

ETELVINO HENRIQUE NOVOTNY

EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração "Ciência do Solo", Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Antonio Sálvio Mangrich

CURITIBA

1997



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO
C.P. 2369, FONE 041-2545464 R157, FAX 041-2523689 CURITIBA PR 80.035-050
E-mail: pgcisolo@agrarias.ufpr.br

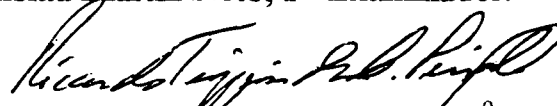
PARECER

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pelo candidato **E TELVINO HENRIQUE NOVOTNY**, com o título: **"Extração, fracionamento e caracterização espectroscópica da matéria orgânica do solo"** para obtenção do grau de Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, são de Parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação com média 10,0(dez) - conceito **"A"** completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de **Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo"**.

Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", em Curitiba 30 de outubro de 1997.


Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich, Presidente.


Dr. Ladislau Martin Neto, Iº Examinador.


Engo. Agro. Dr. Ricardo Trippia dos Guimarães Peixoto, IIº Examinador.



Só quando podemos desenvolver plenamente as possibilidades que nos são inerentes é que podemos viver como pessoas livres.

Baruch Spinoza

Aos meus pais, a quem tudo devo e sou grato, pelo exemplo que me ofereceram e pelo bem mais precioso que um ser humano pode ambicionar, a liberdade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração "Ciência do Solo", da Universidade Federal do Paraná, Institut für Bodenforschung, Universität für Bodenkultur e Forschungszentrum Seibersdorf, pela acolhida e contribuição para a formação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Österreichische Akademische Austauschdienst (ÖAD) pelas bolsas de mestrado e pesquisador visitante concedidas.

Aos docentes do curso de pós-graduação, por me ensinarem a aprender.

Aos funcionários do Departamento de Solos e do Forschungszentrum Seibersdorf, pelo auxílio prestado à realização deste trabalho.

Ao agricultor Franke Dijkstra, grande entusiasta do plantio direto no Brasil, pela concessão da área para coleta das amostras.

Ao Costa, grande amigo e conselheiro, e Hugo pelo auxílio na coleta das amostras.

À Márcia e Juca pelas informações à respeito da caracterização das áreas experimentais.

Ao Professor Blum, Axel e Martin pela excelente acolhida em Viena e importantes contribuições à formação científica.

Ao Professor Ottner e Adel pela disposição e auxílio nas análises mineralógicas.

À Professora Beatriz pelas revisões do manuscrito e sugestões.

Ao Professor Mangrich, o qual tenho por modelo de pesquisador e docente, pela orientação, amizade, confiança e entusiasmo.

Ao Professor Antonio Carlos, outro importante referencial, pela grande amizade, disposição e valiosas sugestões, enfim, o "primeiro orientador" a gente não esquece.

Ao Dinis e Ricardo, pelo enorme auxílio, sugestões, críticas e especialmente pelas calorosas e divertidas discussões sobre temas aparentemente áridos.

Ao Enzo pelos deliciosos "Spaghetti" regados à amizade fraterna e discussões nem sempre só científicas.

À Mirta, Hans, Jorge, Mustafa, Anabel, Lukas e Fried pela amizade "cosmopolita", companherismo e excelentes recordações da Áustria.

À Nerilde, Maurício e Paulo, muito mais que colegas de curso, por terem contribuído para tornar o período de mestrado num evento muito agradável.

À Professoras Shirley, Sueli e Maria pela disposição e auxílios prestados.

Ao Tessaro, Angelo, Didio, Ademir, Elisete, Sônia, Lenise, Jeane, Cláudia e Marcus pelo agradável convívio.

À minha mãe, porto seguro, pelo enorme apoio e abnegação para que nós pudéssemos ser o que somos.

E especialmente à Marcia, grande companheira e apoio nos momentos difíceis e com quem tive a oportunidade de compartilhar alguns dos melhores momentos de minha vida, pelas revisões do manuscrito, sugestões e principalmente pela compreensão e tolerância inestimáveis.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
APRESENTAÇÃO.....	xviii

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 <u>INTRODUÇÃO</u>	1
I.2 <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	3
I.2.1 O PLANTIO DIRETO.....	3
I.2.2 UM BREVE HISTÓRICO DO PLANTIO DIRETO.....	4
I.2.3 A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE).....	5
I.2.3.1 O Hamiltoniano de spin.....	8
I.2.3.2 A interação eletrônica Zeeman.....	9
I.2.3.3 A interação nuclear hiperfina.....	14
I.2.3.4 Regras de seleção.....	15
I.2.3.5 A separação de campo zero (interação fina).....	16
I.2.4 A MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO.....	16
I.3 <u>OBJETIVOS</u>	24

CAPÍTULO II: DESCRIÇÃO DAS ÁREAS ESTUDADAS, METODOLOGIA DE
AMOSTRAGEM E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

II.1 <u>LOCALIZAÇÃO, DESCRIÇÃO E HISTÓRICO DAS ÁREAS</u>	25
II.1.1 ÁREA SOB PLANTIO DIRETO, CULTIVO MÍNIMO E REFLORESTAMENTO COM EUCALIPTO (PONTA GROSSA - PR).....	26
II.1.2 ÁREA SOB CAMPO NATIVO (TIBAGI - PR).....	27
II.2 <u>COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO E ANÁLISES DE ROTINA</u>	29
II.3 <u>ANÁLISE MINERALÓGICA</u>	30
II.3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
II.3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	31
II.3.3 ESPECTROSCOPIA DE IVTF.....	34
II.3.4 ESPECTROSCOPIA DE RPE.....	35
II.4 <u>ANÁLISE FATORIAL</u>	38
II.4.1 METODOLOGIA.....	38
II.4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

CAPÍTULO III: RESPOSTA DO HÚMUS DO SOLO EXTRAÍDO POR PIROFOSFATO DE
SÓDIO E FRACIONADO POR CE-VPC A DIFERENTES
SISTEMAS DE MANEJO DO SOLO

III.1 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	44
III.2 <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	48
III.2.1 EXTRAÇÃO E CROMATOGRAFIA DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO.....	48

III.2.2 ESPECTROSCOPIA DE IVTF E CONTAMINANTES DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	59
III.3 <u>CONCLUSÕES</u>	62
 <u>CAPÍTULO IV: UM NOVO MÉTODO PARA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO POR TAMANHO MOLECULAR DO HÚMUS DO SOLO</u>	
IV.1 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	64
IV.2 <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	67
IV.3 <u>CONCLUSÕES</u>	75
 <u>CAPÍTULO V: ESPECTROSCOPIA DE IVTF E RPE DO HÚMUS FRACIONADO EM VIDRO DE POROSIDADE CONTROLADA</u>	
V.1 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	76
V.2 <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	77
V.3 <u>CONCLUSÕES</u>	86
 <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	 88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	REMOÇÃO DA DEGENERESCÊNCIA DOS ESTADOS DE SPINS POR UM CAMPO MAGNÉTICO (EFEITO ZEEMAN)	7
2	PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA E TEMPERATURAS MÍNIMA E MÁXIMA DIÁRIAS OBSERVADAS NO MUNICÍPIO DE PONTA GROSSA.....	27
3	PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA E TEMPERATURAS MÍNIMA E MÁXIMA DIÁRIAS OBSERVADAS NO MUNICÍPIO DE TIBAGI.....	28
4	DIFRATOGRAMA DAS AMOSTRAS DE SOLO PROVENIENTES DE PONTA GROSSA E TIBAGI, AMOSTRA NÃO ORIENTADA.....	31
5	DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA DE ARGILA PROVENIENTE DE PONTA GROSSA, AMOSTRA ORIENTADA.....	32
6	DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA DE ARGILA PROVENIENTE DE TIBAGI, AMOSTRA ORIENTADA.....	33
7	ESPECTRO DE IVTF NA REGIÃO DE 3750 A 3300 cm^{-1} DAS AMOSTRAS DE ARGILAS PROVENIENTES DE PONTA GROSSA E TIBAGI.....	34
8	ESPECTRO DE RPE DAS AMOSTRAS DE ARGILAS PROVENIENTES DE PONTA GROSSA E TIBAGI. POTÊNCIA DE MICROONDAS: 2 mW (20dB), VARREDURA DE CAMPO: 5000 G, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 1 G, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K).....	35
9	ESPECTRO DE RPE DA AMOSTRA DE ARGILA PROVENIENTE DE TIBAGI. POTÊNCIA DE MICROONDAS: 20 mW (10dB), VARREDURA DE CAMPO: 150 G, REGIÃO DE $g = 2$, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 2 G, TEMPERATURA: 300 E 77 K.....	37
10	FATOR ESCORE CULTIVO CALCULADO À PARTIR DOS DADOS DAS ANÁLISES GRANULOMÉTRICA E QUÍMICA DE ROTINA, EXTRAÇÃO DOS FATORES PELO MÉTODO DE KAISER, ROTAÇÃO VARIMAX NORMALIZADA.....	42

11	FATOR ESCORE MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO (MOS) CALCULADO À PARTIR DOS DADOS DAS ANÁLISES GRANULOMÉTRICA E QUÍMICA DE ROTINA, EXTRAÇÃO DOS FATORES PELO MÉTODO DE KAISER, ROTAÇÃO VARIMAX NORMALIZADA.....	43
12	ABSORBÂNCIA EM 400 nm POR GRAMA DE SOLO DO HÚMUS EXTRAÍDO POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	49
13	ABSORBÂNCIA EM 400 nm POR GRAMA DE CARBONO ORGÂNICO DO HÚMUS EXTRAÍDO POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	49
14	RELAÇÃO E ₄ /E ₆ DO HÚMUS EXTRAÍDO POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	50
15	CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g ⁻¹ DE SOLO DO AH CINZA EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	51
16	CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g ⁻¹ DE SOLO DO AH MARROM EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	53
17	CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g ⁻¹ DE SOLO DO AF EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	53
18	VALORES MÉDIOS DA RELAÇÃO E ₄ /E ₆ DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS SH EXTRAÍDAS POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹ DE TODAS AS AMOSTRAS.....	54
19	CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g ⁻¹ DE SOLO DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	55
20	RELAÇÃO AF/AH DO HÚMUS EXTRAÍDO POR Na ₄ P ₂ O ₇ A 0,02 mol L ⁻¹	57
21	ESPECTRO DE IVTF DE AMOSTRAS DE PIROFOSFATO E BORATO DE SÓDIO.....	60

