar de prótons e/ ou nêutrons e número ímpar de número de massa como os de ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{27}Al e ^{31}P , têm spin $I =$ semi-inteiro, $1/2; 3/2; 5/2$ e $7/2$. Os núcleos que possuem número par de prótons e nêutrons, como os isótopos de ^{12}C e ^{16}O , têm spin $I = 0$ e não são observáveis por RMN. Os núcleos que contêm número ímpar de prótons e nêutrons, como o ^2H e ^{14}N , têm spin $I =$ inteiro. Os valores dos spins para cada isótopo estão tabelados em livros textos como Knowles et al. (1976); Gil e Geraldês (1987); Silverstein et al. (1991) e Atkins (1998).

A maioria dos fenômenos da RMN pode ser explicada tanto pela mecânica clássica como pela quântica e ambas serão usadas no texto para facilitar a discussão. Na versão quântica, o fenômeno de RMN ocorre quando se coloca a amostra em um campo magnético B_0 e os núcleos com $I > 0$ se orientam na direção de campo gerando $2I+1$ níveis de energia, que é dada por $E = -\mu B_0 = h\gamma B_0 I/2\pi$. Esse desdobramento em níveis de energia é o efeito Zeeman. A diferença de energia entre os dois níveis é dada por $\Delta E = h\nu = h\omega/2\pi$, onde ω é denominada frequência de Larmor e é igual a $-\gamma B_0$. A espectroscopia de RMN consiste, então, em detectar a frequência ($\omega = 2\pi\nu$) em que ocorre a transição entre os dois níveis de energia. Na versão clássica a RMN pode ser explicada da seguinte maneira: ao se colocar a amostra em um campo magnético, os spins passam a precessionar em torno da direção do campo magnético com uma frequência (frequência de Larmor (ω)), que é proporcional ao campo e à razão giromagnética ($\omega = -\gamma B_0$). Os spins que precessionam na direção paralela ao campo magnético possuem menor energia e os antiparalelos, maior energia. A condição de ressonância ocorre quando se

aplica uma frequência igual à frequência de precessão e, por ressonância, os spins paralelos ganham energia e mudam de estado.

O método experimental mais utilizado nos experimentos de RMN é o pulsado (Figura 3). Esse método consiste na aplicação de um pulso de curta duração e alta potência, na região da frequência de Larmor. O pulso gera uma banda em torno da frequência aplicada, que varre automaticamente toda a região espectral a ser analisada. Após o pulso, os spins excitados retornam ao estado fundamental, induzindo um sinal conhecido como FID (do inglês, "Free Induction Decay"), que contém todas as frequências espectrais sobrepostas (Figura 3). O FID é um "espectro" expresso em amplitude *versus* tempo, que será tratado como espectro no domínio do tempo. A conversão entre um espectro no domínio do tempo (FID) para o domínio da frequência é obtida com a Transformada de Fourier (TF).

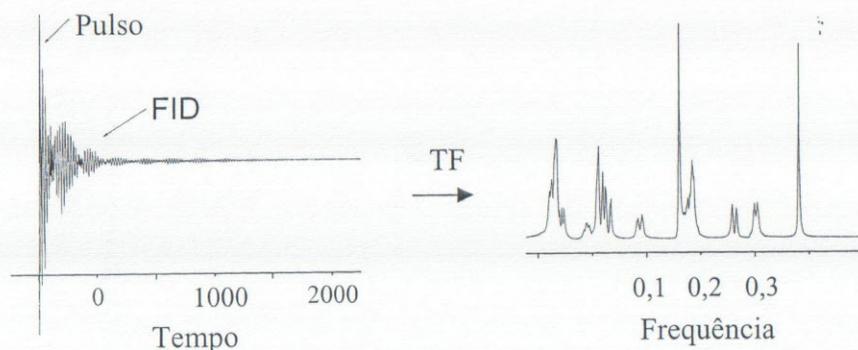


Figura 3. Diagrama de um experimento pulsado no domínio do tempo e o espectro em frequência obtido pela Transformada de Fourier (TF).

Parâmetros espectrais

Os principais parâmetros espectrais da RMN são: o deslocamento químico, o acoplamento spin-spin, os processos de relaxação e as interações de estado sólido que são a anisotropia do deslocamento químico e as interações dipolares e quadrupolares.

Deslocamento químico (δ)

O deslocamento químico (δ) é o principal parâmetro espectral da RMN. Ele advém da blindagem magnética causada pelos elétrons que envolvem ou estão na proximidade do núcleo. O deslocamento químico é devido ao

campo magnético induzido (B_{el}) na nuvem eletrônica das moléculas, pelo campo magnético B_0 . O B_{el} é um campo proporcional e de sentido contrário ao campo aplicado (B_0). Assim, quanto maior for o campo aplicado (B_0), maior será o campo eletrônico induzido (B_{el}) e maior será o deslocamento químico. Por isso, pesquisadores que atuam na área da espectroscopia de RMN buscam campos cada vez mais altos para aumentar a separação das linhas. Com o deslocamento químico, a equação de RMN fica:

$$\omega = \gamma(B_0 - B_{el}) = \gamma B_0(1 - \sigma),$$

onde σ é a blindagem eletrônica, proporcional a B_0 .

Normalmente, os deslocamentos químicos são apresentados a partir da frequência de uma amostra padrão, por exemplo, o tetrametilsilano (TMS), cuja fórmula química é $(CH_3)_4Si$, tanto para 1H quanto para o ^{13}C . Como δ é dependente do campo aplicado, são normalizados em parte por milhão (ppm) da frequência de ressonância do aparelho de acordo com a equação, δ (ppm) = $v_{ref} - v_i / v_o$, onde v_{ref} é a frequência do TMS, v_i a frequência a ser medida e v_o a frequência do aparelho. Com isso, os deslocamentos químicos de uma mesma amostra terão o mesmo valor independente do aparelho usado. Na Figura 4 tem-se um espectro de RMN de ^{13}C em estado sólido (CP/MAS) de uma amostra de ácido húmico com os deslocamentos químicos dos principais grupos de interesse para a análise da MOS.

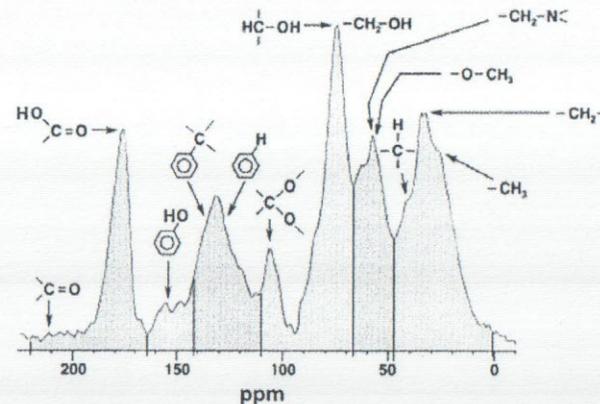


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C em estado sólido (CP/MAS) de uma amostra de ácido húmico e o assinalamento dos sinais a grupos funcionais da MOS.

Acoplamento spin-spin (J)

Os acoplamentos spin-spin normalmente são observados nos espectros de RMN em solução. Nesses espectros observa-se um desdobramento do sinal de RMN de acordo com o número de isótopos com $I > 0$ que estão ligados ou com poucas ligações do núcleo que está sendo observado. No caso do ^{13}C , os hidrogênios que estão ligados diretamente nos carbonos apresentam os maiores acoplamentos J. O número de desdobramento é normalmente igual ao número de hidrogênios vizinhos mais um, ou seja, o sinal de um carbono no grupo CH_3 apresenta quatro sinais, no CH_2 três sinais e no CH dois sinais, respectivamente. O J é uma constante e é independente do campo aplicado, por isso é expresso diretamente em unidades de frequência. Os espectros de ^{13}C também podem ser obtidos sem a presença do acoplamento, irradiando-se continuamente na frequência de absorção dos hidrogênios. Esse procedimento, conhecido como desacoplamento, é a maneira mais comum de observar os espectros de ^{13}C .

Processos de relaxação (T_1 e T_2)

Para se realizar um experimento de RMN, é preciso incidir uma energia sobre a amostra, o que altera seu equilíbrio térmico. Dependendo da intensidade da irradiação, a população dos spins nos níveis pode ser igualada, e o sinal pode até desaparecer. Esse efeito é conhecido como saturação.

O processo de restabelecer o equilíbrio térmico envolve a transferência da energia do estado excitado para a vizinhança. Esse processo de transferência é conhecido como relação spin-rede ou relaxação longitudinal e tem um decaimento exponencial, onde T_1 é a constante de tempo desse decaimento. O valor de T_1 é uma propriedade que depende da mobilidade da substância, do meio, da temperatura da amostra, entre outros fatores. O tempo de relaxação T_1 tem dois efeitos práticos nos casos extremos. Se for longo, o sinal satura facilmente. Se for curto, o sinal fica com uma largura de linha muito grande. Esse alargamento do sinal é explicado pelo princípio da incerteza de Heisenberg, que diz que se o sistema existe por curto tempo, ou seja, relaxação rápida, sua energia não é definida (largura espectral grande). Com isso a largura espectral $\Delta\nu \approx 1/T_1$. Além desse tipo de relaxação, os spins podem interagir entre si, causando um processo de relaxação conhecido como spin-spin ou relaxação transversal, que também tem um decaimento exponencial, onde T_2 é a constante de tempo. O T_2 só contribui para aumentar a largura de

linha, sem restabelecer o equilíbrio térmico. É curto para substâncias rígidas (principalmente estado sólido) e longo para moléculas com alta mobilidade (líquidas e em solução). Como $T_2 \leq T_1$, o T_2 é o responsável pela largura de linha espectral. $\Delta\nu \approx 1/T_2$.

Interações anisotrópicas

Além dos parâmetros anteriores as amostras no estado sólido também apresentam interações anisotrópicas devido ao deslocamento químico, interação dipolar e quadrupolar. Esses parâmetros originados da imobilidade das moléculas causam o alargamento das linhas espectrais, tornando-as de baixa resolução e sem muito uso em análise da MOS. A anisotropia do deslocamento químico vem do caráter não esférico das nuvens eletrônicas na vizinhança dos núcleos. A interação dipolar vem do campo local produzido pelo momento magnético dos núcleos vizinhos (hidrogênios no caso de ^{13}C) e a quadrupolar que só ocorre com isótopos com $I > 1/2$, que vem da distribuição assimétrica de cargas nos núcleos e das nuvens eletrônicas.

Para obter espectros de RMN de ^{13}C com alta resolução em estado sólido, é necessário eliminar tanto a interação dipolar (causada pelos hidrogênios) quanto a anisotropia do deslocamento químico. A interação dipolar é eliminada como desacoplamento de alta potência na frequência de absorção dos hidrogênios. Para eliminar a anisotropia do deslocamento químico, girar-se a amostra em alta rotação em torno do ângulo de $54,7^\circ$, que é conhecido como ângulo mágico (MAS, da abreviatura em inglês). A alta rotação da amostra em torno desse ângulo minimiza a anisotropia do deslocamento químico, pois essa interação, assim como a dipolar e a quadrupolar, tem dependência de $(1-3\cos^2\theta)$, onde θ é o ângulo entre a direção do campo magnético e o eixo z do sistema de eixos principais do tensor da anisotropia. Com $\theta = 54,7^\circ$, o termo $(1-3\cos^2\theta)$ se anula e os sinais de ^{13}C se estreitam, gerando espectros de alta resolução em sólidos.

Para reduzir o tempo de análise dos espectros de RMN de ^{13}C de materiais em estado sólido, que normalmente tem T_1 muito longo, usa-se, ao invés de apenas um pulso, a técnica de polarização cruzada (CP), que transfere magnetização de hidrogênio (mais sensível) para o carbono (WILSON, 1987). Nesta técnica, o tempo de espera entre as seqüências de pulsos é dependente do T_1 dos hidrogênios, que normalmente é bem mais curto que o do carbono. Com isso a técnica CP reduz o tempo de análise em

várias ordens de magnitude se comparada à técnica de pulso convencional. A combinação de todas essas técnicas leva à obtenção de espectros de ^{13}C em alta resolução em estado sólido em curto espaço de tempo e é conhecida como CP/MAS. Essa técnica de CP/MAS é uma das mais usadas nos estudos da MOS.

Na polarização cruzada os núcleos ^1H e ^{13}C submetidos a um mesmo campo magnético precessionam em diferentes frequências. A condição onde ambos os núcleos precessionam em uma mesma frequência é conhecida como condição de Hartmann-Hahn. Soma-se a isso o fato de que as interações dipolares variam entre os diferentes grupos químicos, isso devido às diferenças no acoplamento C-H e na mobilidade molecular. Dessa forma, tem-se que os efeitos da rotação são seletivos para os grupos com menor interação dipolar, tais como aqueles com maior mobilidade e/ou não protonados. Para minimizar esse efeito tem sido utilizada a técnica de amplitude variada (VA) que consta na variação da amplitude do pulso de radiofrequência durante o tempo de contato na polarização cruzada. O que ocorre é que o campo de ^1H apresenta um gradiente capaz de abranger as diferentes condições de Hartmann-Hahn (PEERSEN et al., 1993).

Aplicações de RMN de ^{13}C CP/MAS nos estudos da MO do solo

Na Figura 5 está um exemplo da aplicação da RMN de ^{13}C em estado sólido para avaliação do processo de humificação da MO no solo. Nessa figura está um espectro de RMN de ^{13}C em estado sólido típico da parte aérea de planta. Nesse espectro pode-se observar o sinal intenso em 75 ppm e 105 ppm que são típicos dos carbonos ligados a um oxigênio ou dois oxigênios, respectivamente, como nos carboidratos como celulose e derivados, que são os principais constituintes das plantas. Também é possível observar os sinais de carbonilas de proteínas e hemiceluloses entre 170 ppm e 190 ppm; os sinais dos carbonos aromáticos entre 100 ppm e 160 ppm; das cadeias laterais de proteínas de lignina, os sinais dos carbonos alifáticos de proteínas, hemicelulose, lignina entre 10 e 50 ppm. Um espectro bastante similar é obtido com os resíduos da planta. Na fração leve e livre da MO os sinais dos carboidratos já apresentam pequena redução, que se acentua na fração oclusa. Já no ácido húmico purificado o espectro é bastante diferente entre 10 ppm e 65 ppm e entre 110 ppm e 180 ppm tem alta intensidade, indicando o caráter aromático e a presença de grupos alifáticos não oxigenados e de metilas ligadas á oxigênio, como as observadas em derivados de lignina.

A RMN tem sido também utilizada para avaliar o efeito do sistema de manejo do solo sobre a MO (BAYER et al., 2000a; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004, OLK et al., 2006). González-Pérez et al. (2004), utilizando RMN de ^{13}C CP/MAS em estado sólido, mostraram que apesar de possuírem maior teor de carbono os ácidos húmicos de solos não cultivados apresentaram menor caráter aromático, sugerindo que a MOS sobre essa condição apresenta mais estruturas alifáticas do que aromáticas.

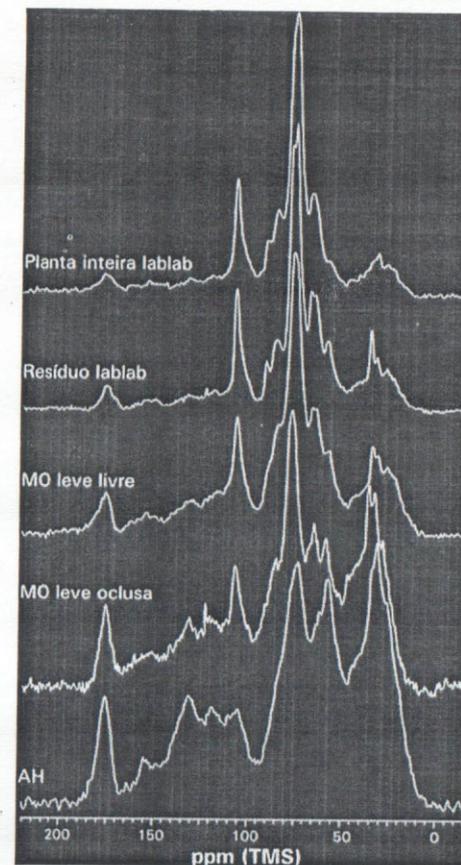


Figura 5. Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS para amostras de plantas, resíduos, frações obtidas por diferença de densidade (MO: matéria orgânica) e ácido húmico (AH) (PILLON, 2000).

Comparando os sistemas de manejo convencional e direto, os autores observaram menor aromaticidade para a MOS sob plantio direto. No

geral, a RMN permitiu os autores concluírem que o constante acúmulo de resíduos de plantas foi mais importante do que o sistema de manejo no que se refere aos parâmetros que influenciam a humificação, especificamente para o solo estudado, um latossolo rico em argilas e óxidos de ferro, os quais propiciam maior estabilidade à MOS. Nesse mesmo trabalho, foi utilizada a técnica de desacoplamento defasado (DD) (Figura 6) que consta da inserção, na seqüência de pulsos de CP/MAS, de um período em que o desacoplador fica desligado de forma a provocar um alargamento seletivo, por interação dipolar, dos sinais de carbono com forte acoplamento dipolar (OPELLA et al., 1979).

Dessa forma, essa técnica permite distinguir carbonos com diferentes interações dipolares com os hidrogênios (forte interação → carbono protonado e fraca interação → carbono não protonado e/ou com alta mobilidade molecular) e minimiza a subestimação de grupos com fraco acoplamento dipolar com os hidrogênios, tais como carbono não protonado e CH₃.

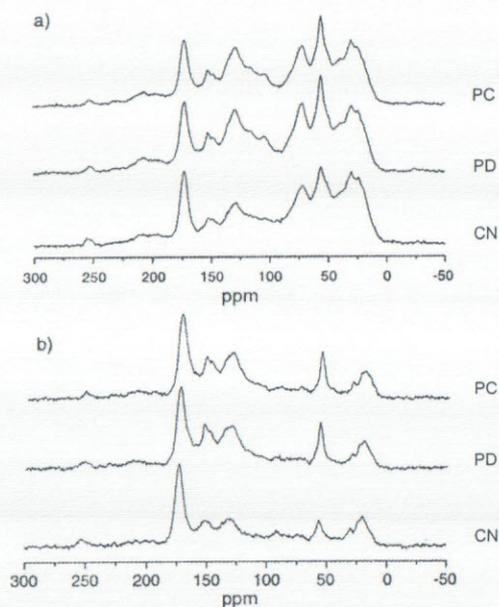


Figura 6. Espectros de RMN de ¹³C para amostras de ácido húmico de solo sobre diferentes sistemas de manejo: plantio convencional (PC), plantio direto (PD) e campo nativo (CN). CP/MAS convencional e (b) CP/MAS com desacoplamento defasado de 70 µs (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004).

Recentemente, Mao e Schmidt-Rohr (2004a,b) propuseram o uso de um filtro de anisotropia do deslocamento químico (CSA, do inglês “Chemical Shift Anisotropy”). Nessa metodologia, sinais com baixa simetria são suprimidos, e os de maior simetria são mantidos. Dessa forma, grupos aromáticos que possuem ligações químicas em simetria planar (C hibridizado sp²) são suprimidos, enquanto carbono alquila com ligações em simetria próxima à tetragonal (C sp³) são mantidos. Com isso, é possível separar e quantificar os grupos químicos cujos sinais de ressonância se sobrepõem na região de 90-110 ppm (C aromático e di-O-álquila, tal como, o C anomérico das aldoses e cetoses) (NOVOTNY et al., 2004).

Outra aplicação recente da RMN na ciência do solo visa obter informações a respeito do modelo estrutural das SH, já que até o presente momento não há um modelo estrutural para as SH explicando totalmente a composição química, a estrutura, a forma e o tamanho; e os modelos existentes geram controvérsias e discussões (HAYES e CLAPP, 2001).

A maior dificuldade encontrada na definição de um modelo para as SH é a sua heterogeneidade química, da qual há uma variabilidade de acordo com a origem (aquática ou terrestre). Simpson (2002) e Simpson et al. (2002) têm mostrado, utilizando análises de difusão por ¹H RMN e RMN bidimensional em estado líquido, que a agregação das SH deve ocorrer, em parte, por meio de interações hidrofóbicas e forças de van der Waals e que as SH são constituídas pela associação de moléculas menores, podendo coexistir moléculas com alta e baixa massa molecular, dependendo da origem e do método de extração.

Mais recentemente, Brian et al. (2006), utilizando a técnica de correlação entre ¹³C e ¹H HSQC (do inglês, “Heteronuclear Single Quantum Coherence”), observaram que as SH são constituídas predominantemente da mistura de componentes derivados de plantas e de decomposição microbológica. Hu et al. (2000), utilizando CP/MAS, polarização direta e experimentos de difusão de spins, detectaram domínios cristalinos compostos de cadeias de polimetilenos relacionando-os com domínios hidrofóbicos nas SH.

Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Princípios de RPE

O fenômeno de RPE foi descoberto pelo russo E. Zavoisky, em 1944. O

fenômeno trata da absorção de energia de elétrons desemparelhados de um átomo, molécula ou íon quando estes se encontram sujeitos à aplicação de um campo magnético. Assim, a condição necessária para se utilizar essa técnica é que o sistema em estudo apresente um elétron desemparelhado.

Alguns exemplos de centros e espécies detectáveis são: íons de metais de transição (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , VO^{2+} , Mo^{5+} , Cr^{3+} e outros), radicais livres, spin-label (KNOWLES et al., 1976; CAMPBELL e DWEK, 1984) e spin-trap (PRYOR, 1976). A aparente limitação à detecção apenas de espécies paramagnéticas se torna de grande valor, pois em muitas situações a maior parte da composição de macromoléculas não aparece no espectro de RPE e o centro ativo, região onde a reação essencial ocorre, pode ser medida sem interferências. Aplicações possíveis são: análises de estruturas poliméricas; macromoléculas orgânicas (metalo-proteínas, metalo-enzimas, sistema fotossintético de plantas e bactérias entre outras); SH do solo, água e sedimentos; argilas; moléculas e átomos semicondutores e catalisadores; fotorreações e reações de óxido-redução mediadas por radicais livres; metodologia de spin-trap para analisar radicais livres com tempos muito curtos para detecção direta; metodologia de spin-label para informações de regiões de moléculas, macromoléculas ou membranas.

As amostras podem ser analisadas no estado sólido, líquido e gasoso, sendo a análise não destrutiva e não se usa radiação ionizante, fornecendo informação sobre o estado de valência e simetria em torno do íon metálico. Além disso, permite detecção e localização de radicais livres, podendo determinar a concentração do elemento absorvedor, e a sensibilidade máxima chega a 10^{12} spins/0,1 mL; 10^{11} spins/g; 10^{-8} M.

O efeito Zeeman eletrônico

O fenômeno de RPE é baseado no efeito Zeeman eletrônico, ou seja, na capacidade de desdobrar o estado de energia degenerado no nível de spin, o que é obtido por meio da aplicação de campo magnético. Em seguida, com a aplicação de uma radiação eletromagnética, é possível gerar transição dos elétrons com diferentes spins do estado de menor energia para o estado excitado. No retorno ao estado fundamental, essa energia é devolvida ao meio e pode ser detectada. No caso do spin eletrônico, o estado de menor energia é $m_s = -1/2$ e o estado excitado é $m_s = +1/2$. A Figura 7 ilustra o fenômeno de RPE e as energias para os dois estados

são dadas por:

$$E_{+1/2} = 1/2 g\beta H$$

$$E_{-1/2} = -1/2 g\beta H$$

A diferença de energia entre os dois estados, por sua vez, será:

$$\Delta E = g\beta H$$

onde g é um parâmetro adimensional (fator g) e, no caso do elétron livre, vale 2,0023; β é o magnéton de Bohr eletrônico dado por $e(h/2\pi)/2m_e c$

onde: e é a carga do elétron = $-1,6 \times 10^{-19}$ C; m_e a massa do elétron = $9,1 \times 10^{-31}$ g; m_p a massa do próton = $1,67 \times 10^{-27}$ g ($m_p/m_e = 1836$); c a velocidade da luz = 3×10^{10} cm s $^{-1}$; h é a constante de Planck, sendo $h/2\pi = 1,055 \times 10^{-27}$ erg s.

A energia do sistema eletromagnético é dada por $h\nu$ e, no caso de campos magnéticos na faixa de 3 kGauss, a energia está na região de microondas (10^{10} Hz ou 10 GHz). Portanto, a equação que descreve o fenômeno de RPE fica $h\nu = g\beta H$ e no experimento o parâmetro a ser medido é g e, substituindo-se os valores dos demais parâmetros dados acima, tem-se: $g = h\nu/\beta H = 0,7144487 \nu/H$ para valores de ν em MHz e H em Gauss.

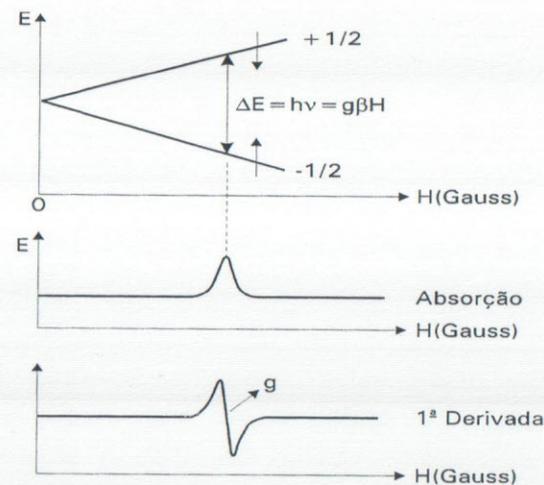


Figura 7. Esquema simplificado do fenômeno de RPE, mostrando o efeito Zeeman para um sistema com $S = 1/2$, e com $m_s = \pm 1/2$, a característica do espectro de absorção, e a primeira derivada do espectro de absorção, a qual é normalmente detectada nos espectrômetros de RPE, indicando o fator g .

As considerações feitas são válidas para o caso do elétron livre ($g = 2,0023$), no entanto, geralmente esse não é o caso, e o elétron encontra-se sujeito às interações no átomo, íon ou molécula, tais como interação spin-órbita, interação hiperfina, interação super-hiperfina, interação fina e outras (WEIL et al., 1994). A interação spin-órbita é a responsável pela alteração nos valores de g do elétron livre e depende do orbital onde o elétron desemparelhado se encontra.

As interações adicionais existentes na interação do spin eletrônico com o seu próprio spin nuclear (interação hiperfina) ou com spin nuclear de átomos vizinhos (interação super-hiperfina) ou mesmo em sistemas de spin acima de $1/2$ geralmente geram alterações nos espectros de RPE que ampliam o número de parâmetros e dão informações valiosas sobre o sistema em estudo (CAMPBELL e DWEK, 1984).

Interação hiperfina

Um exemplo típico de interações adicionais é a interação hiperfina que se origina da interação do spin do elétron com o spin do núcleo do átomo em estudo. Em geral, existirão $2I + 1$ ($I \equiv$ spin nuclear) orientações do spin nuclear em um campo magnético. Por exemplo, para $I = 1/2$, $m_I = \pm 1/2$ a equação de ressonância torna-se: $h\nu = g\beta H + Am_I$. Para o caso de $S = 1/2$ e $I = 1/2$ (Figura 8) os níveis de RPE tornam-se:

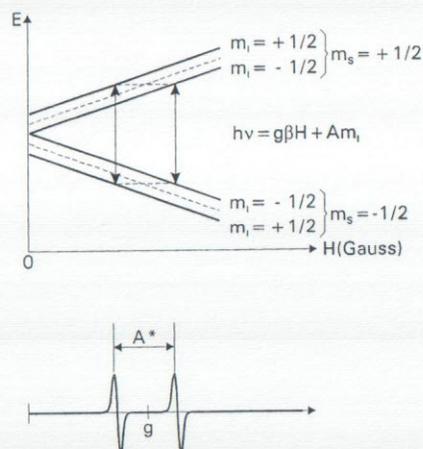


Figura 8. Esquema dos desdobramentos dos níveis de energia para uma situação de spin eletrônico (S) $1/2$ e spin nuclear (I) $1/2$, mostrando as transições permitidas. No espectro de RPE são observadas 2 linhas separadas pelo chamado parâmetro de separação hiperfina (A), no caso medido em Gauss (A^*).

Vale observar que:

- 1) a energia $h\nu$ é a mesma nas duas transições;
- 2) o estado de spin nuclear (m_I) não muda na transição de spin eletrônico, ou seja, a regra de seleção é $\Delta m_s = \pm 1$ e $\Delta m_I = 0$.

Portanto, o espectro consistirá de duas linhas, e o valor de g é o centro da linha de separação entre as duas absorções. O parâmetro A^* , em unidade de campo magnético (Gauss ou miliTesla), é bastante utilizado (KNOWLES et al., 1976).

A interação hiperfina é muito útil para a espectroscopia de RPE, pois é possível identificar, com maior segurança, os elementos absorvedores. Por exemplo, o íon Mn^{2+} tem $I = 5/2$, portanto: $2I + 1 = 2 \times (5/2) + 1 = 6$ linhas com $m_I = +5/2, +3/2, +1/2, -1/2, -3/2, -5/2$. Além disso, podem fornecer informações a respeito do tipo e simetria dos sítios de complexação (SENESI, 1990a). Em solução aquosa diluída, o Mn^{2+} apresenta seis linhas igualmente espaçadas, conforme pode ser visto na Figura 9. A largura de linha intrínseca pode ser uma informação útil também, pois está associada ao tempo de relaxação do sistema, podendo fornecer informações sobre a dinâmica dos seus complexos com SH, tais como a rápida troca entre os íons de Mn^{2+} em solução e adsorvidos, e eventuais distorções da esfera de coordenação quando da sua adsorção (McBRIDE, 1978).

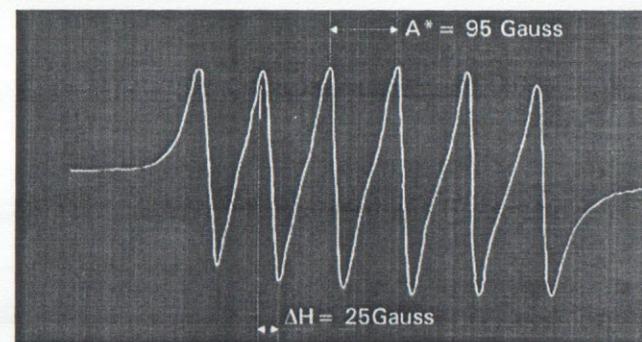


Figura 9. Espectro típico do íon Mn^{2+} em solução aquosa, com seis linhas igualmente separadas com valor de separação hiperfina $A^* = 95$ Gauss. A largura intrínseca de cada linha chamada de ΔH tem valor de 25 Gauss.

Conforme já mencionado, existem vários outros tipos de interações possíveis que influenciam o espectro de RPE, como interação super-hiperfina, originada entre o spin eletrônico e o spin nuclear de átomos

vizinhos, as interações finas, que surgem em sistemas de spin com valores superiores a 1/2 e outros. Contudo, por questões de simplicidade e sintonia com os aspectos e exemplos que serão abordados sobre RPE, as informações que já foram apresentadas são suficientes para o acompanhamento e entendimento dos espectros e resultados apresentados neste capítulo.

Quantificação de espécies paramagnéticas

A concentração de spins é diretamente proporcional à integral dupla do espectro de RPE. Uma aproximação normalmente muito utilizada para a obtenção da concentração de spins é feita utilizando-se a fórmula $I \times (\Delta H)^2$ (POOLE, 1967), onde I é a intensidade do sinal e ΔH é a largura do sinal tomada pico a pico (Figura 10). Na prática, é utilizado um padrão com conhecida concentração de spins, geralmente fornecido pelos fabricantes de espectrômetros, para a transformação da integral dupla do espectro de RPE ou da aproximação $I \times (\Delta H)^2$ em número de spins, sendo os valores normalmente apresentados em spins por grama de amostra (spins g^{-1}) ou em spins por grama de carbono (spins $(g C)^{-1}$). Utiliza-se também o método do padrão secundário (SINGER, 1959) com um cristal de rubi (Al_2O_3) contendo Cr^{3+} . No caso específico da quantificação do radical livre do tipo semiquinona, o g do rubi está em torno de 1,26, portanto, não interferindo no sinal de interesse, cujo valor do fator g está em torno de 2,003 (SENESI, 1990a; MARTIN-NETO et al., 1991). A utilização desse método tem como objetivo detectar possíveis alterações no fator Q da cavidade ocasionadas por diferenças nas características das amostras, como conteúdo residual de umidade, interferentes metálicos e outros. O fator Q é a razão entre a energia absorvida e a energia incidente na cavidade ressonante do equipamento de RPE.