22	ESPECTROS DE IVTF DA FRAÇÃO MACRO-HÚMICA, CENTRIFUGADA E TRATADA COM HCl, EXTRAÍDA DA AMOSTRA REFLORESTAMENTO (10-20 cm) POR PIROFOSFATO E FRACIONADA COM ELUENTE BORATO/NaCl.....	61
23	CROMATOGRAMAS EM ABS. (465 nm) g^{-1} DE SOLO E $\hat{E}_{1cm}^{1mgL^{-1}C}$ DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	70
24	CROMATOGRAMA EM $\hat{E}_{1cm}^{1mgL^{-1}C}$ E DECONVOLUÇÃO DO TERCEIRO PICO DO CROMATOGRAMA EM ABS. (465 nm) g^{-1} DE SOLO DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	71
25	CROMATOGRAMAS DA RELAÇÃO E_4/E_6 DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) POR PIROFOSFATO A $0,02 mol L^{-1}$, RESINA E RESINA/ULTRA-SOM.....	73
26	ESPECTROS NA REGIÃO DO VÍSEL DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE SH EXTRAÍDAS DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0 - 5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	74
27	ESPECTROS DE IVTF DA FRAÇÃO A EXTRAÍDA DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	77
28	ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	78
29	ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA REFLORESTAMENTO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	78
30	ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA PLANTIO DIRETO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	79
31	ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CULTIVO MÍNIMO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	79

32	ESPECTRO DE RPE DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM. POTÊNCIA DE MICROONDAS: 2 mW (20dB), VARREDURA DE CAMPO: 5000 G, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 10 G, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K).....	82
33	ESPECTRO DE RPE, COM VARIAÇÃO DA AMPLITUDE DE MODULAÇÃO, DA FRAÇÃO A DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) POR PIROFOSFATO A 0,02 mol L ⁻¹ . SEGUNDA DERIVADA, POTÊNCIA DE MICROONDAS: 10,1 mW (13dB), VARREDURA DE CAMPO: 50 G, REGIÃO DE g = 2, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K).....	83
34	ESPECTRO DE RPE DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM. SEGUNDA DERIVADA, POTÊNCIA DE MICROONDAS: 10,1 mW (13 dB), VARREDURA DE CAMPO: 50 G, REGIÃO DE g = 2, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 4 G, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K).....	84
35	ESTUDO DA VARIAÇÃO DE POTÊNCIA EFETUADO NA FRAÇÃO A DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM.....	85

LISTA DE TABELAS

1	NUTRIENTES APLICADOS POR ANO ENTRE 1991 E 1996 NAS ÁREAS CULTIVADAS.....	26
2	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS ARGILO-MINERAIS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....	33
3	ANÁLISE QUÍMICA DE ROTINA E CONTEÚDO DE ARGILA DOS SOLOS ESTUDADOS.....	40
4	CARREGAMENTOS DOS FATORES CALCULADOS À PARTIR DAS ANÁLISES GRANULOMÉTRICA E QUÍMICA DOS SOLOS, EXTRAÇÃO DOS FATORES PELO MÉTODO DE KAISER, ROTAÇÃO VARIMAX NORMALIZADA.....	41

5	RELAÇÃO E_4/E_6 DAS SH EXTRAÍDAS DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20-50 cm) POR PIROFOSFATO E FRACIONADAS QUIMICAMENTE, FISICAMENTE POR CE-VPC E AMBOS OS MÉTODOS SEQUENCIALMENTE.....	52
6	PARÂMETROS AJUSTADOS DA DECONVOLUÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DO HÚMUS EXTRAÍDO POR PIROFOSFATO.....	55
7	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AJUSTADOS DA DECONVOLUÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DO HÚMUS EXTRAÍDO POR PIROFOSFATO E OS ESCORES FATORIAIS DA ANÁLISE FATORIAL.....	56
8	VALORES E_4 E E_6 E DA RELAÇÃO E_4/E_6 DAS FRAÇÕES HÚMICAS DA AMOSTRA REFLORESTAMENTO (10-20 cm) APÓS SUCESSIVAS CENTRIFUGAÇÕES.....	60
9	ANÁLISE COLORIMÉTRICA DO HÚMUS (Hu) E DOS ÁCIDOS HÚMICO (AH) E FÚLVICO (AF) OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	68
10	PARÂMETROS AJUSTADOS DA DECONVOLUÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DO HÚMUS EXTRAÍDO POR DIFERENTES MÉTODOS.....	72
11	RELAÇÃO E_4/E_6 DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS SH EXTRAÍDAS POR PIROFOSFATO, RESINA E RESINA/ULTRA-SOM.....	73
12	VALORES-g DOS RADICAIS LIVRES DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	86

RESUMO

A matéria orgânica de dois latossolos vermelho-escuro, um deles sob campo nativo e outro submetido a um experimento comparativo entre sistemas de preparo do solo de longo tempo (19 anos), incluindo plantio direto, cultivo mínimo e adicionalmente um reflorestamento com Eucalipto, foi extraída por pirofosfato de sódio, fracionada e analisada por cromatografia de exclusão em vidro de porosidade controlada (CE-VPC). Os cromatogramas obtidos foram analisados matematicamente (deconvolução) e a análise estatística dos dados foi feita usando métodos multivariados (análise fatorial e correlação de Pearson). O cultivo levou à uma diminuição no conteúdo de substâncias húmicas, porém não afetou significativamente o conteúdo de C orgânico. O cultivo provocou um aumento na proporção relativa de substâncias húmicas de menor tamanho molecular, determinada por cromatografia, e pela relação ácido fúlvico/ácido húmico. Isto pode ser devido à degradação preferencial de substâncias húmicas grandes ou à neo-síntese de substâncias húmicas pequenas devido à maior entrada de resíduos vegetais, promovida pela fertilização e calagem deste solo inicialmente pobre. O método empregado permitiu a separação do ácido húmico cinza em duas frações distintas, e a fração com maior tamanho molecular apresentou um valor alto, incomum, para a relação E_4/E_6 que é atribuído à uma pequena conjugação dos anéis aromáticos. As análises por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) das frações cromatográficas obtidas foram dificultadas pelo alto conteúdo de sais inorgânicos provenientes do extrator (pirofosfato) e da solução eluente (borato), porém pôde-se observar que o tratamento ácido das substâncias húmicas até pH 2, procedimento rotineiro no método clássico de extração e fracionamento químico, leva à alterações destas. Desenvolveu-se um novo método para extração e fracionamento físico (cromatográfico) da matéria orgânica do solo utilizando-se resina de troca catiônica após a dispersão dos colóides do solo por vibração ultra-sônica (resina/ultra-som). Este estudo foi feito comparativamente, extraíndo-se a matéria orgânica do solo com pirofosfato, resina e resina/ultra-som. Os extratos foram analisados e fracionados em classes de tamanho molecular, por CE-VPC,

utilizando-se uma solução de bicarbonato de potássio a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ como eluente. O método para a obtenção do cromatograma em absorvidade, estimada pela absorbância no ultravioleta, produziu resultados similares aos de medidas da concentração de C orgânico por técnicas destrutivas apresentados na literatura. O tratamento com ultra-som produziu substâncias húmicas de maior pureza em relação à extração com pirofosfato ou resina sem este pré-tratamento. O pirofosfato foi o extrator mais eficiente, seguido por resina/ultra-som e a eficiência deste método aumentou no solo mais argiloso. Os espectros de ultravioleta-visível das duas primeiras frações cromatográficas de maior tamanho molecular, obtidas dos extratos de todas as amostras e extratores estudados, apresentaram bandas largas de absorção centradas em 470 nm que podem ser atribuídas aos compostos do tipo das hidroxiantraquinonas e que contribuíram para o alto valor da relação E_4/E_6 da fração de maior tamanho molecular, pois nesta fração esta banda foi mais intensa. A extração da matéria orgânica do solo por resina/ultra-som e seu fracionamento cromatográfico é um método adequado para análise e fracionamento das substâncias húmicas em classes de tamanho molecular e o uso de bicarbonato de potássio como eluente, seguido pela transformação deste em cloreto de potássio pela acidificação até pH 4 com ácido clorídrico, evita a contaminação das substâncias húmicas fracionadas com o extrator e o tampão utilizado para a eluição. Logo, análises subsequentes por IVTF e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) das frações cromatográficas são possíveis. As frações do húmus, assim obtidas, apresentaram um alto conteúdo de polissacarídeos e baixo conteúdo de grupos carboxílicos/carboxilato, determinados por IVTF. Nas duas primeiras frações cromatográficas de maior tamanho molecular, caracterizadas pela banda larga centrada em 470 nm, apresentaram, adicionalmente ao sinal típico de semiquinonas, um sinal de RPE com valor g de 1,9989, largura de linha de 16 gauss e que não foi saturado mesmo com 200 mW de potência de microondas. Este sinal pode ser atribuído ao ânion ou cátion radical de hidroxiantrasemiquinonas.

ABSTRACT

The organic matter from two Brazilian Oxisols, one under an Eucalyptus forest and a long term (19 years) cultivated area (minimum tillage and no-tillage) and other soil under natural grassland, was extracted with sodium pyrophosphate, fractionated and analysed by exclusion chromatography on controlled pore glass (CPG). The resulting chromatograms were analysed mathematically (deconvolution) and the statistical evaluation of the data was done using the multivariate method (factor and Pearson correlation analysis). Tillage led to a decrease in the humic substances, but not in the total organic C content. Tillage induced an increase in the relative proportion of humic substances with larger molecular size, determined by chromatography, and for the fulvic acid/humic acid ratio. This can be due to either a preferential degradation of large humic substances or to the neo-synthesis of small humic substances due to the higher fresh-carbon input, promoted by fertilization and liming of this initially poor soil. The used method allowed the separation of gray humic acids in two distinct fractions, and the fraction with the larger molecular size showed an unusual higher E_4/E_6 ratio, which was explained by a small conjugation of aromatic rings. Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) analyses of the chromatographic fractions were hindered by the high content of the inorganic salts from the extractor (pyrophosphate) and of the elution solution (borate). Even so it could be observed that the acid treatment of the humic substances up to pH 2, which is a routine procedure in the classic method of extraction and chemical fractionation, led to their alterations. A new method was developed for extraction and physical fractionation (chromatographic) of the soil organic matter extracted by a chelating ion exchange resin after the soil colloids have been dispersed by ultrasonic vibration (resin/ultra-sound). This study was made comparatively, extracting the soil organic matter with pyrophosphate, resin and resin/ultra-sound. The extracts were fractionated according to their molecular size and analysed by CPG using 0.05 mol L^{-1} of potassium bicarbonate solution as eluent. The method for recording the chromatogram of the estimated absorptivity by ultraviolet absorbance yield a similar curve compared to the direct and destructive measuring of organic C as presented in the literature. The ultrasonic treatment

produced humic substances of higher purity than the pyrophosphate extraction and the resin extraction without pre-treatment. The pyrophosphate was the most efficient extractor proceeded by resin/ultra-sound, and the efficiency of this method increased in the soil with high clay contents. The ultraviolet-visible spectra of the first two chromatographic fractions of larger molecular size, obtained from the extracts of all the samples and extractors studied, presented broad absorption bands centred in 470 nm. This band can be attributed to compounds like hydroxyanthraquinone and that contributed to the high value of the E_4/E_6 ratio of the larger molecular size fraction, because in this fraction this band was more intense. The extraction of the soil organic matter by resin/ultra-sound and its chromatographic fractionation is a suitable method for humic substances analyses and fractionation into classes of molecular sizes. The use of KHCO_3 solution as eluent, followed by acidification up to pH 4 with HCl solution for transformation into KCl, prevented the contamination of the fractionated humic substances with the extractor and the buffer used for the elution. Therefore, subsequent FTIR and electron paramagnetic resonance (EPR) measurements in the chromatographic fractions are made possible. The chromatographic fractions of the humus presented a high polysaccharide content and low of carboxyl groups, determined by FTIR. The first two chromatographic fractions of larger molecular size, characterized by the broad band centred in 470 nm, showed, additional to the typical sign of semiquinone, a sign in g 1.9989 in the EPR spectrum, with a linewidth of 16 gauss that was not saturated even with 200 mW of microwave power. This sign can be attributed to the anion or cation radical of hydroxyanthrasemiquinone.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação envolve estudos relacionados ao efeito do cultivo na matéria orgânica do solo, aborda inclusive o desenvolvimento de um novo método de extração e fracionamento por cromatografia de exclusão da matéria orgânica do solo. Com a finalidade de torná-lo mais didático, este trabalho foi dividido em capítulos.