Aplicações de RPE em ciência do solo

Várias oportunidades e exemplos de aplicações de RPE têm sido apresentados na literatura nacional e internacional, com resultados interessantes e inéditos na área (SENESI, 1990a; JEZIERSKI et al., 2000; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004; WATANABE et al., 2005; ROSA et al., 2005). Por exemplo, é bem aceito que entre métodos de laboratório, a espectroscopia de RPE é uma das únicas capazes de fornecer informações estruturais, sem artefatos ou condições experimentais restritivas, sobre a complexação de íons metálicos (Fe^{3+} ,

Cu^{2+} , Mn^{2+} , VO^{2+} , Cr^{3+} e outros) com SH de solos, água e sedimentos (SENESI, 1990a,b; MARTIN-NETO et al., 1991; CHEN et al., 2002; JEZIERSKI et al., 2002). A RPE pode também detectar radicais livres em SH, determinando sua concentração e, algumas vezes, sua origem. As SH contêm radicais livres estabilizados em sua estrutura, e é proposto estarem associados com reações de polimerização-despolimerização; com o grau de aromaticidade e humificação da MO (RIFFALDI e SCHNITZER, 1972), podendo interagir com pesticidas e poluentes orgânicos tóxicos (SCHWARZENBACH et al., 1992; MARTIN-NETO et al., 1994a; MARTIN-NETO et al., 2001; FERREIRA et al., 2002). Além disso, LOVLEY et al. (1996) e LLOYD et al. (2000) mostraram que os radicais livres presentes em SH podem atuar na transferência de elétrons para sistemas biológicos. Também foram evidenciadas, a partir do uso da RPE, contribuições da recalcitrância química intrínseca e interações organominerais, responsáveis pela estabilidade da MO dos solos em regiões tropicais (BAYER et al., 2002a; BAYER et al., 2006b); caracterizações de sítios hidrofóbicos em SH com o uso da metodologia de spin-label (FERREIRA et al., 2001; SIMÕES, 2005); e fotorreacções envolvendo SH com detecção de radicais hidroxil, muito reativos e instáveis, pelo método de spin-trap (PACIOLLA et al., 2002; GÁRBIN et al., 2007). Enfim, trata-se de situações de grande interesse e complexidade em que uma das poucas alternativas para obtenção de dados experimentais é a utilização da RPE.

Determinação do grau de humificação de substâncias húmicas, frações organominerais e solos

A concentração de radicais livres orgânicos estáveis, detectados por RPE, é relacionada ao grau de humificação da MOS (RIFFALDI e SCHNITZER, 1972; SCHNITZER e LEVESQUE, 1979; SENESI et al., 1990a; MARTIN-NETO et al., 1998; SAAB e MARTIN-NETO, 2003). Estruturas aromáticas complexas são associadas à estabilização de radicais livres do tipo semiquinona em húmus (SENESI, 1990a; STEVENSON, 1994). Existe elevada correlação positiva entre a concentração de spin e razão molar C/H (a qual aumenta com aromaticidade) bem como com outras medidas de aromaticidade (WIKANDER e NORDEN, 1988; SENESI, 1990a,b; MARTIN-NETO et al., 1994b; OLK et al., 2000).

Com relação ao seqüestro de carbono, o conhecimento da humificação torna-se importante, pois segundo Lal (1997), uma das estratégias para o

aumento do seqüestro de carbono no solo é a criação de mecanismos para o aumento da humificação, tanto na superfície quando no perfil do solo, de resíduos oriundos da biomassa.

Um exemplo didático para mostrar a associação entre a concentração de radicais livres do tipo semiquinona e a humificação foi obtido por Martin-Neto et al. (1998) estudando ácidos húmicos (amostras sólidas) extraídos de uma climoseqüência da Argentina. Na Figura 10, são mostrados dois espectros de RPE de situações extremas de precipitação pluvial, indicando a diferença na intensidade dos sinais dos radicais livres do tipo semiquinona.

É observado que os espectros são constituídos de uma única linha associada a radicais livres que estão provavelmente associados a átomo com spin nuclear zero, como por exemplo, o oxigênio, isótopo mais abundante 16 , o que explicaria a ausência de interações hiperfinas, conforme assegura a multiplicidade de linhas dada por $2I + 1$ ($I = 0$, então se tem uma linha), e que permite propor o radical semiquinona (estrutura molecular mostrada no espectro) como um dos mais prováveis.

Contudo, do ponto de vista espectroscópico mais aprofundado, eventuais interações hiperfinas podem estar sobrepostas dentro da largura de linha intrínseca do sinal principal, associado ao efeito Zeeman, não gerando desdobramento detectável. Também, pela complexidade das SH, é temerário assumir um único tipo de radical como responsável pelo sinal, e na literatura internacional não se descarta a possibilidade de envolvimento de outros tipos de estruturas (SENESI, 1990a; CHESHIRE e McPAHIL, 1996).

Na Figura 11 são mostrados os pontos experimentais da concentração de radicais livres do tipo semiquinona *versus* nível de precipitação pluvial. Quanto maior a precipitação, maior a quantidade de produção primária de plantas, conteúdo de carbono e humificação da MOS (ANDERSON, 1987; SALA et al., 1988).

Assim, o conteúdo de carbono de solos de área mais árida é baixo, e o correspondente húmus é de estrutura mais simples, considerando-se também o nível menor de atividade microbiana. Por sua vez, o conteúdo de carbono é mais elevado em áreas com maior precipitação pluvial, e o respectivo húmus é de estrutura mais complexa, influenciado também pela maior atividade microbiana, o que leva a um maior grau de humificação.

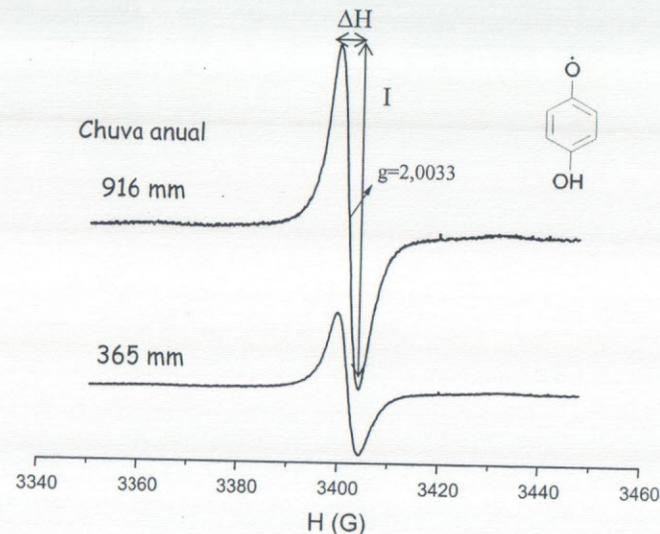


Figura 10. Espectros de RPE de ácidos húmicos de uma climoseqüência da Argentina em um Molissol com diferentes precipitações. Sinais típicos de radicais livres tipo semiquinona (MARTIN-NETO et al., 1998).

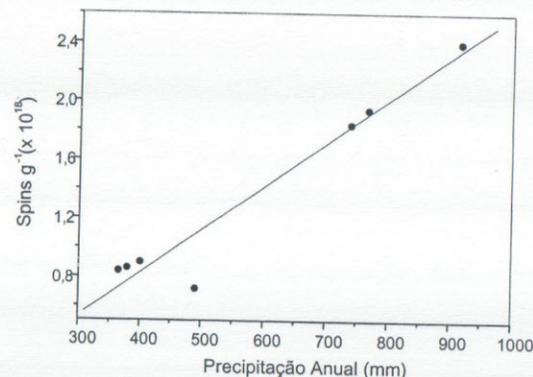


Figura 11. Concentração de radicais livres do tipo semiquinona, em spins g^{-1} , *versus* nível de precipitação pluvial para amostras de ácidos húmicos, extraído de uma climoseqüência da Argentina, com solos Molissol (MARTIN-NETO et al., 1998).

Saab e Martin-Neto (2004) mostraram em solos Gleisolo que a concentração de radicais livres do tipo semiquinona é mais elevada em amostras de humina, seguida pela dos ácidos húmicos, que têm maior concentração que ácidos fúlvicos, a fração de menor humificação das três

componentes. Ressalta-se que as análises de RPE na fração húmica foram possíveis devido ao fato de as amostras estarem em ambiente anaeróbico, e que os íons metálicos apresentam-se em estados de oxidação reduzidos, como no caso do ferro que deve predominar, o Fe^{2+} , em estado diamagnético, não trazendo contribuições para o espectro de RPE.

De fato, a determinação do grau de humificação por meio da concentração de radicais livres do tipo semiquinona tem sido intensamente utilizada para avaliar efeitos de diferentes manejos do solo e rotação de culturas, permitindo a comparação de áreas sob floresta (sem cultivo), manejo convencional, cultivo mínimo e plantio direto, áreas sob adição de lodo de esgoto, entre outros. Bayer et al. (2000a,b; 2002b) mostraram que áreas sob plantio direto, com maior aporte de resíduos na superfície do solo, em regiões subtropicais do Brasil, apresentam uma diminuição no grau de humificação de ácidos húmicos e de agregados organominerais (frações 53-20 μm e 20-2 μm), em comparação com solos sob manejo convencional.

Na Figura 12 são mostrados dados da comparação do grau de humificação de um solo Acrisol, do campo experimental de Eldorado do Sul/RS, detectados pela concentração de radicais livres do tipo semiquinona, avaliados no quinto e nono anos dos experimentos de manejo do solo. Observam-se dois aspectos concomitantes: aumento no grau de humificação das amostras de ácido húmico nas áreas sob manejo convencional e diminuição no grau de humificação nas áreas sob plantio direto, quando são comparados o quinto e o nono ano.

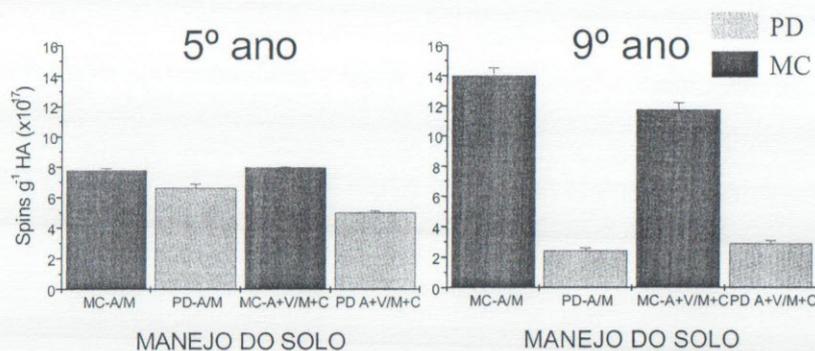


Figura 12. Resultados mostrando a concentração de radicais livres do tipo semiquinona, dado em $spin\ g^{-1}$, em ácidos húmicos extraídos de solos do tipo Acrisol, em Eldorado do Sul/RS, em função do manejo do solo. MC: manejo convencional; PD: plantio direto; AM: aveia e milho; A+V/M+C: aveia+vica/milho+caupi (BAYER et al., 2002a).

Análises das frações organominerais extraídas desse mesmo solo mostraram diminuição do grau de humificação nas frações consideradas humificadas de 53-20 μm e 20-2 μm , e na fração < 2 μm não houve mudanças, após nove anos de manejo do solo (Figura 13).

Esses resultados corroboram com as observações feitas com amostras de ácidos húmicos e demonstram que a MO mais estável (ácido húmico ou agregados organominerais menores que 53 μm) podem sofrer alterações em períodos relativamente curtos.

Para melhor entendimento sobre a humificação e obtenção dessa informação de forma precisa, considerando a sua importância na agricultura, Novotny e Martin-Neto (2002) realizaram estudos para avaliar a influência da umidade e da presença de íons metálicos na determinação do grau de humificação por RPE. Os resultados mostraram interferência tanto da umidade quanto da presença de íons paramagnéticos na quantificação dos radicais livres do tipo semiquinona e na largura de linha do sinal do radical livre, devendo eles, então, serem cuidadosamente controlados quando da determinação do grau de humificação por meio da RPE.

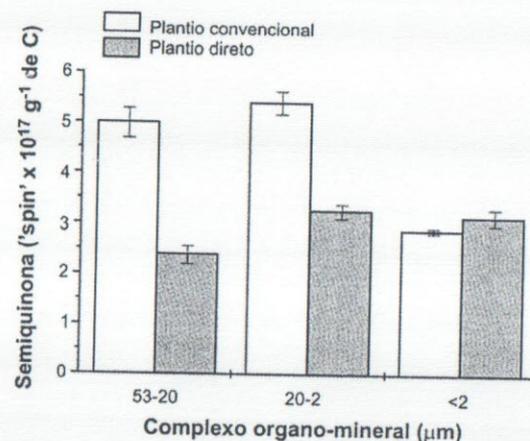


Figura 13. Concentração de radicais livres do tipo semiquinona, em spins $(g\ C)^{-1}$, para frações organominerais (53-20 μm ; 20-2 μm e < 2 μm) de um Acrisol, para áreas sob plantio convencional e direto (BAYER et al., 2002b).

Contudo, além da importância para os aspectos agrônômicos, os resultados sugerem que, do ponto de vista estrutural dos ácidos húmicos, o fato de haver mudanças no grau de humificação sugere que a estrutura

molecular mais provável para os ácidos húmicos é uma associação de moléculas de massa molecular não tão elevadas e mantidas por forças fracas, como interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, coerentes com recentes resultados publicados na literatura internacional (PICCOLO, 2001; SUTTON e SPOSITO, 2005).

Segundo Piccolo et al. (1999), uma outra possibilidade de seqüestro de carbono no solo é via proteção hidrofóbica. Essa proposta foi baseada no fato de que as interações hidrofóbicas entre compostos hidrofóbicos parecem ser a principal causa da bioresistência das SH e do seu longo período de permanência no solo (PICCOLO, 1996). E também nos trabalhos de Lichtfouse et al. (1995) e de Almendros et al. (1996), que mostraram que compostos hidrofóbicos, tais como lignina e ácidos graxos, derivados de resíduos de plantas e atividades microbianas são incorporados nas frações da MOS mais estáveis.

Com isso, Buurman et al. (2002), Spaccini et al. (2002) e Conté et al. (2004) propuseram que a aplicação no solo de SH com características hidrofóbicas poderia reduzir a mineralização da MOS pelo aumento do seqüestro do carbono nos domínios hidrofóbicos. Dessa forma, a proteção hidrofóbica pode se tornar uma ferramenta para limitar a decomposição da MO lábil no solo e, conseqüentemente, reduzir a emissão de CO₂ e mitigar o efeito estufa (PICCOLO et al., 1999).

Avaliação da complexação de íons paramagnéticos com a matéria orgânica do solo

A MOS tem papel fundamental na capacidade de troca catiônica (CTC) no solo formando complexos com íons micronutrientes (Fe³⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ e outros cátions monovalentes e polivalentes), permitindo a sua migração e tornando-os biodisponíveis para as plantas. Considerando a importância dos metais para desenvolvimento das plantas, a RPE é uma ferramenta extremamente útil para avaliar a complexação de íons metálicos paramagnéticos (Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, VO²⁺ e outros) como a MOS (McBRIDE, 1978; SENESI, 1990b; MARTIN-NETO et al., 1991).

González-Pérez et al. (2004; 2006b) estudaram a complexação desses íons paramagnéticos – oriundos de lodo esgoto – com a MOS. A Figura 14 apresenta um espectro de RPE de ácido húmico de solo após aplicação do lodo, na qual é possível observar sinais em $g = 8,66$ e $g = 4,27$ devido à presença de íons de Fe³⁺ (alto spin) complexados com a MOS em complexos de esfera interna em sítios octaédricos ou tetraédricos e com

simetria rômbrica. Em $g = 2,12$ tem-se uma linha alargada associada a interações spin-spin provavelmente devido à presença de óxidos de ferro (Fe₂O₃) (Figura 14a). Em $g_{\perp} = 1,98$ com $A^*_{\perp} \cong 7,1-7,3$ mT e observado o sinal do VO²⁺ complexado com oxigênios ligantes com simetria axial (Figura 14b).