O capítulo I apresenta uma introdução geral do assunto em pauta e a revisão bibliográfica pertinente.

No capítulo II descreve-se os métodos utilizados para caracterização das amostras utilizadas, assim como uma rápida descrição das áreas estudadas e metodologia de amostragem.

O capítulo III trata da extração, quantificação e caracterização cromatográfica da matéria orgânica em caráter comparativo entre solos sob diferentes sistemas de manejo, empregando-se método anteriormente em uso nos laboratórios de Seibesdorf - Áustria, onde parte do trabalho foi realizado.

O capítulo IV refere-se ao desenvolvimento de um novo método para extração, caracterização cromatográfica e fracionamento do húmus do solo, visando a obtenção de amostras apropriadas para análises subsequentes, especialmente por espectroscopias de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

E o último capítulo trata especificamente dessas análises, efetuadas nas frações cromatográficas do húmus.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 INTRODUÇÃO

A necessidade de preservação ambiental tem sido enfatizada em diversas esferas de discussão e sua importância é inquestionável. A conservação do solo adotando-se práticas que reduzam a erosão hídrica e eólica é louvável e de extrema necessidade. Neste sentido o plantio direto, além de minimizar as perdas de solo, proporciona produtividades compatíveis com a crescente demanda alimentar da população e pode vir a reduzir também as perdas de matéria orgânica do solo minimizando a emissão de CO₂ à atmosfera.

A adoção de práticas conservacionistas, como o plantio direto, aproxima o agroecossistema da condição original e ideal que é o ecossistema natural, onde a ciclagem dos elementos e a participação da matéria orgânica do solo é decisiva para a sustentabilidade do sistema.

Diversos fatores de produção agrícola são controlados pela matéria orgânica do solo e logo sofrem a mesma variabilidade sendo de difícil quantificação e previsão. A importância da matéria orgânica do solo é tal que hoje já podemos considerá-la como um insumo essencial à produção agrícola. Entretanto, a enorme diversidade de materiais que dela fazem parte e a diversidade de condições ambientais, que são preponderantes na sua formação, levam à geração de um conjunto de compostos extremamente heterogêneo em composição e conseqüentemente nas suas propriedades químicas e físicas.

Cabe ressaltar que a agronomia, e em especial a ciência do solo, tem-se baseado em grande parte em resultados experimentais e semi-empíricos de difícil generalização. Há, assim, a necessidade de trabalhos que priorizem o entendimento dos conceitos básicos que regem o comportamento dos fatores de produção.

Uma das maiores dificuldades enfrentadas pelos cientistas de solos para o estudo do húmus é a necessidade da sua extração do solo, o que pode levar a alterações do material isolado. A procura do extrator ideal ainda está longe de se concluir, porém avanços na área de instrumentação e métodos analíticos tem possibilitado o estudo do húmus "in situ" ou seja sem a necessidade de isolá-lo dos constituintes minerais do solo. Mesmo assim na maioria dos casos ainda há a necessidade de estudar-se o húmus isoladamente, e de preferência devidamente fracionado em grupos o mais homogêneo possível.

Baseado no exposto pretende-se quantificar e caracterizar a matéria orgânica do solo, mais especificamente as substâncias húmicas (SH), em caráter comparativo entre os sistemas de cultivo do solo e áreas não cultivadas, assim como propor um novo método para extração e fracionamento do húmus tendo-se como meta principal minimizar as alterações do material obtido.

I.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.2.1 O PLANTIO DIRETO

O plantio direto é uma técnica de cultivo conservacionista onde procura-se manter o solo sempre coberto por resíduos vegetais, cobertura esta que tem por finalidade protegê-lo do impacto das gotas da chuva, do escoamento superficial e logo da erosão hídrica e também eólica. Existem diversos sinônimos ou termos equivalentes para plantio direto: plantio direto na palha, cultivo zero, sem preparo ("no-tillage"), cultivo reduzido entre outros. Efetivamente poderia-se considerar o plantio direto como um cultivo mínimo, visto que o preparo do solo limita-se a uma pequena área, procedendo-se o preparo do solo, semeadura, adubação e eventualmente aplicação de herbicidas a uma única operação. No plantio direto o distúrbio total do solo limita-se ao requerido para adequada colocação da semente (JONES et al., 1968) e do fertilizante.

Os efeitos deste sistema de cultivo nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo já foram reportados nos primeiros trabalhos científicos com esta técnica. A efetividade do plantio direto em: evitar o selamento superficial, decorrente do impacto das gotas de chuva, reduzir o escoamento superficial de água e perdas desta por evaporação, além de preservar a estrutura do solo, já foi descrito por MOODY et al. (1961). A redução do escoamento superficial de água e da ausência de erosão hídrica em áreas com 21% de declividade sob plantio direto foi descrita por HARROLD e EDWARDS (1972). O efeito de estratificação de nutrientes e matéria orgânica do solo em áreas sob plantio direto por sua vez já foi

descrito por SHEAR e MOSCHLER (1969), e o acúmulo de raízes e biomassa nas camadas superficiais do perfil do solo sob plantio direto foi descrito por LYNCH (1984).

I.2.2 UM BREVE HISTÓRICO DO PLANTIO DIRETO

Antes do advento dos herbicidas seria inviável pensar-se em plantio direto, logo os primeiros relatos de plantio direto foram concomitantes com o desenvolvimento destes produtos. Em 1951 pesquisadores da DOW CHEMICAL COMPANY reportaram o sucesso do uso de herbicidas no preparo do leito de semeadura. Suas pesquisas também indicavam os efeitos positivos desta nova técnica de cultivo, com pouco ou nenhum revolvimento do solo, na conservação do solo e da umidade. Em Nova Jersey (EUA) no início dos anos 50 usou-se herbicidas como substituto para o cultivo em trabalhos de renovação de pastagens. Na metade dos anos 50 relatou-se na Nova Zelândia a produção de morangos usando-se técnicas de plantio direto (PHILLIPS e YOUNG, 1973, p. 19). Em 1952 foi reportado o sucesso do cultivo de milho, soja e linho sobre resteva de trevo ladino tratado com 2,4 - D (derivados do ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e outros experimentos com DALAPON (ácido 2,2-dicloropropiônico) (JONES et al., 1968). A primeira produção bem sucedida de milho sob plantio direto foi obtida nos primeiros anos de 1950 (DICK et al., 1991). Em 1960 MOODY et al. (1961) instalaram um experimento com plantio direto de milho na Virgínia (EUA).

As primeiras citações brasileiras sobre a necessidade de uma agricultura baseada em sistemas conservacionistas, no caso o cultivo mínimo, datam de 1961.

Em 1969 instalou-se, em Não-Me-Toque - RS, o primeiro experimento com plantio direto no Brasil, semeando-se sorgo sobre resteva de inverno. Entretanto, devido à destruição da máquina, empregada para o plantio, em um incêndio não se deu continuidade ao trabalho (BORGES, 1993, p. 13). Os primeiros experimentos com plantio direto em trigo foram realizados em 1971 e 1972 pela Missão Agrícola Alemã em Londrina - PR. Após esta bem sucedida experiência, iniciava-se ainda em 1971 experimentos com plantio direto de soja em Ponta Grossa - PR e à partir de 1973 também com trigo (DERPSCH, 1984, p. 3-5). O primeiro agricultor brasileiro a iniciar o plantio direto a campo provavelmente tenha sido Herbert Bartz em Rolândia - PR no ano de 1972 (BORGES, 1993, p. 15). Atualmente esta técnica de cultivo está em franca expansão.

I.2.3 A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

A RPE ou EPR (Electron Paramagnetic Resonance) é um ramo da espectroscopia na qual a radiação, na frequência de microondas, é absorvida por moléculas, íons ou átomos possuindo elétrons com spins desemparelhados - centros paramagnéticos (DRAGO, 1992, p. 360) quando estes são submetidos a um campo magnético. A técnica de RPE baseia-se na existência de um momento magnético líquido de spin associado ao elétron (PARISH, 1990, p. 168). Esta técnica concerne à detecção de elétrons desemparelhados e à caracterização de seu ambiente químico. Substâncias diamagnéticas, ou seja aquelas que não possuem elétrons desemparelhados, não podem ser detectadas por RPE, e portanto não interferem

nos experimentos envolvendo substâncias paramagnéticas.

Com a RPE pode-se analisar, não destrutivamente, amostras sólidas, líquidas, gasosas e em solução. Por não haver a necessidade de grandes quantidades de amostras os experimentos realizados em Banda-X utilizam tubos de quartzo de poucos milímetros de diâmetro que são preenchidos com poucos milímetros de altura de amostra. É uma técnica extremamente sensível e sob condições favoráveis o limite de detecção para centros paramagnéticos encontra-se no intervalo de 10^{11} a 10^{12} spins g^{-1} , o que equivale à parte por bilhão. A resolução porém é perdida quando os centros paramagnéticos estão próximos o suficiente para que ocorra significativa interação dipolar entre eles. Logo esta técnica aplica-se, primariamente, à caracterização de espécies magneticamente diluídas (GOODMAN e HALL, 1994, p. 173). A diluição de amostras sólidas não é obtida pela simples mistura com um pó "silencioso" (diamagnético) em RPE. Há a necessidade da diluição dos centros paramagnéticos ao nível molecular. No caso de soluções, solventes com alta constante dielétrica (p. ex. água) não são recomendados, pois ocorrem perdas de potência da microonda aplicada pela interação do solvente com a componente elétrica desta, assim como aquecimento e outros problemas (PARISCH, 1990, p. 170), porém é possível a aquisição de espectros nestas condições utilizando-se "cubetas" especiais.

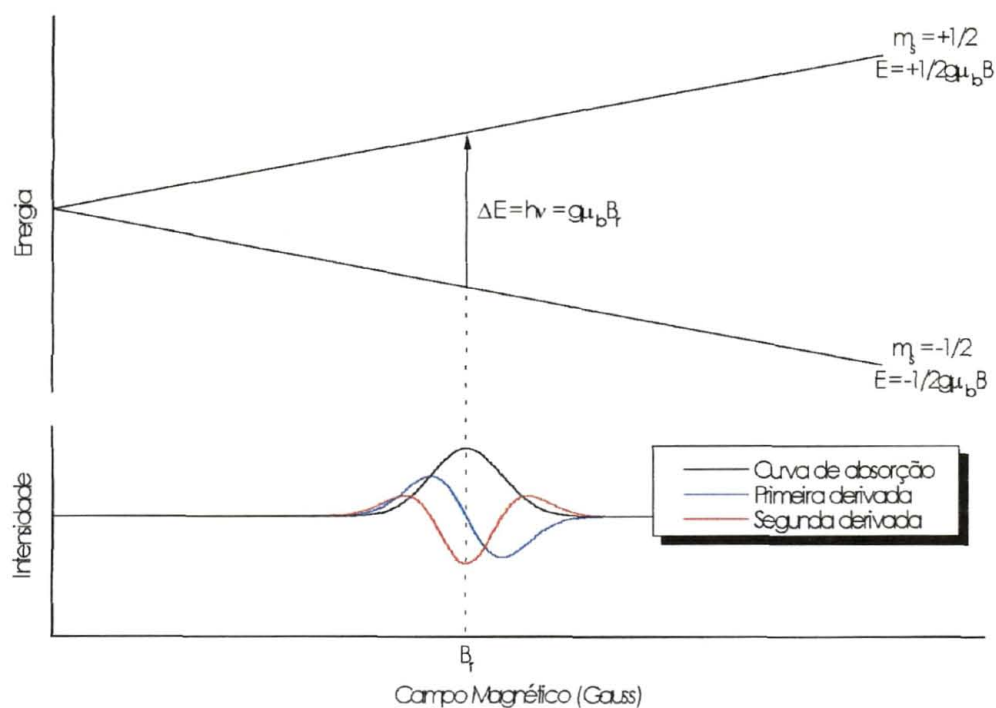
A maioria dos experimentos em RPE são efetuados à frequência de cerca de 9 GHz, que é conhecida como banda-X de frequência, e de 35 GHz (banda-Q). Estas frequências foram escolhidas pois equipamentos utilizando-as já haviam sido desenvolvidos à partir de radares marinhos (9 GHz) e de aeroporto (35 GHz) (PARISCH, 1990, p. 169). Há, no entanto, experimentos executados em outras

frequências de microondas tais como de 1 a 2 GHz (banda-L), 3 a 4 GHz (banda-S), 24 GHz (banda-K), 50 GHz (banda-V) e 95 GHz (banda-W).

As espécies paramagnéticas mais comumente observadas incluem radicais livres orgânicos, complexos metálicos paramagnéticos, e estados tripleto excitados de moléculas diamagnéticas (BUNCE, 1987).

Geralmente os espectros de RPE são adquiridos na forma de primeira derivada do espectro de absorção (figura 1).

FIGURA 1 - REMOÇÃO DA DEGENERESCÊNCIA DOS ESTADOS DE SPINS POR UM CAMPO MAGNÉTICO (EFEITO ZEEMAN)



A resolução pode ser melhorada pela aquisição do espectro em segunda derivada (PARISCH, 1990, p. 171), entretanto a relação sinal-ruído em espectroscopia diminui geometricamente com sucessivas derivações (STARSINIC, 1984).

I.2.3.1 O Hamiltoniano de spin

A simples aquisição de um espectro de RPE não fornece muitas informações estruturais e químicas da amostra em estudo. Para obter tais informações, uma vez que o espectro foi adquirido, é necessário representá-lo matematicamente e encontrar valores para parâmetros que possam ser relacionados aos detalhes químicos e estruturais da amostra, tais como natureza dos radicais livres, espécies metálicas e estado de oxidação, simetria do sítio paramagnético e ligações químicas envolvidas, assim como outras informações (SENESI, 1990, p. 82-83). Na prática ainda é possível simplificações através de comparações com dados disponíveis na literatura.

O operador quântico "Hamiltoniano de spin" é uma representação matemática conveniente do espectro de RPE. Se for possível ajustar um Hamiltoniano de spin para um espectro experimental, pode-se utilizar os parâmetros obtidos para se fazer inferências a respeito das propriedades químicas e estruturais da amostra em estudo (SENESI, 1990, p. 83). O Hamiltoniano é uma descrição fenomenológica pela qual o espectro de RPE pode ser descrito em termos de um pequeno número de parâmetros. Uma vez que estes parâmetros são determinados experimentalmente, cálculos relacionando estes parâmetros, a configuração eletrônica e o estado de energia do centro paramagnético são geralmente possíveis (DRAGO, 1992, p. 572).

Para os objetivos deste trabalho há a necessidade de se discutir apenas alguns termos do Hamiltoniano de spin:

$$\hat{H} = (g_x B_x \hat{S}_x + g_y B_y \hat{S}_y + g_z B_z \hat{S}_z) + (A_x \hat{S}_x \hat{I}_x + A_y \hat{S}_y \hat{I}_y + A_z \hat{S}_z \hat{I}_z) \quad (1)$$

onde o primeiro termo corresponde à interação eletrônica Zeeman e o segundo termo à interação hiperfina. Este Hamiltoniano de spin inclui termos contendo os operadores de spin eletrônico (\hat{S}_x , \hat{S}_y e \hat{S}_z) e os operadores de spin nuclear (\hat{I}_x , \hat{I}_y e \hat{I}_z) (SENESI, 1990, p. 83).

À partir do espectro experimental estima-se o fator-g e, eventualmente, a constante de interação hiperfina (A) que serão discutidos nas seções subsequentes. De posse destes valores e com o auxílio deste Hamiltoniano pode-se inferir sobre o ambiente químico em que se encontra o elétron desemparelhado.

Um segundo Hamiltoniano de importância para este estudo será o Hamiltoniano de separação de campo zero (DRAGO, 1992, p. 392):

$$\hat{H} = D(\hat{S}_z^2 - \frac{1}{3} \hat{S} \cdot \hat{S}) + E(\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2) \quad (2)$$

Este Hamiltoniano, por sua vez, inclui termos contendo apenas os operadores de spin eletrônico e a interação entre spins ($\hat{S} \cdot \hat{S}$). Deste Hamiltoniano pode-se estimar os parâmetros D e E que serão discutidos na seção 1.2.3.5.

1.2.3.2 A interação eletrônica Zeeman

O fenômeno físico básico implícito à espectroscopia de RPE é o efeito Zeeman (figura 1), que envolve a interação entre o spin de um elétron

desemparelhado e um campo magnético externo (SENESI, 1990, p. 78). Ele está representado no primeiro termo do Hamiltoniano de spin dado. Elétrons não submetidos a campos cristalinos ou magnéticos externos estão alinhados aleatoriamente e os dois estados de spin ($m_s = \pm 1/2$) são equivalentes em energia, ou seja, estão degenerados. Porém na presença de um campo magnético externo eles assumem $2S + 1$ (multiplicidade) diferentes orientações, distinguidas pelo número quântico m_s , onde S é o spin total resultante. No caso aqui discutido tem-se que a multiplicidade é igual a 2, dados por $m_s = +1/2$ e $m_s = -1/2$. A energia relativa destes dois níveis é proporcional ao campo magnético aplicado e é dada por:

$$E_{m_s} = g \mu_B B m_s \quad (3)$$

onde μ_B é o magneton de Bohr ($9,2731 \times 10^{-24}$ J/T) e B o campo magnético. A separação de energia entre os estados de spins é chamada de separação Zeeman e a constante de proporcionalidade, g , é conhecida como fator- g ou valor- g . Ele tem um valor de 2,0023 para um elétron livre hipotético, porém, em sistemas químicos o elétron desemparelhado ocupa um orbital que pode ser mais ou menos localizado em um átomo simples ou pode ser grandemente deslocalizado na molécula ou radical. O fator- g reflete a natureza deste orbital. Ele pode variar de acordo com a orientação do orbital contendo o elétron desemparelhado em relação ao campo magnético externo aplicado (anisotropia). Portanto, três valores característicos, g_x , g_y e g_z , podem ser obtidos, e estes valores fornecem informações a respeito dos eixos principais de simetria do orbital contendo o elétron desemparelhado. No caso de simetria axial, $g_x = g_y$ e ambos são designados por g_{\perp} , e g_z é designado g_{\parallel} (GOODMAN e HALL, 1994, p. 174-175).

Em solução as moléculas possuem movimento de rotação, e quando esta agitação térmica atinge taxas consideravelmente maiores do que a frequência de operação do espectrômetro qualquer anisotropia é promediada a zero durante o tempo requerido para excitar-se o sistema e em qualquer instante o conjunto de moléculas terá todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético externo, e o espectro resultante será “aparentemente” isotrópico e terá apenas um fator-g.

Quando a solução é congelada, ou se a amostra é um pó, todas as possíveis orientações ocorrerão aleatoriamente, contudo as posições moleculares são mantidas. Cada molécula com uma orientação particular tem seu próprio fator-g e o espectro resultante é a soma do espectro individual de cada molécula. No caso de simetria axial, em base puramente estatística, haverá poucas moléculas com o eixo principal de simetria paralelo ao campo magnético externo, e muitas perpendiculares, de modo que a intensidade de absorção do sinal correspondente ao g_{\parallel} será mínima, e em primeira derivada passará por um máximo, enquanto a linha do g_{\perp} passará por zero e será de maior intensidade (PARISCH, 1990, p. 177).

Substituindo-se os números quânticos de spin na equação (3), tem-se os valores de energia para cada estado ($\pm 1/2 g \mu_B B$), sendo que o nível de menor energia em RPE corresponde ao valor de $m_s = -1/2$, no qual os elétrons estão alinhados paralelamente ao campo magnético externo. No caso de $m_s = +1/2$ os elétrons estão alinhados antiparalelamente ao campo magnético externo. A separação de energia entre os dois estados será de:

$$\Delta E = g \mu_B B \quad (4)$$

A separação de energia ΔE aumenta linearmente com o aumento de B (figura 1).

Transições de dipolo magnético podem ocorrer, entre os dois estados de spins, do de menor energia para o de maior energia, quando faz-se incidir radiação eletromagnética cujos fótons possuem energia $h\nu$ igual a ΔE , como mostrado abaixo:

$$h\nu = \Delta E = g \mu_B B_0 \quad (5)$$

Esta equação representa a condição de ressonância num experimento de RPE (SENESI, 1990, p. 79-80).