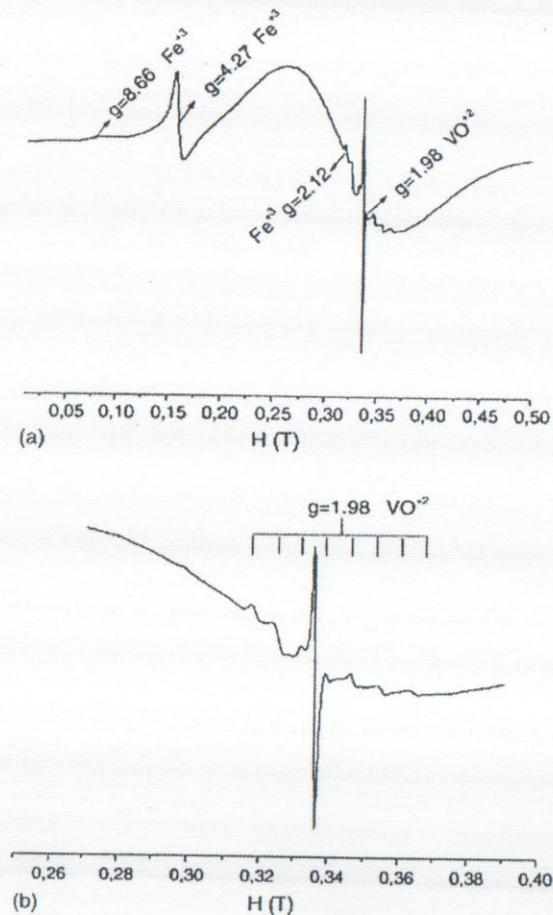


Figura 14. Espectros de RPE de amostra de ácido húmico de solo sobre aplicação de lodo de esgoto. Análises realizadas em baixa temperatura (-160 °C). (a) varrendo todo o campo magnético (janela espectral de 0,5 T) e (b) varredura de 0,2 T a 0,4 T (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2006b).

A Figura 15 apresenta alguns sinais de RPE já mencionados acima e, além desses, o sinal do Cu^{2+} em $g_{\parallel} = 2,26$ e $g_{\perp} = 2,06$ com $A_{\parallel} \cong 17$ mT complexado com oxigênios ligantes.

Moreira et al. (2006) mostraram que o Mn presente nas amostras de ácido húmico estava na forma de ligações muito estáveis com os grupos funcionais (provavelmente os carboxílicos). Isso foi constatado com a variação do valor de pH da suspensão de ácido húmico e, conseqüentemente, da protonação de tais grupos funcionais, influenciando na ligação entre Mn^{2+} com o ácido húmico (Figura 16).

Com isso, eles levantaram a hipótese de que a ausência de efeito do Mn na produtividade da soja pode ser devida a complexação do referido nutriente pela MOS.

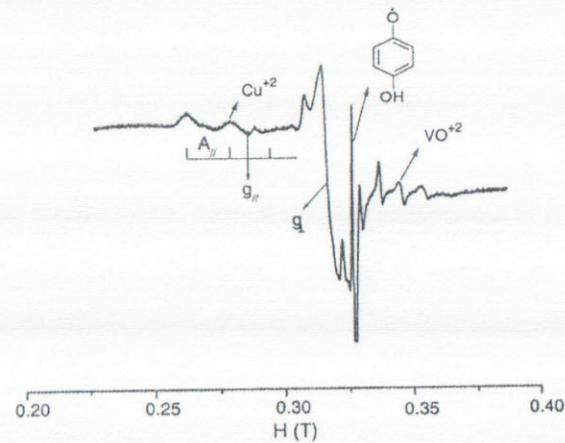


Figura 15. Espectro de RPE de amostra de ácido húmico de solo. Análises realizadas em baixa temperatura (-160 °C) com varredura de 0,2 T a 0,4 T (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004).

Dessa forma, a RPE permite, além de detectar a presença de íons paramagnéticos, obter informações a respeito do tipo e simetria dos sítios de complexação na MOS.

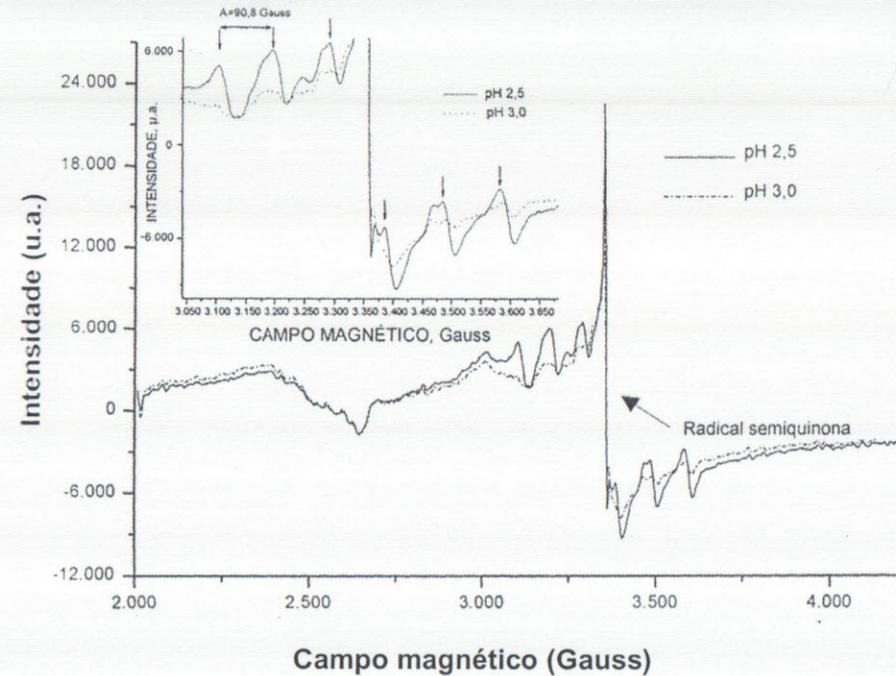


Figura 16. Espectros de RPE de ácido húmico em suspensão (50 mg de ácido húmico/mL de água) em pH 2,5 e 3,0. Em detalhe o sinal do Mn^{2+} (MOREIRA et al., 2006).

Estudo da estabilidade matéria orgânica do solo

A diferente estabilidade das frações biodegradável e humificada da MOS à ação decompositora dos microorganismos pode ser determinada pela sua complexidade química intrínseca (estabilidade química) e pelo seu grau de associação com a fração mineral do solo (estabilidade física) (THENG et al., 1989), sendo considerado esse último mecanismo o mais importante (SOLLINS et al., 1996).

Segundo Lal e Kimble (1997), o principal mecanismo de seqüestro de carbono no solo é por meio da formação de agregados organominerais e, quanto maior e mais estável for o agregado, maior será o seqüestro de carbono.

Bayer et al. (2006b) utilizaram RPE para obter informações referentes à recalitrância molecular e à estabilidade organomineral na MO de um

solo Acrisol subtropical sob plantio direto.

A recalcitrância molecular foi obtida por meio da quantificação dos radicais livres do tipo semiquinona, já que esse último supõe-se ter sua origem e ser estabilizado por estruturas aromáticas recalcitrantes, as quais são mais resistentes à decomposição microbiológica (SOLLINS et al., 1996). A estabilidade organomineral foi inferida por meio da realização de experimentos de saturação de potência de microondas (Figura 17).

Os resultados apresentados na Figura 17 mostraram mais forte interação organomineral na fração argila (< 2 μm). Isso foi constatado pelo fato de a saturação de potência de microondas não ocorrer nessa fração, o que foi considerado pelos autores uma clara indicação de que os spins dos radicais livres nessa fração mineral podem facilmente transferir energia para o meio no qual se encontram, que neste caso são os minerais.

Já para a fração silte grosseiro (53-20 μm) a saturação ocorreu em baixo valor de potência de microondas, refletindo a fraca interação organomineral, o que foi considerado coerente já que essa fração mineral é constituída principalmente por quartzo, o qual é sabido satura em baixo valor de potência de microondas, já que o radical livre associado ao quartzo possui pouca interação com o meio onde está localizado (BERSOHN e BAIRD, 1966).

Saab e Martin-Neto (2003) utilizaram a RPE para determinar a estabilidade térmica de frações físicas da MO de um solo Gleisolo. Por meio dessa espectroscopia, eles observaram que para todas as frações houve aumento da concentração de radicais livres do tipo semiquinona para temperaturas acima de 200 $^{\circ}\text{C}$, o que foi atribuído a mais rápida decomposição de estruturas alifáticas em relação às estruturas aromáticas. Das frações analisadas foi observado, mesmo em temperaturas superiores a 600 $^{\circ}\text{C}$, uma quantidade residual de radicais livres do tipo semiquinona para as frações 2-20 μm e 20-53 μm (Figura 18). Os autores supuseram que essa maior estabilidade térmica da MO humificada pode ser resultado da maior recalcitrância química ou da associação com a fração mineral, provavelmente em agregados ou com a fração argila.

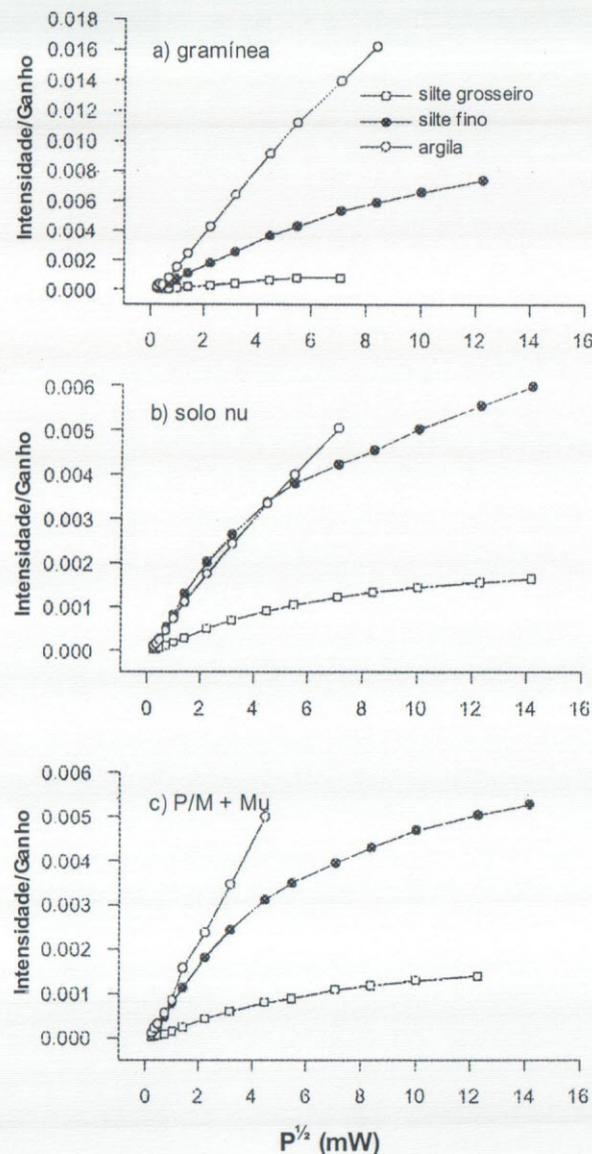


Figura 17. Curvas de saturação de potência de microondas para amostras de diferentes frações minerais: silte grosseiro (53-20 μm), silte fino (20-2 μm) e argila (< μm), extraídas de solos sobre plantio direto. (a) gramínea, (b) solo nu e (c) pousio/milho com mucuna (P/M + Mu) (BAYER et al., 2006b).

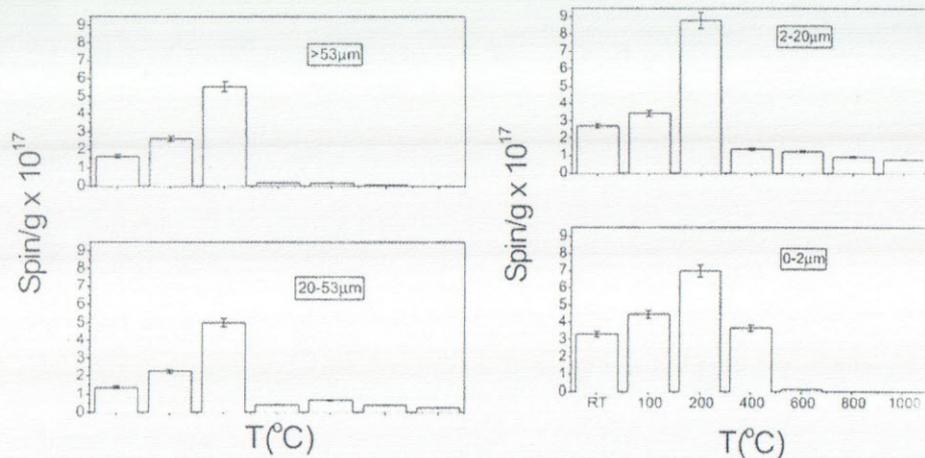


Figura 18. Concentração de radicais livres do tipo semiquinona de frações físicas do solo em função da temperatura (RT significativa temperatura ambiente (28 °C)) (SAAB e MARTIN-NETO et al., 2003).

Espectroscopia de fluorescência

Conceitos básicos de fluorescência

Atualmente, várias substâncias orgânicas são conhecidas por emitirem luz quando ativadas por diferentes tipos de radiação. Dependendo do tipo de excitação, é feita uma distinção entre os diferentes processos, tais como fotoluminescência, o qual é estimulado por radiação ultravioleta ou visível; radioluminescência, excitado por substâncias radiativas; catodoluminescência, causado por bombardeamento de elétrons com altas velocidades, luminescência por raios-X, disparadas por raios-X, e assim por diante.

Todas as substâncias que exibem luminescência em resposta a vários fatores são chamadas de materiais luminescentes. Dois tipos básicos deles são conhecidos: orgânicos e inorgânicos. A luminescência dos inorgânicos é determinada pelas transições eletrônicas de um determinado átomo e, no caso de cristais, dependerá também de suas interações com a estrutura da rede cristalina. No caso dos orgânicos luminescentes, é a estrutura de uma molécula individual que é responsável pela luminescência. Desta forma, quando a substância passa de um sólido cristalino para um fundido ou vapor, ou é dissolvida, sua luminescência persiste.

A energia total de uma molécula é a soma de sua energia cinética, potencial, eletrônica, vibracional e rotacional. Em geral, a magnitude dessas energias decresce na seguinte ordem: E_{cin} , E_p , E_{elet} , E_{vibr} e E_{rot} .

A energia absorvida na região de ultravioleta-visível produz mudanças na energia eletrônica da molécula resultado da transição de elétrons de valência na molécula. Essas transições consistem de excitação de um elétron de um orbital molecular ocupado (usualmente um orbital não ligante n ou ligante π) para o próximo orbital de mais alta energia (um orbital antiligante π^* ou σ^*). Os orbitais antiligantes são designados por um asterístico. Assim, a promoção de um elétron de um orbital ligante π para um antiligante π^* é indicada como $\pi \rightarrow \pi^*$. As moléculas que possuem esse tipo de transição apresentam ligações insaturadas e sistemas conjugados. Na Figura 19, tem-se um esquema relacionando cada tipo de transição com suas respectivas absorções no espectro eletromagnético.

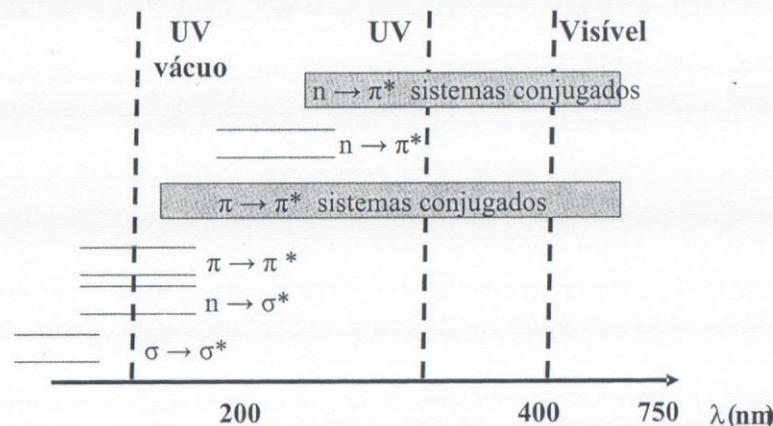


Figura 19. Faixa de energia correspondente a cada tipo de transição molecular.

A relação entre a energia absorvida em uma transição eletrônica e a frequência (ν) é dada por:

$$\Delta E = h\nu \dots\dots\dots [1]$$

onde h é a constante de Planck. Pode-se também expressar essa energia em termos de comprimento de onda λ utilizando-se a relação [2]

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \dots\dots\dots [2]$$

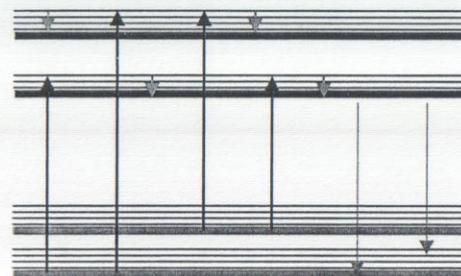
onde c é a velocidade da luz. Substituindo-se [2] em [1], tem-se que:

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} \dots\dots\dots [3]$$

A energia absorvida é dependente da diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Quanto menor a diferença de energia, menor o comprimento de onda de absorção. Caso a energia absorvida pela molécula não seja suficiente para a ionização ou dissociação da molécula, ela permanecerá no estado excitado por um determinado tempo, chamado tempo de vida do estado excitado. Logo em seguida, ela reemite na forma de calor e/ou luz. Essa luz emitida por esse processo é o que chamamos de fluorescência ou fosforescência, dependendo do tempo de vida do estado excitado. Estados excitados com tempos de vida curtos (10^{-7} - 10^{-9} s) levam a processos chamados de fluorescentes e, portanto, os estados excitados com tempo de vida longo ($> 10^{-6}$ s) levam a processos chamados de fosforescentes.