Para a aquisição de um espectro de RPE a amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante com dimensões ajustadas à frequência de microondas utilizada e torna-se impossível variar a frequência sem variar as dimensões da cavidade. Logo, por questões práticas, é mais conveniente submeter a amostra à radiação de microondas com frequência fixa e conhecida e variar B (PARISCH, 1990, p. 169). Isto provoca a variação de ΔE até que a condição de ressonância, dada pela equação (5), seja atingida e ocorra a transição de spin com a absorção de energia que é detectada pelo equipamento.

A absorção de energia vai ocorrer somente quando a população de spins do nível de menor energia ($m_s = -1/2$) for superior à população de spins de maior energia ($m_s = +1/2$). Quando a população do nível de spins de maior energia for superior, o sistema estará num estado de saturação. A razão das populações de spins entre os níveis submetidos a um campo magnético externo em equilíbrio térmico e sem a aplicação de microondas, pode ser satisfatoriamente descrita pela distribuição de Boltzmann:

$$n^+/n^- = \exp(-h\nu/kT) \cong 1 - g \mu_B B/kT \quad (6)$$

onde n^+ e n^- são as populações dos níveis de maior energia e menor energia

respectivamente, k é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta da amostra em estudo (GOODMAN e HALL, 1994, p. 174). Pode-se perceber que diminuindo a temperatura da amostra consegue-se popular o nível de menor energia aumentando a intensidade do sinal.

Se o elétron promovido ao nível de maior energia retornasse ao seu estado fundamental emitindo radiação não seria possível detectar a absorção líquida de energia pois cada fóton absorvido seria reemitido. Existem porém acoplamentos entre os spins e o meio atômico circundante que possibilitam a transferência de energia sem a emissão de um fóton durante a transição do spin de volta para o nível inferior. Este processo é denominado de relaxação spin-rede, e possui um tempo característico (T_1) dependente dos acoplamentos existentes (COELHO NETO, 1992, p. 39-40). A taxa de transição do nível de menor energia para o de maior energia não pode exceder a taxa de relaxação de volta para o estado fundamental pois neste caso haverá a saturação do sistema (SENESI, 1990, p. 86-87). Por outro lado a largura de uma linha espectral está inversamente relacionada ao tempo de relaxação quanto maior a taxa de relaxação (DRAGO, 1992, p. 96), ou seja menor T_1 , mais larga será a linha de RPE, perdendo-se resolução e até mesmo impossibilitando o registro do espectro. Ambas as situações, eventualmente, podem ser contornadas diminuindo-se a temperatura do sistema, pois no primeiro caso aumenta-se a população do nível de menor energia e no segundo aumenta-se T_1 .

1.2.3.3 A interação nuclear hiperfina

Tanto prótons como nêutrons possuem números quânticos de spin ($\pm 1/2$) e, dependendo de como estas partículas estão no núcleo, pode-se ou não ter um número quântico de spin nuclear (I) diferente de zero (DRAGO, 1992, p. 211). Átomos com o número de prótons (Z) e de massa (A) pares possuem $I = 0$; exemplos: $^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$. No caso em que Z for ímpar e A for par o I será inteiro; exemplos: $^{14}_7\text{N}$ ($I = 1$), $^{10}_5\text{B}$ ($I = 3$) e no caso em que A for ímpar o número quântico I será semi-inteiro como exemplos $^{27}_{13}\text{Al}$ ($I = 5/2$), ^1_1H ($I = 1/2$) (GIL e GERALDES, 1987, p. 41). Spins nucleares desemparelhados produzem um momento magnético nuclear e as diferentes orientações deste, quando submetido a um campo magnético externo, são indicadas pelo número quântico de momento de spin nuclear (m_I), o qual é dado pelos seguintes valores: $I, I-1, \dots, -(I+1), -I$. Quando $I = 1/2$, $m_I = \pm 1/2$ correspondentes ao alinhamento do momento magnético paralelo e antiparalelo ao campo magnético externo. Quando $I = 1$, os valores de m_I serão 1, 0 e -1, correspondentes respectivamente ao alinhamento paralelo, perpendicular e antiparalelo ao campo, ou seja, para o caso do núcleo o valor positivo é o de menor energia (DRAGO, 1992, p. 212). Quando o elétron desemparelhado pertence a um átomo com spin nuclear líquido diferente de 0, por exemplo $I = 1/2$, e esta amostra for submetida a um campo magnético externo, este elétron estará submetido também a um campo magnético inerente do átomo que pode ser somado (m_I positivo) ou subtraído (m_I negativo) ao campo externo, ou seja, o campo magnético efetivo experimentado pelo elétron desemparelhado será a soma do campo magnético aplicado e o campo magnético local gerado pelo

spin nuclear. Este efeito está representado pelo segundo termo do Hamiltoniano de spin dado pela equação (1). Neste caso a linha de RPE será dividida em duas linhas, e a separação destas linhas corresponde ao valor da constante de interação hiperfina (A). O número de linhas da interação hiperfina é dado pela multiplicidade dos estados de spin nuclear: $(2I + 1)$.

1.2.3.4 Regras de seleção

As condições para que a matéria absorva radiação eletromagnética estão sumarizadas nas regras de seleção. As transições que são possíveis, de acordo com estas regras, são chamadas de permitidas, enquanto as transições que não obedecem estas regras são chamadas de proibidas. É importante ressaltar entretanto, que o termo proibido refere-se a regras estabelecidas para um modelo simples, de modo que transições proibidas podem ocorrer por mecanismos não incluídos neste modelo simples. Porém, a intensidade de absorção ou emissão que ocorre com uma transição está relacionada à probabilidade deste evento (transição) ocorrer. Quanto mais provável for o evento mais intensa será a absorção, de modo que, transições proibidas são de baixa probabilidade e dão absorções de muito baixa intensidade (DRAGO, 1992, p. 95).

As regras de seleção para RPE são: $\Delta m_l = 0$ e $\Delta m_s = \pm 1$. Ou seja, as transições nucleares e de mais de um spin eletrônico são pouco prováveis.

I.2.3.5 A separação de campo zero (interação fina)

No caso em que íons ou moléculas apresentem mais de um elétron desemparelhado próximos ($S > 1/2$) haverá uma interação entre os momentos magnéticos destes elétrons. O campo magnético efetivo experimentado pelos elétrons desemparelhados será a soma do campo magnético aplicado e o campo magnético local gerado pelo(s) spin(s) eletrônico(s) do(s) outro(s) elétron(s) desemparelhado(s). Esta interação magnética dipolo-dipolo remove a degenerescência (provoca a separação de energia entre os estados de spin) mesmo na ausência de campo magnético externo. Esta quebra de degenerescência é chamada de separação de campo zero. Nestes casos os parâmetros do Hamiltoniano de campo zero podem ser representados por duas constantes independentes, que são os parâmetros de campo cristalino E (distorção rômica) e D (distorção axial). Assim, no caso de simetria axial $E = 0$, e para simetria cúbica não se observa a separação de campo zero, ou seja, $D = E = 0$ (DRAGO, 1992, p. 391-392).

I.2.4 A MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

Desde a Antigüidade o homem reconhecia a importância da matéria orgânica do solo e curiosamente, o próprio termo *química* pode ter surgido relacionado à matéria orgânica do solo. Nas margens do rio Nilo, depois das enchentes, as terras ribeirinhas ficavam cobertas por uma camada de material orgânico escuro trazido das florestas da África por onde o rio passava, material

orgânico este, que garantia a fertilidade do solo. Os egípcios chamavam aquela terra preta de *Khem*, e segundo alguns autores, foi de onde se originou a palavra árabe *alquímia*, que depois transformou-se na palavra *química* (GLACKIN, 1976).

Os efeitos benéficos do húmus sobre as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e no desenvolvimento das plantas, com reflexos nas produtividades atuais e a longo prazo das culturas assim como na preservação do ambiente são bem conhecidos e documentados (STEVENSON, 1982, p. 17-22; DARST e MURPHY, 1989; BUFFLE, 1990; SCHNITZER, 1991; LOVLEY et al., 1996; PICCOLO et al., 1997).

Estimativas da massa total de C orgânico do solo variam de $1,22 \times 10^{18}$ g de C (SOMBROEK et al., 1993) a $2,456 \times 10^{18}$ g de C (BATJES, 1996). Este reservatório, que excede a quantidade em todos os demais reservatórios superficiais interage com a atmosfera e afeta seu conteúdo em CO_2 (BOHN, 1982), logo a estabilidade da matéria orgânica do solo e os efeitos da atividade humana sobre ela devem ser levados em consideração ao pensar-se na elevação da concentração de CO_2 atmosférico (SCHNITZER, 1991; BORIN et al., 1997; REICOSKY et al., 1997).

Devido à diversidade de conceitos relativos à matéria orgânica do solo, torna-se importante descrever um que será adotado neste trabalho. Considera-se a matéria orgânica do solo como sendo a soma total de todas as substâncias contendo C orgânico (SCHNITZER, 1991), incluindo organismos vivos que geralmente não excedem 4% do C orgânico do solo (THENG et al., 1989). Os componentes não vivos são divididos em matéria macrogânica ou fração leve, que é separada por flotação, e húmus (THENG et al., 1989). A primeira é composta de resíduos animais e vegetais submetidos à fragmentação física. O húmus por sua

vez constitui-se de uma mistura de compostos vegetais e animais em vários estágios de decomposição e substâncias orgânicas sintetizadas química e biologicamente. Este material complexo pode ser dividido em substâncias não húmicas, que compreendem substâncias orgânicas de composição definida e pertencentes a grupos bem conhecidos da química orgânica, e SH, que são mais estáveis e compreendem a maior porção da matéria orgânica do solo (SCHNITZER, 1991). As SH são compostos poliméricos produzidos através da ação microbiana que difere de biopolímeros na sua estrutura e pela sua longa persistência no solo (SPOSITO, 1989, p. 48), sendo entretanto, mais correto defini-las como compostos macromoleculares, visto que não apresentam subunidades (monômeros) que se repetem como seria o caso para polímeros. As SH são amorfas, de cor escura, parcialmente aromáticas, principalmente hidrofílicas e quimicamente complexas. Comportam-se como materiais polieletrólitos, com um peso molecular variando de poucas centenas à diversos milhares de unidades de massa atômica (SCHNITZER e KHAN, 1972, p. 3).

Operacionalmente falando, as SH podem ser divididas em ácidos húmicos (AH), fúlvicos (AF) e humina que são similares em estrutura e composição porém diferem nas reações (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1985, p. 45).