Como os estados eletrônicos da molécula são quantizados, o espectro de absorção originado de uma única transição eletrônica consistiria em linhas discretas. Entretanto, no caso de compostos moleculares, estas linhas discretas não são obtidas, pois a absorção eletrônica é sobreposta a subníveis vibracionais, como é mostrado na Figura 20. Na Figura 21 pode-se observar o espectro de absorção do benzeno, onde as transições eletrônicas ficam bem identificadas pela estrutura de picos de absorção bem definidos, mas alargados pela presença de modos vibracionais da molécula.

Em moléculas mais complexas, a multiplicidade de subníveis vibracionais e a proximidade de seus espaçamentos acarretam bandas discretas coligadas, gerando bandas de absorção largas ou “bandas envelope”. Em solução, a perda de estruturas de picos bem definidos é ainda mais significativa devido, principalmente, à interação entre moléculas na fase líquida se a molécula ou o solvente forem apolares. Isso acarreta também pequenos deslocamentos dos níveis de energia em relação aos da molécula individual. Tais características também são observadas nos espectros de emissão de fluorescência, já que a intensidade de emissão é dependente da probabilidade da transição entre os níveis de energia envolvida no processo. Quando mais intenso é um pico de emissão, maior é a probabilidade de transição.



Estado excitado

Figura 20. Níveis de energia de uma molécula diatômica.

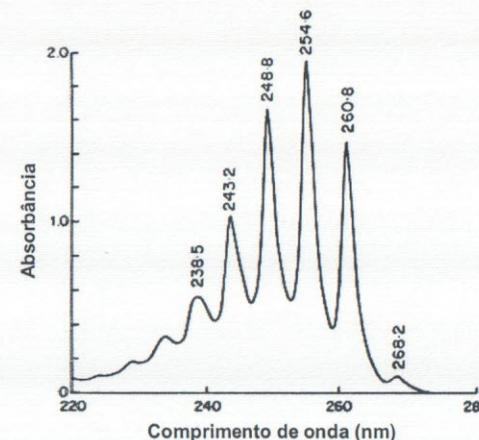


Figura 21. Espectro de absorção (220 a 280 nm) do benzeno.

A energia vibracional de moléculas excitadas é rapidamente dissipada por meio de colisões ou por outros processos mais rápidos do que a emissão de um fóton do estado excitado. Conseqüentemente, dentro de um curto período de tempo (menor do que 10^{-10} s) a molécula decai para o nível vibracional mais baixo do estado excitado ($v' = 0$). Esses processos não radiativos estão indicados por setas vermelhas na Figura 22.

Quando a emissão de fluorescência ocorre, portanto, todas as transições se iniciam em $v' = 0$ e podem terminar em qualquer estado vibracional do estado eletrônico fundamental, como mostram as setas verdes da Figura 22.

A maioria das moléculas possui um estado fundamental com elétrons de valência que ocupam o mesmo orbital tendo spins antiparalelos. O spin

resultante S dos elétrons é zero, e a multiplicidade do nível, que é dada por $|2S| + 1$, será igual a 1. Sendo assim, em geral as moléculas possuem um estado fundamental do tipo singleto S_0 .

Se o estado excitado permite a inversão de spin de um dos elétrons, o spin total será unitário, e a multiplicidade do estado igual a 3. Tais estados são chamados de tripleto T_n^* . Se a absorção de um quantum de luz não leva a qualquer mudança de orientação de spin, o estado excitado correspondente será um estado singleto S_n^* .

Na Figura 22, tem-se um esquema dos possíveis processos que podem ocorrer numa molécula excitada por luz.

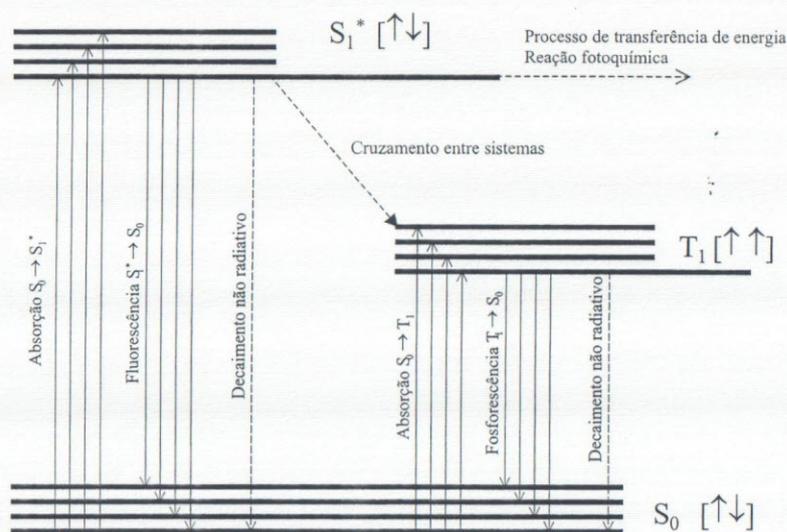


Figura 22. Níveis vibracionais e eletrônicos de uma molécula poliatômica, e caminhos de decaimento radiativos e não radiativos.

As transições singleto-singleto associadas à absorção de um quantum de luz podem resultar de uma transferência de um elétron de valência π da molécula para um orbital antiligante π^* (transição $S_0 \rightarrow S_{\pi\pi^*}$) ou da transferência para o mesmo orbital de um elétron n pertencente a um heteroátomo, se a molécula tiver heteroátomo (transição $S_0 \rightarrow S_{n\pi^*}$). Uma transição desse tipo é possível se a molécula contém grupos do tipo $C=C$, $-N=N-$, $C=N$, $-NO_2$, dentre outros.

A energia de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ é substancialmente dependente do tamanho do sistema π . Como a cadeia de ligações conjugadas aumenta

em comprimento, por exemplo, na condensação de anéis de benzeno em compostos aromáticos, essa energia decresce (o espectro se desloca no sentido de comprimentos de onda maiores). A energia de transições $n \rightarrow \pi^*$ não decresce com o crescimento do sistema π , mas pode também se tornar maior.

A molécula pode passar do estado excitado S^* para o fundamental S_0 emitindo um quantum de luz, ou passando pelo nível tripleto T_1 , através de um cruzamento entre sistemas (transição entre estados de diferentes multiplicidades) (Figura 22). Como o tempo de vida de uma molécula em estado tripleto é muito mais longo do que o de um estado singleto ($S^* \rightarrow S_0$ tem um $\tau = 10^{-9} - 10^{-7}$ s enquanto, $S^* \rightarrow T_1$ tem um $\tau = 10^{-4} - 10^{-2}$ s), a probabilidade de perdas não radiativas é muito maior num estado tripleto.

Se a molécula absorve radiação ultravioleta e não fluoresce, provavelmente ela possui outro mecanismo não radiativo para retornar ao estado fundamental. Decaimentos não radiativos do estado excitado para o fundamental podem ocorrer de duas formas:

- Pode ocorrer uma redistribuição intramolecular da energia entre os estados eletrônicos e vibracionais. Isso ocorre em dois estágios. Primeiro, o sistema passa por uma conversão interna de energia e depois dissipa a energia por um processo de relaxação vibracional;
- Pode ocorrer uma combinação de redistribuição de energia intra e intermolecular. Tal processo também ocorre em dois estágios. O primeiro é a transferência de energia para um outro nível de energia molecular através de um cruzamento entre sistemas. Nesse ponto, podem ocorrer perdas por relaxação vibracional e finalmente uma supressão externa, que pode ser realizada por transferência de energia ressonante com outro sistema ou, simplesmente, por colisão ("external quenching").

Outro processo que pode ocorrer é a decomposição da molécula se a energia recebida for comparável com a energia de dissociação química da molécula. Ambos os mecanismos estão ilustrados na Figura 22.

O espectro de fluorescência de moléculas orgânicas, geralmente, possui uma simetria especular em relação ao espectro de absorção (regra de Levshin), com o pico sendo deslocado para comprimentos de ondas maiores (deslocamento de Stokes) (Figura 23).

Este deslocamento, usualmente, fica em torno de 50 a 70 nm e representa perdas não radiativas envolvidas na luminescência. Quando a absorção

de luz pela molécula é acompanhada por mudanças estruturais, tais como mudanças angulares ou em distâncias interatômicas, o deslocamento de Stokes pode ocorrer no intervalo de 150 a 250 nm.

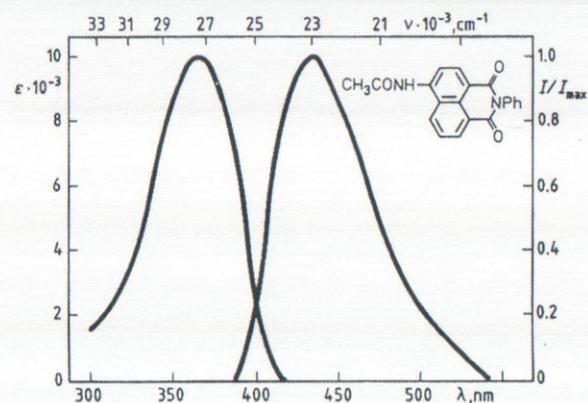


Figura 23. Deslocamento de Stokes e simetria especular das bandas de absorção (máximo em aproximadamente 350 nm) e emissão (máximo em aproximadamente 450 nm).

Um parâmetro importante quando se fala em espectroscopia de fluorescência é a eficiência quântica do processo ou *eficiência de fluorescência* ϕ_F , que é definida como:

$$\phi_F = \frac{n^\circ \text{ de fótons emitidos}}{n^\circ \text{ de fótons absorvidos}} = \frac{\text{intensidade de fluorescência}}{\text{intensidade de absorção}} \dots [4]$$

Os valores de ϕ_F ficam na faixa de 0 a 1, são inerentes à molécula e dependem de sua estrutura. Um alto valor de ϕ_F está geralmente associado com moléculas que possuem um extenso e delocalizado sistema de duplas ligações conjugadas, o que resulta em uma estrutura relativamente rígida. Como é o caso das moléculas da fluoresceína, antraceno, e outras estruturas aromáticas condensadas. Para entender esse comportamento tem-se que avaliar o sistema como um todo, níveis eletrônicos e vibracionais.

A conversão de energia eletrônica em energia vibracional e sua conseqüente dissipação são muito mais fáceis se a moléculas forem frouxa e flexível porque ela pode reorientar-se de maneira a ajudar a promover a transferência de energia. É um comportamento similar ao de um pedaço de borracha que absorve um choque e distribui a energia em

todo o volume. Um bloco rígido de metal ou pedra, por outro lado, simplesmente transmite as ondas de choque para sua vizinhança. Este comportamento é semelhante ao de uma molécula rígida, que não faz de forma eficiente a conversão interna de energia para retornar ao seu estado fundamental e, assim, é mais provável emitir um fóton.

Entretanto, nem toda molécula rígida é fluorescente, porque existe a possibilidade em certas estruturas de ocorrer do cruzamento entre sistemas. Esta rota para o estado fundamental torna-se particularmente efetiva quando o estado excitado de menor energia pode ser alcançado por uma transição $n \rightarrow \pi^*$ a partir do fundamental. O estado excitado $n \rightarrow \pi^*$ tem um tempo de vida muito mais longo do que o estado excitado $\pi \rightarrow \pi^*$ e, portanto, tem muito mais chances de ocorrer um cruzamento entre sistemas.

Uma vez ocorrido o cruzamento, as relaxações vibracionais levam a molécula para nível $v' = 0$ onde permanece aprisionada por um período de tempo longo (transição $T_1 \rightarrow S_0$ é proibida) o suficiente para ser desativada por colisões ou outros mecanismos de supressão internos (quenching). Isso explica a baixa eficiência de fluorescência de compostos tais como cetonas e heterociclos de nitrogênio. Cruzamento entre sistemas é também muito eficiente em estruturas que contenham metais pesados.

Metodologia para medir fluorescência

A geometria mais simples para se medir fluorescência de amostras transparentes é a instrumentação de excitação a 90°, cujo esquema básico esta mostrado na Figura 24.

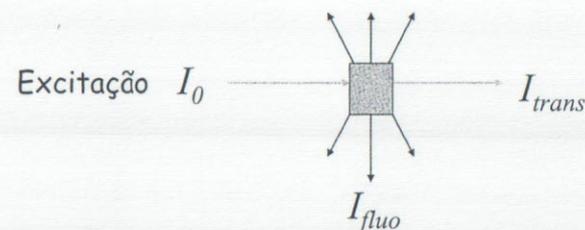


Figura 24. Geometria usual para análises de fluorescência.

Neste caso pode-se considerar que a intensidade de luz absorvida (I_{abs}) é igual à intensidade de luz incidente (I_0) menos a intensidade da luz transmitida (I_{trans}):

$$I_{abs} = I_0 - I_{trans} \dots\dots\dots [5]$$

A luz transmitida é dada pela Lei de Lambert-Beer:

$$I_{trans} = I_0 e^{-\epsilon_f cd} \dots\dots\dots [6]$$

onde ϵ_f é a absorvidade do material fluorescente, c a concentração do fluoróforo e d o caminho óptico da luz na amostra. Substituindo-se (6) em (5), tem-se que a intensidade de luz absorvida pela amostra é dada por:

$$I_{abs} = I_0 - I_0 e^{-\epsilon_f cd} = I_0 (1 - e^{-\epsilon_f cd}) \dots\dots\dots [7]$$

Por outro lado, pela Eq. 4 tem-se que a eficiência quântica do processo de fluorescência (ϕ) dada pela razão entre as intensidades de fluorescência e de luz absorvida, e, portanto:

$$I_F = \phi I_{abs} = \phi I_0 (1 - e^{-\epsilon_f cd}) \dots\dots\dots [8]$$

Pela Eq. 8 observa-se que a intensidade de fluorescência para amostras transparentes é diretamente proporcional à intensidade de luz incidente na amostra, e depende da absorvidade da amostra no comprimento de onda da excitação e da concentração dos cromóforos. Na Figura 25 tem-se uma curva típica para a intensidade de fluorescência como função da concentração do fluoróforo.

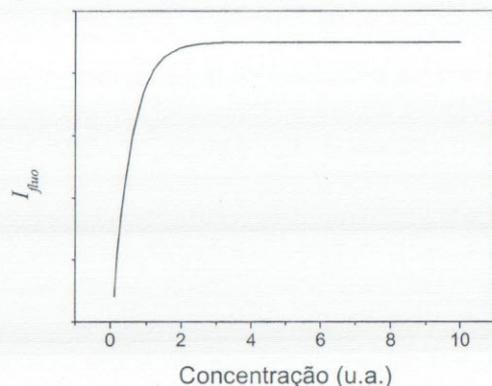


Figura 25. Intensidade de emissão de fluorescência para amostras que não apresentam superposição entre os espectros de emissão e absorção.

Pode, entretanto, ocorrer que a amostra em questão absorva o comprimento de onda da luz emitida, levando a uma diminuição da fluorescência. Nesse caso, a fluorescência como função da concentração apresenta outro comportamento. A fluorescência efetiva (I_{FE}) será a fluorescência emitida menos o que foi absorvido pela amostra. Numa primeira aproximação, considerando-se que a amostra absorva em um único comprimento de onda do espectro de emissão, pode-se dizer que:

$$I_{FE} = I_{fluo} - I_{fluo} (1 - e^{-\epsilon cd}) \dots\dots\dots [9]$$

onde ϵ_f é a absorvidade no comprimento de onda de emissão.

$$I_{FE} = I_{fluo} e^{-\epsilon cd} = \phi I_0 (1 - e^{-\epsilon_f cd}) e^{-\epsilon cd} \dots\dots\dots [10]$$

Na Figura 26 tem-se uma curva típica que descreve a Eq. 10. Em altas concentrações, observa-se até mesmo a total extinção do sinal de fluorescência.

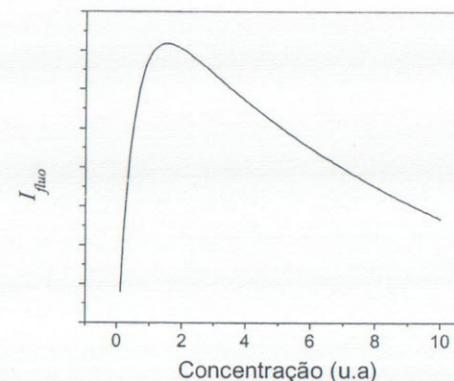


Figura 26. Intensidade de emissão de fluorescência como função da concentração para o caso de amostras que apresentem absorção na região de emissão de luz.