Uma das propriedades importantes do húmus é a capacidade deste de formar complexos e quelatos com íons metálicos do solo, tanto nutrientes como tóxicos, podendo até mesmo controlar sua disponibilidade para as plantas (PIONKE e COREY, 1967; MILLER e MC FEE, 1983; GERRITSE e VAN DRIEL, 1984; POHLMAN e McCOLL, 1988; GERKE, 1992; MATZNER, 1992; DOBROVOL'SKII, 1997).

A capacidade do húmus de acumular elementos traços é de grande importância na biogeoquímica destes (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1985, p. 47). Ao considerar-se o perfil do solo como prisma de paisagem, tem-se que a camada superficial de húmus pode agir como uma barreira geoquímica levando ao enriquecimento principalmente de elementos traços. De modo geral, em solos minerais, pode-se esperar que mais de 50% do total dos elementos traços esteja associado ao húmus (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1985, p. 48). O alto conteúdo de húmus nos solos gera, porém, uma complexa influência no comportamento dos elementos traços, podendo tanto fixá-los levando ao seu enriquecimento geoquímico quanto mobilizá-los através da formação de complexos organometálicos solúveis de baixo peso molecular, pois ácidos orgânicos oriundos da liteira são conhecidos por mobilizar metais pesados nos solos (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1985, p. 48; POHLMAN e McCOLL, 1988).

Estas propriedades evidentemente dependem da quantidade e qualidade do húmus presente no solo, que por sua vez dependem do material que o originou e das condições ambientais sobre as quais foi formado (STEVENSON, 1982, p.1-7). A esse respeito um dos pontos onde o homem pode intervir é quanto a adoção de práticas conservacionistas como o plantio direto (HAVLIN e SCHLEGEL, 1989; KARLEN, 1989). Este sistema de cultivo aproxima o agroecossistema da condição original e ideal que é o ecossistema natural (BLEVINS et al., 1977), onde a ciclagem dos elementos e a participação da matéria orgânica do solo é decisiva para a sustentabilidade do sistema e com a manutenção de altas produtividades com o retorno da maior quantidade possível de resíduos vegetais ao solo observando-se a adequada reposição de nutrientes (MAPLES, 1989).

Quanto à quantidade de matéria orgânica do solo em função do sistema de cultivo adotado o assunto é controverso (STALEY et al., 1988; FRANZLUEBBERS e ARSHAD, 1996). Entretanto diferenças qualitativas e na distribuição da matéria orgânica no perfil do solo são bem estabelecidas (AKENT'YEVA e CHIZHOVA, 1986; MERTEN e MIELNICZUK, 1991; NASCIMENTO et al., 1991; ROTH et al., 1992; MARTIN NETO et al., 1994; ANGERS et al., 1997; BAYER e MIELNICZUK, 1997; NOVOTNY et al., 1997a). Já para os sistemas florestais as diferenças em relação aos sistemas agrícolas ocorrem em quantidade, qualidade e acúmulo superficial (STEVENSON, 1982, p. 4-5; BEYER et al., 1992).

Visto que os métodos tradicionais de determinação da disponibilidade de certos nutrientes e elementos tóxicos nem sempre são eficientes em refletir sua real biodisponibilidade (PAVAN e MIYAZAWA, 1984), principalmente em relação ao plantio direto (WALTERS et al., 1992), há a necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos que regulam a atividade dos elementos na solução do solo e logo na sua disponibilidade para as plantas. Esta compreensão passa pela especiação das interações dos elementos de interesse (nutrientes ou tóxicos) com os demais componentes do solo, principalmente com os AH (MANGRICH, 1993, p.78), visto que as SH representam a fração da matéria orgânica do solo mais abundante, e mais ativa química e biologicamente (SENESI, 1990, p. 78; BUFFLE, 1990).

Como a matéria orgânica do solo é muito complexa, devido ao fato de ser formada por compostos muito diferentes, a relação entre as características da matéria orgânica do solo e práticas de manejo é pobremente compreendida (WANDER e TRAINA, 1996).

A caracterização do húmus pode ser realizada por diversas técnicas tais como análise elementar, espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), infravermelho (IV), infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), difração e fluorescência de raio X, microscopia e difração eletrônica, medidas de peso molecular entre outros (MARTIN NETO et al., 1991). No Brasil a caracterização analítica detalhada da matéria orgânica do solo é ainda incipiente, como se constata ao se consultar publicações em periódicos nacionais (*Revista Brasileira de Ciência do Solo e Pesquisa Agropecuária Brasileira*) e trabalhos apresentados nos últimos Congressos Brasileiros de Ciência do Solo (Goiânia - 1993, Viçosa - 1995 e Rio de Janeiro - 1997), ao contrário do que ocorre em outros países, onde a caracterização da matéria orgânica do solo é efetuada com o uso de RMN, RPE, IVTF, UV-Vis, pirólise e outros, com expressiva quantidade de resultados (BEYER, 1996; CHESHIRE e McPHAIL, 1996; PRESTON, 1996; CELI et al., 1997; SCHULTEN e SCHNITZER, 1997; WILCKEN et al., 1997), inclusive estudando-se a matéria orgânica proveniente de solos brasileiros (LESSA et al., 1996).

A técnica de RPE é quase a única, entre os métodos de laboratório para a investigação de complexos organo-metálicos, que fornece informações estruturais sem artifícios ou condições experimentais restritivas (SAAR e WEBER, 1982* citados por SENESI et al., 1985), porém uma de suas limitações é a necessidade de haver paramagnetismo no metal em estudo.

* Saar, R.A., J.H. Weber. 1982. Fulvic acid: Modifier of metal-ion chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 16:510A-517A.

A alta estabilidade dos complexos organo-metálicos de Cu e Fe e menor de Mn (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1985, p. 47) pode ser explicada pelos resultados obtidos por RPE em trabalhos de SENESI et al. (1989b) e TAM et al. (1991).

Em solos minerais, os componentes orgânicos e inorgânicos são intimamente associados, e geralmente é necessário primeiro separá-los para se poder estudá-los em maiores detalhes (SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 3). Um dos maiores problemas enfrentados para o estudo do húmus é a necessidade da extração deste do solo. De acordo com STEVENSON (1982, p. 37) o método ideal de extração das SH seria aquele que: (a) levasse ao isolamento do material inalterado; (b) fornecesse um extrato livre de contaminantes inorgânicos e com frações representativas de toda a amplitude de pesos moleculares; (c) fosse um método aplicável a todos os solos. Em adição haveria a necessidade de um extrato livre de impurezas orgânicas co-adsorvidas nas SH "verdadeiras" (STEVENSON, 1982, p. 37-38; DANNEBERG, 1973).

O método clássico de extração de húmus do solo por solubilização com álcali tem sido criticado. As principais desvantagens deste método são (STEVENSON, 1982, p. 38): (a) a dissolução da sílica mineral e de tecidos orgânicos frescos que contaminariam o extrato; (b) a autoxidação de alguns constituintes orgânicos no contato do extrato com o ar; (c) além de outras alterações químicas que poderiam ocorrer em meio alcalino.

Entre os extratores "brandos" propostos para substituir a base forte NaOH estão os sais neutros, especialmente $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (BREMNER e LEES, 1949; NOVOTNY et al., 1997a). Entretanto, na revisão bibliográfica de SCHNITZER e KHAN (1978, p.4) afirma-se que $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ é difícil de ser removido do material húmico durante a purificação.

O carbono orgânico do solo extraído por resina trocadora catiônica consiste de SH (DORMAAR, 1974; HERMANN e GERKE, 1992). A extração com resina trocadora catiônica é muito cuidadosa, sem grandes inclusões de artefatos, e fornece SH relativamente "puras" (NOVOTNY et al., 1997b), porém, o extrato apresenta um alto conteúdo de cinzas (DANNEBERG, 1973). A pureza refere-se à ausência de substâncias não húmicas acompanhantes e não à ausência de complexos organo-minerais (KUTSCH, 1985). Assim mesmo, ROSELL et al. (1971) encontraram que resina é um extrator mais indicado do que NaOH e Na₄P₂O₇.

A dispersão dos colóides orgânicos por vibração ultra-sônica da suspensão do solo aumenta a extração de material orgânico por NaOH, Na₄P₂O₇ (SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 5) e resina (NOVOTNY et al., 1997b).

Diversos métodos, físicos e químicos, têm sido recomendados para o fracionamento da matéria orgânica do solo (SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 5-7). Também aqui, uma possível desvantagem de métodos químicos é que pode-se modificar a matéria orgânica do solo extraída. A cromatografia de exclusão em vidro de porosidade controlada (CE-VPC), para a separação de misturas de substâncias orgânicas, apresenta algumas vantagens em relação aos clássicos géis orgânicos: ela é relativamente inerte à maioria das substâncias (DANNEBERG, 1977, p. 15-18) e permite fluxos 5 a 10 vezes maiores (GERZABEK e ULLAH, 1989). Um problema do emprego da CE-VPC para o fracionamento é a contaminação do material obtido pela solução tampão utilizada como eluente.

I.3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram quantificar e caracterizar a matéria orgânica do solo em caráter comparativo entre solos sob diferentes sistemas de manejo, assim como propor um novo método para a extração, fracionamento e caracterização espectroscópica da matéria orgânica do solo com a mínima alteração e que produza um material “limpo” para análises por IVTF e RPE.

CAPÍTULO II: DESCRIÇÃO DAS ÁREAS ESTUDADAS, METODOLOGIA DE AMOSTRAGEM E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

II.1 LOCALIZAÇÃO, DESCRIÇÃO E HISTÓRICO DAS ÁREAS

As áreas selecionadas para este estudo estão localizadas na região de Campos Gerais, situada inteiramente no Segundo Planalto Paranaense ou Planalto de Ponta Grossa. Este constitui-se de uma região suavemente inclinada, a partir da escarpa Devoniana, onde as altitudes atingem cotas de 1200 m, indo mergulhar a oeste em altitudes de 700 a 800 m, sob a escarpa Mesozóica da Serra Geral (MAACK, 1981).

A vegetação original de ambas as áreas estudadas era de Campo Nativo, caracterizada por extensos campos limpos (estepes de gramíneas baixas), como formas relícticas de um clima primitivo semi-árido do Pleistoceno, constituindo portanto a formação florística mais antiga ou primária do estado do Paraná (MAACK, 1981). Segundo este mesmo autor, pode-se citar entre as espécies predominantes mais relevantes: estepe subtropical de gramíneas baixas (*Andropogon* spp. e outras); floresta de galeria subtropical de araucária, onde os capões se desenvolvem nas depressões mais úmidas ao redor das nascentes, expandindo-se nos declives até unirem-se uns aos outros, constituindo um complexo maior de mata. Esta é dominada por pinheiros-do-Paraná (*Araucaria angustifolia*) associados com lauráceas ou canelas (*Nectandra mollis*), imbuia (*Ocotea porosa*), jacarandá caviúna (*Dalbergia nigra*) entre outras espécies;

vegetação pantanosa de depressões onde predominam as ciperáceas do pântano (*Cyperus lactus*) e outras.

II.1.1 ÁREA SOB PLANTIO DIRETO, CULTIVO MÍNIMO E REFLORESTAMENTO COM EUCALIPTO (PONTA GROSSA - PR)

As amostras de solo foram coletadas de um experimento de sistemas de cultivo em Ponta Grossa - PR que incluía: uma área reflorestada com Eucalipto e um experimento de cultivo instalado há 19 anos com cultivo mínimo - grade leve seguida de escarificador - e plantio direto. A parcela sob cultivo mínimo foi mantida sob plantio convencional entre 1977 e 1984 - arado de discos seguido de duas gradagens leves.

A rotação de culturas incluía trigo, aveia, azevém, tritcale e ervilhaca no inverno com soja e milho no verão.

Os nutrientes aplicados entre 1991 e 1995 nas áreas cultivadas são dados na tabela 1.

TABELA 1 - NUTRIENTES APLICADOS POR ANO ENTRE 1991 E 1996 NAS ÁREAS CULTIVADAS

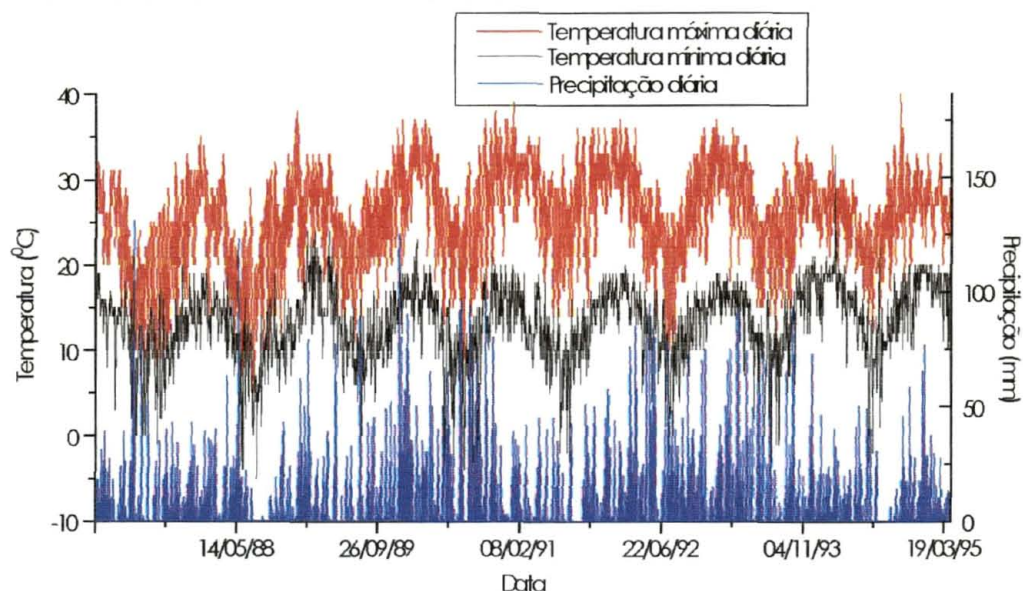
Cultura	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Azevém	45 kg ha ⁻¹	-	-
Triticale	81 kg ha ⁻¹	90 kg ha ⁻¹	-
Trigo	81 kg ha ⁻¹	90 kg ha ⁻¹	-
Milho	123 kg ha ⁻¹	63 kg ha ⁻¹	63 kg ha ⁻¹
Soja	-	33 kg ha ⁻¹	33 kg ha ⁻¹

As coordenadas geográficas de referência são: 50° 04' de longitude oeste e 25° 02' de latitude sul.

O clima deste local enquadra-se, na classificação de Köppen, como Cfb: clima subtropical úmido, mesotérmico, verões brandos e invernos com geadas

severas demasiado freqüentes, sem estação seca definida. Temperatura média mensal no mês mais quente menor do que 22° C e no mês mais frio menor do que 18° C (IAPAR, 1978, p. 33). A precipitação pluviométrica e as temperaturas mínima e máxima diárias, nos últimos oito anos, são dados na figura 2.

FIGURA 2 - PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA E TEMPERATURAS MÍNIMA E MÁXIMA DIÁRIAS OBSERVADAS NO MUNICÍPIO DE PONTA GROSSA



FONTE: Fundação ABC para assistência e divulgação técnica agropecuária.

O solo pode ser classificado como latossolo vermelho-escuro, álico, distrófico, A proeminente, textura argilosa, derivado de material retrabalhado de rochas sedimentares do período devoniano.

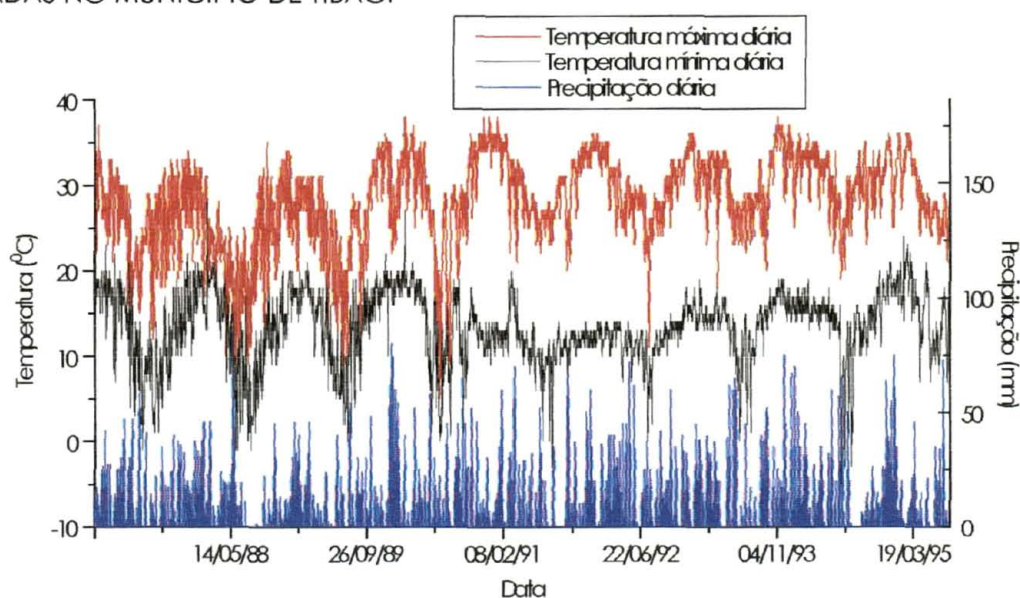
II.1.2 ÁREA SOB CAMPO NATIVO (TIBAGI - PR)

As amostras de solo também foram coletadas de uma área sob campo nativo (vegetação original da região) em Tibagi - PR.

As coordenadas geográficas de referência são: 50° 25' de longitude oeste e 24° 31' de latitude sul.

O clima desta área enquadra-se, na classificação de Köppen, como Cfa: clima subtropical úmido, mesotérmico, verões brandos e invernos com geadas menos freqüentes, tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, sem estação seca definida. Temperatura média mensal no mês mais quente maior do que 22° C e no mês mais frio menor do que 18° C (IAPAR, 1978, p. 33). A precipitação pluviométrica e as temperaturas mínima e máxima diárias, nos últimos oito anos, são dados na figura 3.

FIGURA 3 - PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA E TEMPERATURAS MÍNIMA E MÁXIMA DIÁRIAS OBSERVADAS NO MUNICÍPIO DE TIBAGI



FONTE: Fundação ABC para assistência e divulgação técnica agropecuária.

O solo pode ser classificado como latossolo vermelho-escuro, álico, A moderado, textura muito argilosa, derivado de material retrabalhado de rochas sedimentares do período devoniano.

II.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO E ANÁLISES DE ROTINA

Os solos foram coletados em 3 mini-trincheiras, perfazendo uma amostra composta, de 0,8 m de largura X 0,5 m de profundidade em camadas de 0-5 cm, 5-10 cm, 10-20 cm e 20-50 cm. Nas áreas agrícolas, as amostras foram coletadas após a colheita do milho e tomou-se o cuidado de dispor as mini-trincheiras perpendicularmente à duas linhas de plantio coletando-se a metade de cada uma e a entrelinha. Este procedimento fora adotado visando coletar a maior amplitude de variação dentro de cada amostra simples, visto que o espaçamento do milho foi de 0,8 m e da soja 0,4 m (cultura que antecedeu o milho no verão anterior). Tinha-se a certeza, com este procedimento, de coletar-se 1 sulco de adubação recente para o milho e 2 para a soja, assim como o volume de influência das raízes de 1 linha de milho e 2 linhas de soja, este procedimento foi baseado nos estudos de distribuição de P em áreas cultivadas sob plantio direto efetuados por KITCHEN et al. (1990).

Após a coleta, os solos foram postos para secar ao ar em casa de vegetação por 10 dias, a seguir foram moídos, passados por peneiras de 2 mm e homogeneizados.

De cada solo pegou-se três sub-amostras para a realização das análises químicas de rotina, segundo metodologia modificada de PAVAN et al. (1991), granulométrica por Vettori completo (EMBRAPA, 1979), C orgânico por combustão via úmida (PAVAN et al., 1991) e pelo método Walkley-Black (TEDESCO et al., 1985).

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos em "freezer" (-12^o C) até serem transportadas para os laboratórios em Seibersdorf - Áustria onde o húmus do

solo foi extraído com uma solução de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Este extrator é considerado brando quando comparado a soluções de NaOH (STEVENSON, 1982, p. 39).

Para a extração foram usados 10 g de solo e 50 mL da solução de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Esta mistura foi mantida sob agitação em agitador orbital ajustado a 200 rpm durante 16 h e então centrifugada a 17000 g por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro faixa preta - 589¹ e completado com água bidestilada até 100 mL.

Efetuuou-se as análises de C e N totais e do húmus extraído por pirofosfato, após este ter sido liofilizado, por combustão via seca com um analisador Carlo Erba C, N e S.

II.3 ANÁLISE MINERALÓGICA

II.3.1 MATERIAL E MÉTODOS

Uma amostra (solo total moído em gral de ágata) de Ponta Grossa e uma de Tibagi foram caracterizadas quanto a mineralogia por difração de R-X segundo método descrito por RIEDMÜLLER (1978) e por IVTF segundo RUSSELL e FRASER (1994, p. 16).