Comportamento similar ocorre quando a amostra possui cromóforos que competem pela absorção da luz de excitação.

Instrumentação para análise da fluorescência

O instrumental básico necessário para análises de fluorescência pode ser descrito na Figura 27. Basicamente consiste em:

i) Fonte de radiação ultravioleta-visível para excitação;

ii) Um elemento para selecionar o comprimento de onda da excitação. Quando a excitação é feita por meio de uma fonte cuja emissão é uma banda larga, como é o caso de uma lâmpada de deutério ou xenônio, este elemento é um monocromador convencional. Em situações quando a excitação é realizada por um laser, este elemento pode ser dispensado, ou em certos casos ser substituído por um prisma.

iii) Sistema óptico para direcionar a radiação de excitação sobre a amostra e coletar a radiação emitida. Esta geometria vai depender muito do tipo de amostra que será estudada. Espectrômetros comerciais destinados a análises de amostras em solução geralmente adotam uma geometria onde a óptica da excitação e a da emissão ficam dispostas a 90° uma da outra, em função da transparência da amostra. Entretanto, para amostras opacas esta configuração nem sempre pode ser utilizada, pois se coleta a fluorescência espalhada na superfície das amostras. Espectrofluorímetros dotados de fibra óptica fazem a excitação e a coleta da emissão de fluorescência no mesmo cabo óptico e são muito eficientes para medida de fluorescência de amostras opacas.

iv) Suporte para amostra

v) Um filtro para eliminar a radiação da excitação. A presença deste elemento serve para evitar que a luz da excitação entre no monocromador que fará a leitura da emissão da amostra e gere harmônicos sobrepostos ao espectro de emissão da amostra.

vi) Um monocromador para decompor a radiação emitida. Este elemento é controlado eletronicamente e permite a varredura do espectro.

vii) Um detector que responda na região de emissão da amostra. Ele é em geral uma fotomultiplicadora ou um fotodiodo.

viii) Um sistema de aquisição para registrar o espectro. Neste bloco estão embutidas todas as partes eletrônicas para tratar e amplificar o sinal medido pela fotomultiplicadora para que o espectro seja adquirido, e o controle dos monocromadores de excitação e emissão.

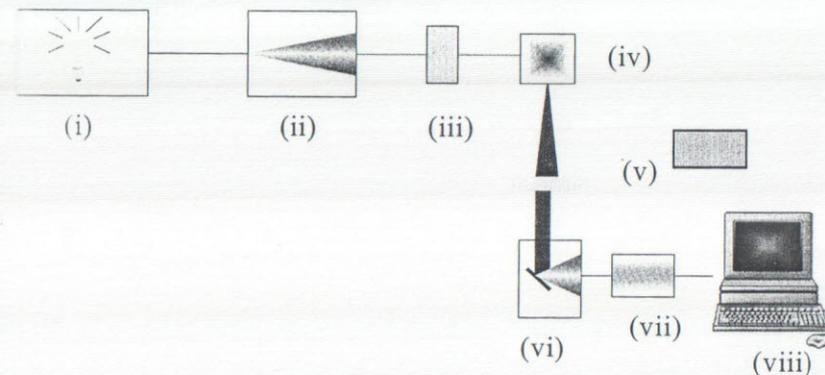


Figura 27. Elementos básicos para realização de espectroscopia de fluorescência. (i) Fonte de radiação ultravioleta-visível para excitação, (ii) monocromador de excitação, (iii) Sistema óptico para direcionar a radiação de excitação sobre a amostra e coletar a radiação emitida, (iv) porta amostra; (v) Um filtro para eliminar a radiação da excitação; (vi) monocromador de emissão; (vii) Um detector que responda na região de emissão da amostra; (viii) Um sistema de aquisição para registrar o espectro.

Os espectros de fluorescência podem ser medidos de três formas diferentes:

1. Espectro de emissão – onde o monocromador de excitação é mantido com uma seleção de comprimento de onda e o monocromador de emissão varre uma banda espectral medindo todos os comprimentos de onda que a amostra emite. Este é o modo mais usual de apresentação de resultados de espectroscopia de fluorescência.

2. Espectro de excitação – onde o monocromador de emissão é mantido em um comprimento de onda fixo no qual a amostra está emitindo e o monocromador de excitação varre uma banda espectral específica. Este tipo de espectro, além de poder trazer informações estruturais do material que está sendo analisado, é utilizado para localizar a melhor excitação da fluorescência em observação.

3. Espectro de varredura sincronizada – ambos os monocromadores varrem o espectro juntos com uma diferença fixa de comprimento de onda. Este tipo de espectro é geralmente utilizado para o estudo de materiais complexos com vários fluóforos ou em misturas de

várias substâncias fluorescentes. Com tal tipo de varredura, o que se obtém efetivamente é a multiplicação entre os espectros de emissão e excitação, produzindo um espectro com máximos e picos mais bem definidos e característicos de cada fluoróforo que compõe o material que está sendo analisado. Através desse tipo de espectro, podem-se acompanhar variações estruturais de materiais complexos durante processos reativos ou mudanças na composição de uma mistura onde estejam ocorrendo reações químicas através da identificação de picos característicos de cada substância envolvida cuja intensidade é proporcional à concentração.

Espectroscopia de fluorescência induzida por laser

Todos os conceitos expostos na sessão anterior a respeito dos princípios básicos são válidos para a espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL). A diferença consiste apenas no fato da excitação do material fluorescente ser feita através de um laser.

As vantagens de se utilizar o laser vão desde a intensidade de luz mais alta num comprimento de onda de excitação específico produzindo boa relação sinal-ruído quando comparada à fluorescência induzida por lâmpada, seletividade maior na excitação tendo, portanto, menos fatores de interferência no sinal da fluorescência, até a possibilidade de se trabalhar com excitações polarizadas e coerentes com alta potência.

As aplicações analíticas são inúmeras e incluem a monitoração de concentrações gases na atmosfera, nas flamas, e nos plasmas; análise de materiais biológicos e detecção de doenças como câncer.

Na Figura 28 tem-se um esquema básico da montagem experimental para realizar análises de FIL.

O prisma na saída do laser serve para separar a emissão laser da fluorescência de fundo do gás e permitir uma excitação "limpa" da amostra. A lente coleta o sinal de fluorescência e focaliza sobre a fenda do monocromador. O filtro elimina a excitação espalhada pela superfície da amostra. O chopper serve para modular a luz numa frequência definida que serve de referência para o amplificador lock-in. Um sistema de aquisição controla o passo do monocromador e a leitura do sinal do lock-in gerando o espectro de emissão da amostra.

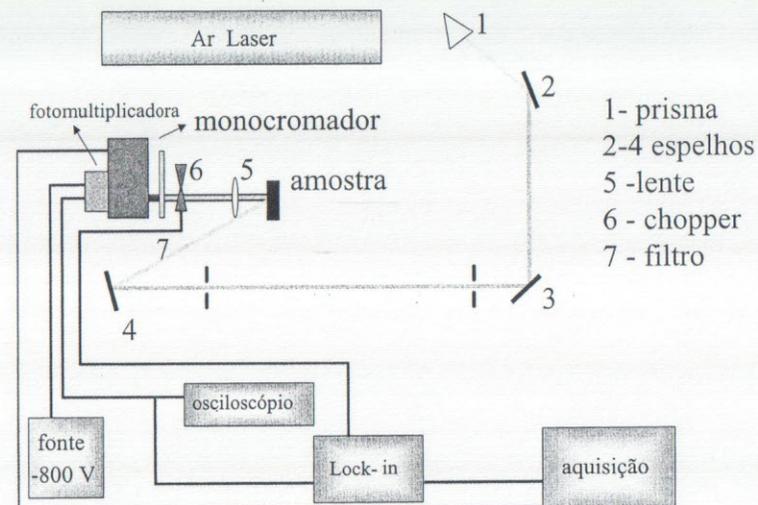


Figura 28. Montagem experimental para realização de análises de fluorescência induzida por laser (FIL).

Fluorescência das substâncias húmicas

O fenômeno de fluorescência é altamente provável em sistemas moleculares contendo átomos com pares solitários de elétrons tais como C=O, aromáticos, fenólicos, quinonas e/ou sistemas alifáticos conjugados insaturados mais rígidos. Esses grupos funcionais estão presentes nas SH.

A extensão de sistemas eletrônicos π , o nível de substituição heteroatômica, e o tipo e número de grupos substituintes sobre os anéis aromáticos afetam fortemente a intensidade e o comprimento de onda da fluorescência molecular.

O comportamento da fluorescência total de uma molécula resulta, portanto, de um efeito acumulativo primariamente dependente de vários componentes estruturais da molécula, e o espectro observado em qualquer um dos três modos de fluorescência consiste da soma de espectros individuais de diferentes focos emissores presentes na molécula.

A bem conhecida heterogeneidade das SH fornece, portanto, a razão fundamental porque as propriedades de fluorescência são consideradas como critério de diagnóstico válido para distinguir esses materiais baseados na sua natureza, gênese, e origem. Por outro lado, a

complexidade estrutural e química das moléculas húmicas representa um obstáculo, provavelmente insuperável, para a identificação de componentes estruturais individuais responsáveis pela fluorescência de SH.

Embora o problema da identificação de componentes moleculares responsáveis pela fluorescência de ácido húmico e fúlvico seja uma tarefa complexa, algumas hipóteses podem ser sugeridas sobre a possível natureza química da estrutura fluorescente em vários materiais húmicos já examinados.

O aumento da extensão do sistema eletrónico π e a presença de vários oxigênios e nitrogênios contendo grupos funcionais têm o efeito de diminuir a diferença de energia entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado, assim a fluorescência é deslocada para comprimentos de ondas maiores.

A fluorescência das SH já é uma técnica bastante utilizada em amostras ambientais (CARVALHO et al., 2004; ROSA et al., 2005). Na literatura, recentemente foram publicadas técnicas para determinar o grau de humificação de SH em solução baseadas em fotoluminescência.

Zsolnay et al. (1999) propuseram a razão entre as áreas (quarto mais para o vermelho /quarto mais para o azul) de um espectro de emissão com excitação no ultravioleta (240 nm) para avaliar humificação de MO dissolvida.

Kalbitz et al. (1999) utilizaram a razão entre picos observados no espectro de varredura sincronizada (intensidade do pico mais para o vermelho/ intensidade do pico mais para o azul) para definir o grau de humificação de ácidos fúlvicos.

Milori et al. (2002) demonstraram boa correlação entre a intensidade de emissão de fluorescência com excitação no azul (465 nm) e a concentração de radicais livres do tipo semiquinona, determinada por RPE, para amostras de ácido húmico extraído de solos.

Na Figura 29 tem-se um resultado típico de análises realizadas com solos do cerrado brasileiro. Essa alta correlação deve-se ao fato de a excitação neste comprimento de onda ser ressonante com estruturas originadas da oxidação de grupos fenólicos e quinonas. E, portanto, a intensidade de fluorescência para excitação no azul é proporcional ao grau de humificação da MO.

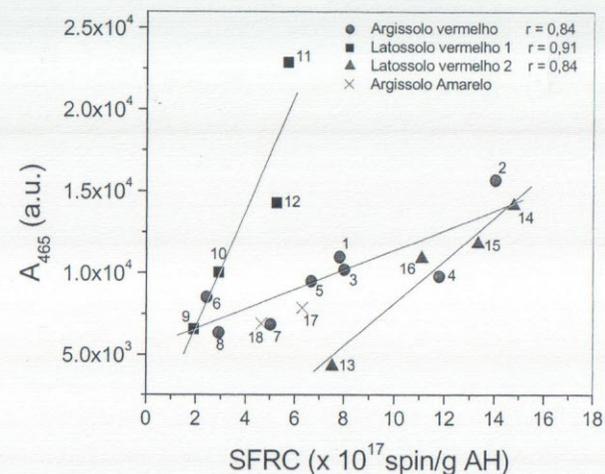


Figura 29. Correlação entre índice de humificação proposto por Milori et al. (2002) e o número de radicais livres do tipo semiquinona de solos da região do cerrado brasileiro.

Em geral, as técnicas espectroscópicas exigem a extração e fracionamento químico das SH do solo, resultando na geração de resíduos químicos e tornando a análise de solos um processo lento e trabalhoso. Além disso, os produtos desse tratamento (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) podem sofrer modificações em relação a sua forma *in situ* (FELLER e BEARE, 1997).

No sentido de viabilizar a análise da MOS num estado o mais próximo possível do natural, tem-se utilizado a Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL). Esta metodologia aplicada a solos é recente (MILORI et al., 2006) e tem mostrado resultados bastante interessantes na avaliação do grau de humificação da MOS em solos sob diferentes manejos e profundidades.

Fluorescência induzida por laser de solos intactos

A fluorescência do solo tem origem na MO, pois possui grupos funcionais ricos em ligações insaturadas contidas em sistemas rígidos. Esses grupos estão presentes principalmente na MO mais humificada, tais como OH fenólicos livres e ligados, estruturas de quinona, grupos carboxílicos ligados e anéis aromáticos. Estes são os principais fluoróforos deste material. A extensão do sistema eletrónico π , o nível de

substituição heteroatômica, e o tipo e número de grupos substituintes sobre os anéis aromáticos afetam fortemente a intensidade e o comprimento de onda da fluorescência molecular.

Na Figura 30 são mostrados os espectros de uma amostra de solo inteiro do mesmo solo calcinado. Como se pode ver, a emissão de fluorescência do solo é devida, basicamente, à matéria orgânica. Ao se iluminar a amostra de solo com luz azul excitam-se preferencialmente as estruturas cuja concentração aumenta no processo de humificação, e a área sob a curva normalizada pelo teor de carbono fornece um índice do grau de humificação da MOS.

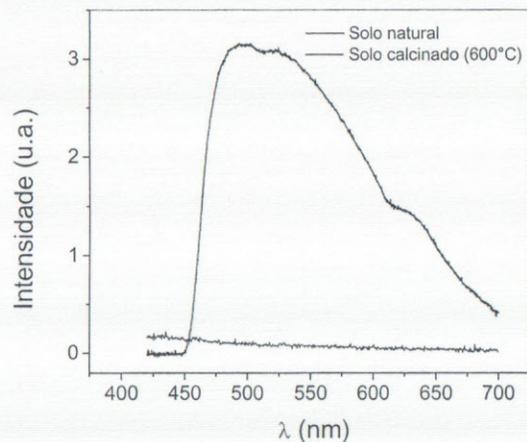


Figura 30. Espectros típicos de emissão de fluorescência de solos inteiros. Em azul, o solo sem tratamento. Em vermelho, o solo calcinado.

Na técnica de fluorescência induzida por laser (FIL) um laser na região entre ultravioleta próximo ou no azul é utilizado para excitar a amostra de solo. As amostras de solo devem ser moídas, peneiradas e prensadas em forma de pastilhas de solo, para simplificar o manuseio no laboratório. Para o sistema construído cada pastilha tinha em torno de 1 cm de diâmetro, 2 mm de espessura e 0,5 g de peso.

Na Figura 31a, é apresentada uma foto da montagem experimental construída no Laboratório de Óptica e Lasers da Embrapa Instrumentação Agropecuária. Na Figura 31b, tem-se um detalhe das pastilhas de solos utilizadas nesta técnica.

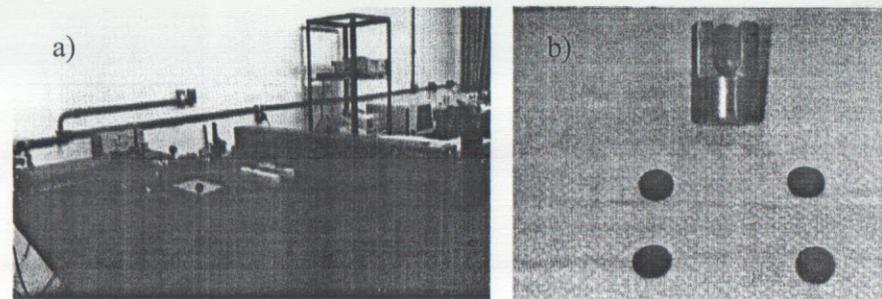


Figura 31. (a) Montagem experimental para realização de análises de FIL. (b) Detalhe das pastilhas de solos.

Na Figura 32, são apresentados os resultados da correlação entre o grau de humificação da matéria orgânica de solos inteiros medido utilizando a FIL e o grau de humificação dos ácidos húmicos extraídos dos mesmos solos utilizando-se um método de fluorescência em solução em espectrômetros comerciais (MILORI et al., 2006). A correlação entre as técnicas em geral é alta e significativa, dando respaldo à aplicação da FIL para análises da MOS. Outros resultados recentes estão sendo publicados na literatura com a aplicação desta técnica (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2006a; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2007).

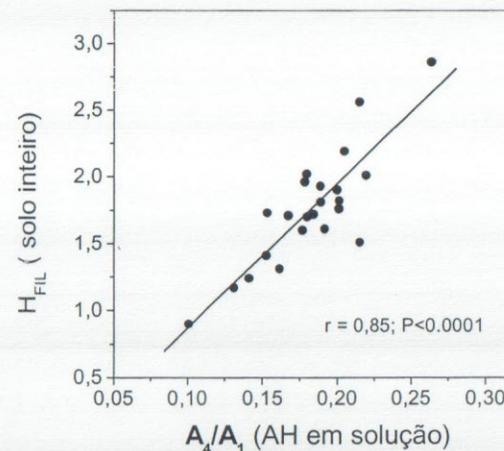


Figura 32. Correlação entre o grau de humificação da matéria orgânica de um solo inteiro medido utilizando-se a FIL e o grau de humificação do ácido húmico medido utilizando-se o método de fluorescência em solução em espectrômetros comerciais (MILORI et al., 2006).

Conclusões e necessidades de pesquisa

Pelo exposto, constata-se que o solo não apenas representa um importante compartimento de carbono, como oferece benefícios à segurança alimentar pela melhoria da produtividade de sistemas agrosilvopastoris tropicais. Em um contexto ambiental, atua como mitigador das mudanças climáticas pela possibilidade de estocar carbono em profundidade. Esse duplo benefício reside nos processos físicos, químicos e biológicos intrínsecos ao solo (ex. recalcitrância química, associação organomineral e atividade biológica do solo), que, combinados com manejos adequados (ex. práticas conservacionistas por meio do sistema de plantio orgânico ou direto) podem otimizar o benefício. Até o momento, por meio de técnicas espectroscópicas e de fracionamento físico e químico do solo, tem-se conhecimento científico a respeito da magnitude dos processos e das mudanças pelo uso e manejo dos solos.

Dependendo do tipo de solo, mineralogia, associação organomineral e da qualidade do material orgânico adicionado, pode-se estimar o potencial do solo e de seus diferentes compartimentos (frações orgânicas livres, frações intra-agregados e frações organominerais mais humificadas), na emissão de CO₂ para a atmosfera. Todavia, visando demonstrar para a sociedade de grandes centros urbanos, o mais rapidamente possível, o quão relevante é o solo na sua dupla função (segurança alimentar e mitigação da mudança climática), torna-se imperativo atender às seguintes demandas:

1. Desenvolver equipamentos portáteis para medições de carbono e de densidade do solo no campo e em tempo real. As medições mais ágeis e a baixo custo possibilitariam quantificar o teor total de carbono de um solo e de seus diferentes compartimentos com suas respectivas taxas de emissão de CO₂ para a atmosfera;

2. De posse de equipamentos portáteis, haveria a possibilidade de se quantificar os estoques de carbono em áreas mais abrangentes e verificar as reais variações na paisagem. Isso diminuiria significativamente os riscos oriundos de extrapolações de valores obtidos pontualmente (ex. parcelas experimentais) para escalas maiores num mesmo tipo de solo;

3. Desenvolver procedimentos mais eficientes e de baixo custo para identificar qual a melhor combinação funcional de organismos do solo que contribuem para o crescimento de plantas e, conseqüentemente,

maior produção (ex. microrganismos simbióticos) e para o estoque de carbono no solo (ex. atividade de organismos para a maior agregação e estabilidade de agregados do solo);

4. Desenvolver modelos de simulação da transformação do carbono orgânico dos solos baseados mais em compartimentos mensuráveis do que em pressuposições de taxas de transformação.

Referências

- ADDISCOT, T. M. Entropy and sustainability. **European Journal of Soil Science**, Bélgica, v. 46, p. 161-168, 1992.
- ALMENDROS, G.; GUADALIX, M. E.; GONZALEZ-VILA, F. J.; MARTIN, F. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 24, n. 6-7, p. 651-659, 1996.
- AMADO, T. J. C.; BAYER, C.; ELTZ, F. L. F.; BRUM, A. C. R. Potencial de plantas de cobertura em acumular carbono e nitrogênio no plantio direto e a melhoria da qualidade ambiental. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 25, p. 189-197, 2001.
- ANDERSON, D. W. Pedogenic in the grassland and adjacent forests of the Great Plains. **Advances in Soil Science**, [S. l.], v. 7, p. 53-93, 1987.
- ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. **Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1993. 221 p.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil-microorganisms in a dormant state. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 1, n. 2, p. 81-89, 1985.
- ANDREUX, F. Humus in World Soils. In: PICCOLO, A. (Ed.). **Humic substances in terrestrial ecosystems**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 45-100.
- ATKINS, P.W. **Physical chemistry**. 6th ed. Oxford : Oxford University Press, 1998.
- BALDOCK, J. A.; OADES, J. M.; WATERSM, A. G. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ¹³C NMR. **Biogeochemistry**, Holanda, v. 16, p. 1-42, 1992.
- BALESDENT, J.; BALABANE, M. Major contribution of roots to soil

organic matter storage inferred from maize cultivated soils. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 1261-1263, 1996.

BALESDENT, J.; CHENU, C.; BALABANE, M. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 215-230, 2000.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L. Plantio direto aumenta a matéria orgânica no solo e contribui para remoção do CO₂ atmosférico na região tropical do cerrado brasileira. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 3., 1999. Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria, RS: [s. n.], 1999. p. 193-196.

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 Brasil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 95-104, 2000a.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; DIECKOW, J.; AMADO, T.J.C. C and N stocks and the role of molecular recalcitrance and organomineral interaction in stabilizing soil organic matter in a subtropical Acrisol managed under no-tillage. **Geoderma**, v. 133, n. 3-4, p. 258-268, 2006b.

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

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; SAAB, S. C.; MILORI, D. M. B. P.; BAGNATO, V.S. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. **Geoderma**, Amsterdam, v. 105, n. 1-2, p. 81-92, 2002a.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; AMADO, T. J. C.; MARTIN-NETO, L.; FERNANDES, S. V. Organic matter storage in a sandy clay loam Acrisol affected by tillage and cropping systems in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 54, p. 101-109, 2000b.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Efeito de sistemas de preparo e de cultura na dinâmica da matéria orgânica e na mitigação das emissões de CO₂. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, p. 599-607, 2000c.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P. R.

Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. **Plant and Soil**, Holanda, v. 238, n. 1, p. 133-140, 2002b.

BERSOHN, M.; BAIRD, J. C. **An introduction to electron paramagnetic resonance**. New York: W.A. Benjamin, 1966. 272 p.

BODDEY, R. M.; RAO, I. M.; THOMAS, R. J. Nutrient cycling and environmental impact of Brachiaria pastures. In: WILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do. **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 72-86. (CIAT Publication, 259).

BOLINDER, M. A.; ANGERS, D. A.; GIROUX, M. Estimating C inputs retained as soil organic matter from corn (*Zea Mays* L.). **Plant and Soil**, Holanda, v. 25, p. 85-91, 1999.

BOWMAN, A. F. **Soils and greenhouse effect**. New York: John Wiley and Sons, 1990. 575 p.

BREMNER, E.; ELLERT, B. H.; JANZEN, H. H. Total and light-fraction carbon dynamics during four decades after cropping changes. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 59, p. 1398-1403, 1995.

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

BUURMAN, P.; VAN LAGEN, B.; PICCOLO, A. Increase in stability against thermal oxidation of soil humic substances as a result of self association. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 33, p. 367-381, 2002.

CAMBARDELLA, C. A.; ELLIOT, E. T. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 56, p. 777-783, 1992.

CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological spectroscopy**. Menlo Park: Benjamin/Cumming, 1984. 404 p.

CANZIANI, O. F.; DÍAZ, S.; CALVO, E.; CAMPOS, M.; CARCAVALLO, R.; CERRI, C. C.; GAY-GARCIA, C.; MATA, L. J.; SAIZAR, A.; ACEITUNO, P.; ANDRESSEN, R.; BARROS, V.; CBIDO, M.; FUENZALIDA-PINCE, H.; FUNES, G.; GALVÃO, C.; MORENO, A. R.; VARGAS, W. M.; VIGLIZAO, E. F.; DE ZUVIRÍA, M. Latin America. In: WATSON, R. T.; ZINYOWERA, M. C.; MOOSS, R. H. (Ed.). **The regional impact of climate change: an assessment of**

vulnerability. Cambridge: Cambridge University, 1998. p. 187-230.

CARVALHO, E. R.; MATIN-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**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 421-426, 2004.

CASTRO FILHO, C.; HENKLAIN, J. C.; VIEIRA, M. J.; CASÃO, R. Tillage methods and soil and water conservation in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 20, p. 271-283, 1991.

CHEN, J.; GU, B. H.; LEBOEUF, E. J.; PAN, H. J.; DAI, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. **Chemosphere**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 59-68, 2002.

CHESHIRE, M. V.; McPAHIL, D. B. Hyperfine splitting in the electron spin resonance solution spectra of humic substances. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 47, p. 205-213, 1996.

CHRISTENSEN, B. T. Carbon in primary and secondary organomineral complexes. In: CARTER, M. R.; STEWART, B. A. (Ed.). **Structure and organic matter storage in agricultural soils**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1996. p. 97-165.

CHRISTENSEN, B. T. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. **Advances in Soil Science**, New York, v. 20, p. 1-90, 1992.

COLE, C. V.; DUXBURY, J.; FRENEY, J.; HEINEMEYER, O.; MINAMI, K.; MOSIER, A.; PAUSTIAN, K.; ROSEMBERG, N.; SAMPSON, N.; SAUERBECK, D.; ZHAO, Q. Global estimates of potential mitigation of greenhouse gas emissions by agriculture. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 49, p. 221-228, 1997.

CONCEIÇÃO, P. C.; BAYER, C.; DIECKOW, J.; BOENI, M.; MIELNICZUK, J. Proteção Física da matéria orgânica em um argissolo vermelho subtropical. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA, 16., 2006, Aracaju. Novos desafios do carbono no manejo conservacionista. **Resumos...** Aracaju: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 1 CD-ROM. não paginado.

CONTE, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Distribution of a C-13-labelled hydrophobic tracer over humic fractions of different size and

composition. **Fresenius Environmental Bulletin**, [S. l.], v. 13, n. 3B, p. 238-243, 2004.

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

DALAL, R. C.; MAYER, R. J. Long-term trends in fertility of soils under continuous cultivation and cereal cropping in Southern Queensland. IV. Loss of organic carbon from different density fractions. **Australian Journal Soil Research**, Victoria, v. 24, p. 301-309, 1986.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. C. N e P na biomassa microbiana do Solo. In: CAMARGO, F. A. O.; SANTOS, G. A. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 389-411.

DICK, D. P., GONÇALVES, C. N.; DALMOLIN, R. S. D.; KNICKER, H.; KLAMT, E.; KÖGEL-KNABNER, I.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L. Characteristics of soil organic matter of different Brazilian Ferralsols under native vegetation as a function of soil depth. **Geoderma**, Amsterdam, v. 124, p. 319-333, 2005.

DIECKOW, J.; MIELNICZUK, J.; KNICKER, H.; BAYER, C.; DICK, D. P.; KOGEL-KNABNER I. Composition of organic matter in a subtropical Acrisol as influenced by land use, cropping and N fertilization, assessed by CPMAS C-13 NMR spectroscopy. **European Journal Soil Science**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 705-715, 2005.

ELLERT, B. H.; JANZEN, H. H. Short-term influence of tillage on CO₂ fluxes from a semi-arid soil on the Canadian prairies. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 50, p. 21-32, 1999.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1997. p. 85-87. (Embrapa Solos. Documentos, 1).

FEARNSIDE, P. M. Saving tropical forests as a global warming countermeasure: an issue that divides the environmental movement. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 39, p. 167-184, 2001.

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

FERREIRA, J. A.; MARTIN-NETO, L.; VAZ, C. M. P.; REGINATO, J. B. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted

from a typical Brazilian oxisol. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1665-1670, 2002.

FERREIRA, J. A.; NASCIMENTO, O. R.; MARTIN-NETO, L. Hydrophobic interactions between spin-label 5-SASL and humic acid as revealed by ESR spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 35, p. 761-765, 2001.

FISCHER, G.; VAN VELTHUIZEN, S. H. **Climate change and agricultural vulnerability**. Vienna: IIASA, 2002. 152 p.

FISHER, M. J.; RAO, I. M.; AYARZA, M. A.; LASCANO, C. E.; SANZ, J. I.; THOMAS, R. J.; VERA, R. R. Carbon storage by introduced deep-rooted grasses in the South American savannas. **Nature**, London, v. 371, p. 236-238, 1994.

FREITAS, P. L.; BLANCANEUX, P.; GAVINELLI, E.; L'ARRÉ-LARROUY, M. C.; FELLER, C. Nível e natureza do estoque orgânico de Latossolos sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 157-170, 1998.

FREIXO, A. A.; MACHADO, P. L. O. de A.; GUIMARÃES, C. M.; SILVA, C. A.; FADIGAS, F. S. Estoques de carbono e nitrogênio e distribuição de frações orgânicas de Latossolo do Cerrado sob diferentes sistemas de cultivo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 26, p. 425-434, 2002b.

FREIXO, A. A.; MACHADO, P. L. O. de A.; SANTOS, H. P. dos; SILVA, C. A., FADIGAS, F. S. Soil organic carbon and fractions of a Rhodic Ferralsol under the influence of tillage and crop rotation systems in Southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 64, p. 221-230, 2002a.

GARBIN, J. R.; MILORI, D. M. B. P.; SIMÕES, M. L.; SILVA, W. T. L.; MARTIN-NETO, L. Influence of humic substances on the photolysis of aqueous pesticide residues. **Chemosphere**, Oxford, v. 66, p. 1692-1698, 2007.

GARRITY, D.; FISHER, M. Beating the heat: climate change and the rural poor. In: **Workshop on Tropical Agriculture in Transition: Opportunities for Mitigating Greenhouse Gas Emissions**, Nov. 2001. Bonn. [S.l.: s. n.], 2001. Trabalho digitado.

GESSLER, P. E.; MOORE, I. D.; MCKENZIE, N. J.; RYAN, P. J. Soil-landscape modeling and spatial prediction of soil attributes. **International Journal of Geographic Information System**,

Basingstoke, v. 9, p. 421-32, 1996.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste, 1987.

GOLCHIN, A.; OADES, J. M.; SKJEMSTAD, J. O. Study of free and occluded particulate organic matter in soils by solid-state ¹³C NMR spectroscopy and scanning electron microscopy. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 32, p. 285-309, 1994.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L. A.; MILORI, D. M. B. P.; DE CAMARGO, O. A.; BERTON, R.; BETTIOL, W. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge-amended oxisols by electron paramagnetic resonance. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 91, issues, 1-2, p. 95-100, 2006b.

GONZALEZ-PEREZ, 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, C-13 NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, Amsterdam, v. 118, n. 3-4, p. 181-190, 2004.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MILORI, D. M. B. P.; COLNAGO, L. A.; MARTIN-NETO, L.; MELO, W. J. Study of organic matter in Brazilian Oxisol under different tillage systems by laser induced fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, Amsterdam, v. 138, p. 20-24, 2007.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L. A.; DE CAMARGO, O. A.; BERTON, R.; BETTIOL, W. Laser-induced fluorescence of organic matter from a Brazilian oxisol under sewage-sludge applications. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 269-275, 2006a.

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

HOUGHTON, J. An overview of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) and its process of science assessment. In: HESTER, R. E.; HARRISON, R. M. (Ed.). **Issues in environmental science and technology: global environmental change**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2002. p. 1-20.

HU, W.G.; MAO, J.; XING, B.; SCHMIDT-ROHR, K. Poly(methylene)

crystallites in humic substances detected by nuclear magnetic resonance. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 34, p. 530-534, 2000.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate Change 2001: the scientific basis**. Third Assessment Report. Disponível em: <http://www.ipcc.ch>. Acesso em 04.12.2006.

JANZEN, H. H.; CAMPBELL, C. A.; BRADT, S. A.; LAFOND, G. P.; TOWNLEY-SMITH, L. Light-fraction organic matter in soils from long-term crop rotations. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 1799-1806, 1992.

JEZERSKI, A.; CZECHOWSKI, F.; JERZYKIEWICZ, M.; GOLONKA, I.; DROZD, J.; BYLINSKA, E.; CHEN, Y.; SEAWARD, M. R. D. Quantitative EPR study on free radicals in the natural polyphenols interacting with metal ions and other environmental pollutants. **Spectrochimica Acta**. Part A, Molecular And Biomolecular Spectroscopy, Amsterdam, v. 58, n. 6, p. 1293-1300, 2002.

JEZERSKI, S.; CZECHOWSKI, F.; JERZYKIEWICZ, M.; DROZD, J. EPR investigations of structure of humic acids from compost, soil, peat and soft brown coal upon oxidation and metal uptake. **Appl. Mag. Res.**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 127-136, 2000.

JOBBAGY, E. G.; JACKSON, R. B. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. **Ecological Applications**, Arizona, v. 10, n. 2, p. 423-436, 2000.

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

KIRSCHBAUM, M. U. F. Will changes in soil organic carbon act as a positive or negative feedback on global warming? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 48, n. 1, p. 21-51, 2000.

KNICKER, H.; ALMENDROS, G.; GONZALES-VILA, F.-J.; MARTIN, F.; LUDEMANN, H. D. ¹³C and ¹⁵N-NMR spectroscopic examination of the transformation of organic nitrogen in plant biomass during thermal treatment. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 28, p. 1053-1060, 1996.

KNOWLES, P. F.; MARSH, D.; RATTLE, H. W. E. **Magnetic resonance of biomolecules**. New York: John Wiley & Sons, 1976. 343 p.

LAL, R. Residue management, conservation tillage and soil restoration

for mitigating greenhouse effect by CO₂-enrichment. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 43, p. 81-107, 1997.

LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science**, Washington DC, v. 304, n. 5677, p. 1623-1627, 2004.

LAL, R. Word soils and the greenhouse effect. **Global Change Newsletter**, Stockholm, v. 37, p. 4-5, Mar., 1999.

LAL, R.; KIMBLE, J. M. Conservation tillage for carbon sequestration. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 49, p. 243-253, 1997.

LAL, R.; KIMBLE, J. M.; FOLLETT, R. F.; COLE, C. V. **The potential of U.S cropland to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect**. Chesea, MI: Sleeping Bear Press, 1998. 1 v.

LARNEY, F. J.; BREMER, E.; JANZEN, H. H.; JOHNSTON, A. M.; LINDALL, C. W. Changes in total, mineralizable and light fraction soil organic matter with cropping and tillage intensities in semiarid southern Alberta, Canada. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 42, p. 229-240, 1997.

LEITE, L. F. C.; MENDONÇA, E. D.; MACHADO, P. L. O. D.; FERNANDES, E. I.; NEVES, H. C. L. Simulating trends in soil organic carbon of an Acrisol under no-tillage and disc-plow systems using the Century model. **Geoderma**, Amsterdam, v. 120, n. 3-4, p. 283-295, 2004.

LICHTFOUSE, É.; DOU, S.; GIRARDIN, C.; GRABLY, M.; BALESSENT, J.; BEHAR, F.; VANDENBROUCKE, M. Unexpected ¹³C-enrichment of organic components from wheat crop soils: evidence for the *in situ* origin of soil organic matter. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 23, p. 865-868, 1995.

LLOYD, J. R.; SOLE, V. A.; VAN PRAAGH, C. V. G.; LOVLE, Y. D. R. Direct and Fe(II)-mediated reduction of technetium by Fe(III)-reducing bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3743-3749, 2000.

LOVLEY, E. R.; COATES, J. D.; BLUNT-HARRIS, E. L.; PHILLIPS, E. J. P.; WOODWARD, J. C. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. **Nature**, London, v. 382, p. 445-448, 1996.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: pesquisa para

o desenvolvimento sustentável. In: SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSISTEMAS BRASILEIROS: PESQUISA PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1995. p. 28-62.

MACHADO, P. L. O. D.; GERZABEK, M. H. Soil aluminum extraction methods in relation to plant aluminum and yield on austrian and brazilian soils. **Communications in soil science and plant analysis**, New York, v. 24, n. 19-20, p. 2661-2677, 1993.

MACHADO, P. L. O. de A. **Mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL): funcionamento, pontos críticos e possibilidades para alguns sistemas agrícolas no Brasil**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2002. 28 p. (Embrapa Solos. Documentos, 41).

MAO, J.-D.; SCHMIDT-ROHR, K. Accurate quantification of aromaticity and nonprotonated aromatic carbon fraction in natural organic matter by C-13 solid-state nuclear magnetic resonance. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 38, n. 9, p. 2680-2684, 2004b.

MAO, J.-D.; SCHMIDT-ROHR, K. Separation of aromatic carbon C-13 NMR signals from di-oxygenated alkyl bands by a chemical-shift-anisotropy. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 36-45, 2004a.

MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A. E.; TRAGHETTA, D. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol. **Soil Science**, Baltimore, v. 157, n. 6, p. 365-372, 1994b.

MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O. R.; TALAMONI, J.; POPPI, N. R. EPR of micronutrients- humic substances complexes extracted from brazilian soil. **Soil Science**, Baltimore, v. 151, n. 5, p. 369-376, 1991.

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

MARTIN-NETO, L.; TRAGHETTA, D. G.; VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; SPOSITO, G. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30, p. 520-525, 2001.

MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, E. M.; SPOSITO, G. Mechanism of

atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 28, n. 11, p. 1867-1873, 1994a.

McBRIDE, M. Transition metal bonding in humic acid: na ESR study. **Soil Science**, Baltimore, v. 126, p. 200-209, 1978.

MILORI, D. M. B. P.; BAYER, C.; BAGNATO, V. S.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Fluorescence spectroscopy as alternative approach to study humification degree in soil humic acids. In: INTERNATIONAL MEETING OF THE INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY-IHSS, 10., 2000, Toulouse, France. Entering the third millenium with a common approach to humic substances and organic matter in water, soil and sediments: proceedings... [S.l.]: IHSS, 2000. v.1, p. 97-100.

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**, Madison, v. 70, p. 57-63, 2006.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acid determined by fluorescence spectroscopy. **Soil Science**, Baltimore, v. 167, n.11, p. 739-749, 2002.

MOREIRA, S. G.; PROCHNOW, L. I.; KIEHL, J. C.; MARTIN-NETO, L.; PAULETTI, V. Formas químicas, disponibilidade de manganês e produtividade de soja em solos sob semeadura direta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 30, p. 121-136, 2006.

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Method of soil analysis**. 2. ed. Madison: Soil Science Society of Agronomy, 1986. pt. 2: Chemical and microbiological properties.

NOGUEIRA, S.; LOPES, R. J. Protocolo de Kyoto começa a vigorar hoje. **Folha de S. Paulo**, São Paulo, 16 fev. 2005. Folha Ciência, p. A15-16.

NOVOTNY, E. H.; MANTOVANI, E. C.; BONAGAMBA, T. J.; AZEVEDO, E. R de; CRUZ, J. C.; BENITES, V. M. **Aplicação de Novas Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido como Metodologia para o Estudo da Matéria Orgânica Ambiental: Quantificação de Estruturas Aromáticas Condensadas**. Sete Lagoas:

Embrapa Milho e Sorgo, 2004 (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

NOVOTNY, E. H.; MARTIN-NETO, L. Effects of humidity and metal ions on the free radicals analysis of peat humus. **Geoderma**, Amsterdam, v. 106, p. 305-317, 2002.

OLK, D. C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Decrease in humification of organic matter with intensified lowland rice cropping: a wet chemical and spectroscopic investigation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 1337-1347, 2000.

OLK, D. C.; CASSMAN, K. G.; SCHMIDT-ROHR, K.; ANDERS, M. M.; MAO, J. D.; DEENIK, J. L. Chemical stabilization of soil organic nitrogen by phenolic lignin residues in anaerobic agroecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 38, n. 11, p. 3303-3312, 2006.

OPELLA, S. J.; FREY, M. H.; CROSS, T. A. Selection of nonprotonated carbon resonances in solid-state nuclear magnetic resonance. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 101, p. 5854-5856, 1979.

PACIOLLA, M. D.; KOLLA, S.; JANSEN, S. A. The reduction of dissolved iron species by humic acid and subsequent production of reactive oxygen species. **Advances in Environmental Research**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 169-178, 2002.

PAUSTIAN, K.; ANDREN, O.; JANZEN, H. H.; LAL, R.; SMITH, P.; TIAN, G.; TIESSEN, H.; NOORDWIJK, M. van; WOOMER, P. L. Agricultural soils as a sink to mitigate CO₂ emissions. **Soil Use & Management**, Oxford, v. 13, p. 230-244, 1997.

PEERSEN, O. B.; WU, X.; KUSTANOVICH, I.; SMITH, S. O. Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. **Journal Of Magnetic Resonance**, Series A., San Diego, v. 104, p. 334-339, 1993.

PEREIRA, M. H. The second green revolution. In: SATURNINO, H. M.; LANDERS, J. N. (Ed.). **The environment and zero tillage**. Brasília: Associação de Plantio Direto no Cerrado, 2002. p. 27-30.

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

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

PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular Size of Humic Substances.

Supramolecular Associations Versus Macromolecular Polymers. **Advances in Environmental Research**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 508-521, 2000.

PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; HABERHAUER, G.; GERZABEK, M. H. Increased sequestration of organic carbon by hydrophobic protection. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 86, p. 496-499, 1999.

PILLON, C. N. **Alterações no conteúdo e qualidade da matéria orgânica do solo induzidas por sistemas de culturas**. 2000. 214 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

POOLE JÚNIOR, C. P. **Electron spin resonance: a comprehensive treatise on experimental techniques**. New York: Wiley-Interscience, 1967. 921 p.

POST, W. M.; KING, A. W.; WULLSCHLEGER, S. D. Historical variations in terrestrial biospheric carbon storage. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 11, p. 99-109, 1997.

POST, W. M.; KWON, K. C. Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. **Global Change Biology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 317-328, 2000.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTIENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 159-164, 1987.

PRESTON, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, n. 3, p. 145-166, 1996.

PRESTON, C. M.; NEWMAN, R. H.; ROTHER, P. Using ¹³C CPMAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. **Soil Science**, Baltimore, v. 157, p. 26-35, 1994.

PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A. C. Necessidade de monitoramento da lixiviação do cálcio, de calcário aplicado na superfície, em pastagens manejadas intensivamente, como suporte à agropecuária de precisão. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, 1., 27-29 nov. 1996, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA-CNPDA; Brasília: EMBRAPA-SPI, 1997. p. 433-439.

PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A. C.; CAMARGO, A. C. de. Competição intra e interespecífica de forrageiras, em sistemas intensivos de produção de bovinos: cuidados para a sustentabilidade. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 74, n. 1, p. 55-68, jun. 1999.

PRYOR, W. A. (Ed.). **Free radicals in Biology**. 1st ed. New York: Academic Press, 1976. v. 1. cap. 3,5.

RESCK, D. V. S.; PEREIRA, J.; SILVA, J. E. **Dinâmica da matéria orgânica na região dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA/CPAC, 1991. 22 p. (EMBRAPA/CPAC. Documentos, 36).

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

ROSA, A. H.; SIMÕES, M. L.; DE OLIVEIRA, L. C.; ROCHA, J. C.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D. M. B. P. Multimethod study of degree humification of humic substances extracted from different tropic soils profiles in Brazil's Amazonian region. **Geoderma**, Amsterdam, v. 127, n. 1-2, p. 1-10, 2005.

ROSENZWEIG, C.; HILLEL, D. Soils and global climate change: Challenges and opportunities. **Soil Science**, Baltimore, v. 165, n. 1, p. 47-56, 2000.

SÁ, J. C. M. **Dinâmica da Matéria Orgânica do Solo em Sistemas de Manejo Convencional e Plantio Direto**. 2001. 141 f. Tese (Doutorado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SAAB, C. S.; MARTIN-NETO, L. Use of the EPR technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 497-498, 2003.

SAAB, S. C.; MARTIN-NETO, L. Studies of semiquinone free radicals by ESR in the whole soil, HA, FA and humin substances. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 34-37, 2004.

SALA, O.; PARTON, W. J.; JOYCE, L.; LAUENROTH, W. K. Primary production of the central grassland region of the United States. **Ecology**, Durham, v. 69, p. 40-45, 1988.

SAMPSON, R. N.; SCHOLLES, R. J. Additional human-induced activities. In: WATSON, R. T.; NOBLE, I. R.; BOLIN, B.; RAVINDRANATH, N. H.; VERARDO, D. J.; DOKKEN, D. J. (Ed.).

Land use, land-use change, and forestry. Cambridge: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2000. p. 181-182. Article 3.4.

SANTOS, F. S.; BERNARDI, A. C. C.; MACHADO, P. L. O. A. Métodos de preparo e determinação de carbono orgânico de solos tropicais. In: REUNIAO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 25.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 9.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 7.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 4., 8 – 13 set. 2002, Rio de Janeiro, RJ. FERTIBIO 2002. [Anais...]. Rio de Janeiro: SBCS; SBM, 2002. 1 CD-ROM.

SCHLESINGER, W. H. **Biogeochemistry**: an analysis of global change. San Diego: Academic Press, 1991. 368 p.

SCHNITZER, M.; LEVESQUE, M. Electron spin resonance as a guide to the degree of humification of peats. **Soil Science**, Baltimore, v. 127, n. 3, p. 140-145, 1979.

SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M.; IMBODEN, D. M. **Environmental Organic Chemistry**. New York: J. Wiley, 1992. 681 p.

SENESE, N. Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. **Advances in Soil Science**, [S. l.], v. 14, p. 77-130, 1990a.

SENESE, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part I. The electron spin resonance approach. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 232, p. 51-75, 1990b.

SILVA, C. A.; ANDERSON, S. J.; VALE, F. R. Carbono, nitrogênio e enxofre em frações granulométricas de dois latossolos submetidos à calagem e adubação fosfatada. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Campinas, v. 23, p. 593-602, 1999.

SILVA, J. E.; RESCK, D. V. S. Matéria orgânica do solo. In: VARGAS, M. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 465-524.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5th ed. New York: Wiley, 1991.

SIMÕES, M. L. **Estudos de interações hidrofóbicas em substâncias**

húmicas e componentes do solo utilizando análises espectroscópicas.

2005. 147 f. Tese (Doutorado) – Ciência e Engenharia de Materiais-EESC/IFSC/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos.

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

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**, Berlin, v. 89, p. 84-88, 2002.

SINGER, L. S. Synthetic ruby as a secondary standard for the measurement of intensities in electron paramagnetic resonance. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 30, p. 1463-1464, 1959.

SIX, J.; ELLIOTT, E. T.; PAUSTIAN, K. Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-tillage systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 63, p. 1350-1358, 1999.

SIX, J.; ELLIOTT, E. T.; PAUSTIAN, K. Soil macro aggregate turnover and micro aggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 2099-2103, 2000.

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

SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; CONTE, P.; HABERHAUER, G.; GERZABEK, M. H. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 34, n. 12, p. 1839-1851, 2002.

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

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the new view. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 39, n. 23, p. 9009-9015, 2005.

THENG, B. K. G.; TATE, K. R.; SOLLINS, P. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: COLEMAN, D. C.; OADES, J. M.; UEHARA, G. **Dynamics of soil organic matter in tropical**

ecosystems. Honolulu: University of Hawaii, 1989. cap. 1. p. 5-32.

VAZ, C. M. P.; NAIME, J. M.; MACEDO, A. Soil particle size fractions determined by gamma-ray attenuation. **Soil Science**, Baltimore, v. 164, p. 403-410, 1999.

WATANABE, A.; MCPHAIL, D. B.; MAIE, N.; KAWASAKI, S.; ANDERSON, H. A.; CHESHIRE, M. V. Electron spin resonance characteristics of humic acids from a wide range of soil types, **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 981-990, 2005.

WATSON, R. T.; NOBLE, I. R.; BOLIN, B.; RAVINDRANATH, N. H.; VERARDO, D. J.; DOKKEN, D. J. **Land use, land-use change and forestry: a special report of the IPCC**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 377 p.

WEIL, J. A.; BOLTON, J. R.; WERTZ, J. E. **Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications**. New York: Wiley, 1994. 568 p.

WERSHAW, R. L.; LEENHEER, A.; KENNEDY, K. R. Use of ¹³C NMR and FTIR for elucidation of degradation pathways during natural litter decomposition and composting. I. early stage leaf degradation. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, n. 10, p. 667-679, 1996.

WIKANDER, G.; NORDEN, B. Investigations of paramagnetic species in peat. **Soil Science**, Baltimore, v. 145, n. 4, p. 289-297, 1988.

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

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

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