A fração argila, separada por sedimentação (EMBRAPA, 1979), foi submetida aos tratamentos de eliminação da matéria orgânica, utilizando-se H_2O_2 , e eliminação dos óxidos de ferro livre pelo método ditionito-citrato-bicarbonato-DCB (CAMARGO et al., 1986) e analisada por difração de raios-X (R-X) segundo

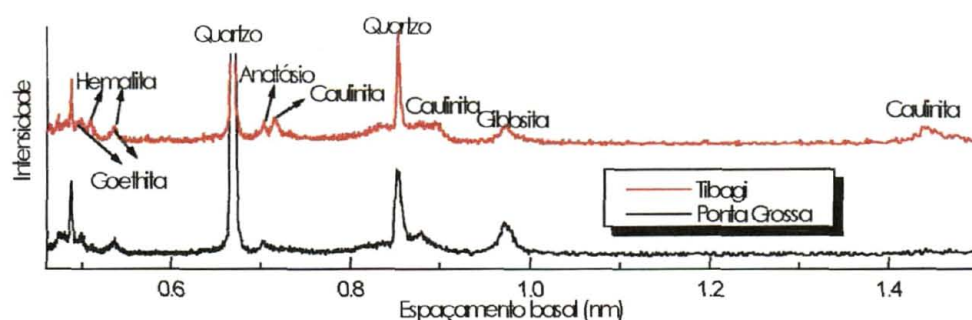
CAMARGO et al. (1986), por IVTF segundo RUSSELL e FRASER (1994, p. 16) e RPE segundo GOODMAN e HALL (1994, p. 195-199). Análises semi-quantitativa dos argilo-minerais e de cristalinidade da caulinita foram efetuadas segundo RIEDMÜLLER (1978).

As análises de difração de R-X foram efetuadas em difratômetro Philips utilizando a radiação Cu-K α (40 kV, 20 mA) com uma velocidade de varredura de 0,5 $^{\circ}$ min $^{-1}$. Os espectros de IVTF foram adquiridos em pastilhas de KBr (1:100) utilizando-se um equipamento Perkin Elmer System 2000 FT-IR somando-se 20 varreduras com uma resolução de 4 cm $^{-1}$, numa faixa de 4000 a 400 cm $^{-1}$ e os de RPE, foram adquiridos em Banda-X (~ 9,7 GHz), em um espectrômetro Bruker ESP300E, utilizando modulação de 100 kHz, a temperatura ambiente (300 K) e a temperatura de nitrogênio líquido (77 K).

II.3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

As amostras (solo total) provenientes de Ponta Grossa e Tibagi apresentaram composição mineralógica similar determinada por análise de difração de R-X (figura 4).

FIGURA 4 - DIFRATOGRAMA DAS AMOSTRAS DE SOLO PROVENIENTES DE PONTA GROSSA E TIBAGI, AMOSTRA NÃO ORIENTADA



São compostas principalmente por quartzo, gibbsita, hematita, anatásio caulinita e possivelmente goethita (Vocabulário de Ciência do solo, SBCS, 1993).

O tratamento das amostras da fração argila com dimetilsulfóxido (DMSO) possibilita a identificação de caulinita com coexistente clorita, e também a diferenciação de caulinita, que intercala com DMSO, de minerais do grupo da caulinita que não intercalam e possuem menor cristalinidade (RIEDMÜLLER, 1978). Segundo LAGALY (1981) caulins são misturas de diferentes tipos de caulinitas: tipo A, altamente reativo que intercala facilmente com um grande número de moléculas "hóspedes"; tipo B, com baixa reatividade, porém detectável e tipo C que não intercala. Caulins com alta proporção do tipo A são "China clays". "Ball clays" (argilas globulares) são caulins com alta proporção do tipo B e alta proporção do tipo C caracteriza "flint clays" (argilas silicosas) e "fire clays" (argilas refratárias). Ou seja, caulins que sofrem intercalação com DMSO são compostas por caulinitas de alta cristalinidade.

Na fração argila orientada encontrou-se por análise de difração de R-X (figuras 5 e 6): caulinitas com diferentes graus de cristalinidade; uma pequena quantidade de vermiculita com hidróxido de Al nas entrecamadas e outros contaminantes menores como minerais micáceos e gibbsita.

FIGURA 5 - DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA DE ARGILA PROVENIENTE DE PONTA GROSSA, AMOSTRA ORIENTADA

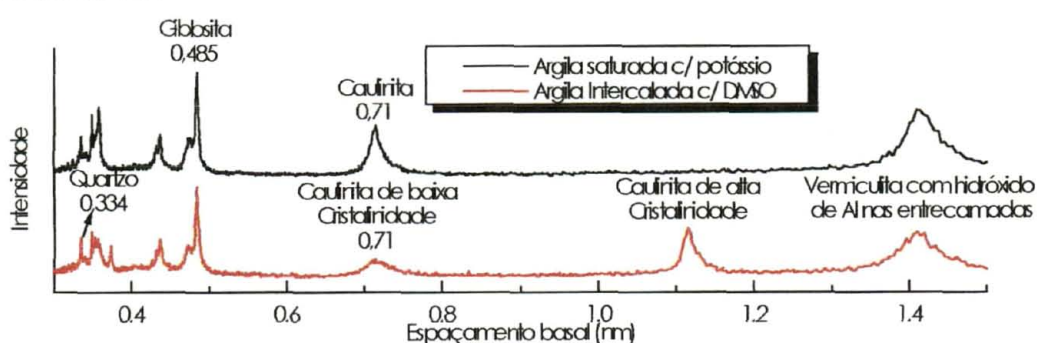
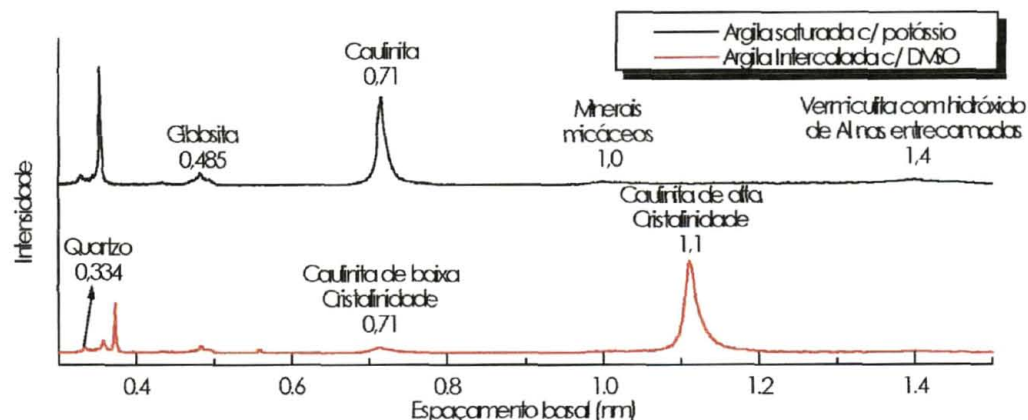


FIGURA 6 - DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA DE ARGILA PROVENIENTE DE TIBAGI, AMOSTRA ORIENTADA



A amostra de Ponta Grossa apresentou uma maior quantidade de vermiculita com hidróxido de Al nas entrecamadas e de caulinita de menor cristalinidade (tabela 2), determinada pela proporção deste argilo-mineral que não intercala com DMSO (RIEDMÜLLER, 1978). Sendo que o conteúdo de vermiculita hidróxido de Al nas entrecamadas pode estar sendo superestimado pois não há como diferenciar o pico a 1,4 nm da vermiculita e da clorita utilizando-se apenas a técnica de intercalação com DMSO de argilas saturadas com potássio (ABDEL-KADER et al., 1978).

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS ARGILO-MINERAIS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS ESTUDADAS

Argilo-minerais	Amostra	
	Ponta Grossa	Tibagi
V+Al ¹	22%	1%
K ² de alta cristalinidade	20%	61%
K de baixa crist.	58%	34%
Material Ilítico ³	-	4%

V+Al¹: vermiculita com hidróxido de Al nas entrecamadas.

K²: Caulinita.

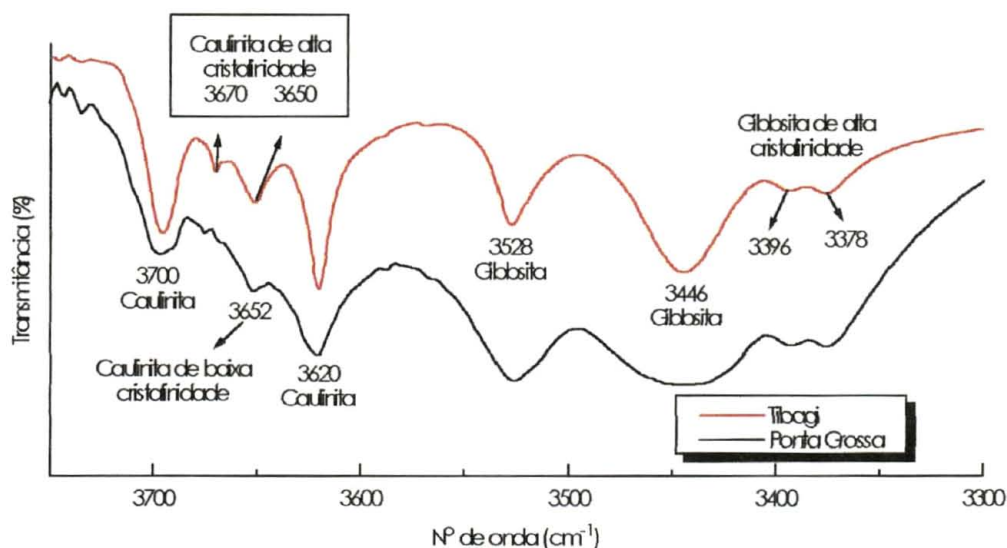
Material Ilítico³: o termo material ilítico é usado para argilo-minerais micáceos que não mostram alterações significativas nas reflexões basais após testes de expansão, contração e aquecimento.

II.3.3 ESPECTROSCOPIA DE IVTF

Ambas as amostras estudadas apresentavam uma coloração avermelhada e eram "clareadas" após o tratamento com DCB e este tratamento levou à diminuição da intensidade de absorção no IV na região de 450-550 cm^{-1} (dados não mostrados). Então pode-se concluir que o pigmento vermelho é, provavelmente, do tipo hematita (WILSON et al., 1981).

O espectro de infravermelho das amostras da fração argila provenientes de Tibagi e Ponta Grossa na região de 3750 a 3200 cm^{-1} (figura 7) apresentaram uma banda em 3620 cm^{-1} , típico de deformação axial de OH interno da estrutura da caulinita e, em 3700 cm^{-1} , banda típica da vibração externa do mesmo grupo (RUSSELL e FRASER, 1994, p. 18).

FIGURA 7 - ESPECTRO DE IVTF NA REGIÃO DE 3750 A 3300 cm^{-1} DAS AMOSTRAS DE ARGILAS PROVENIENTES DE PONTA GROSSA E TIBAGI



Um duplete em 3650 e 3670 cm^{-1} , presente na amostra de Tibagi, é substituído na amostra de Ponta Grossa por uma banda larga em 3652 cm^{-1} (figura 7), confirmando a menor cristalinidade da caulinita da amostra proveniente de

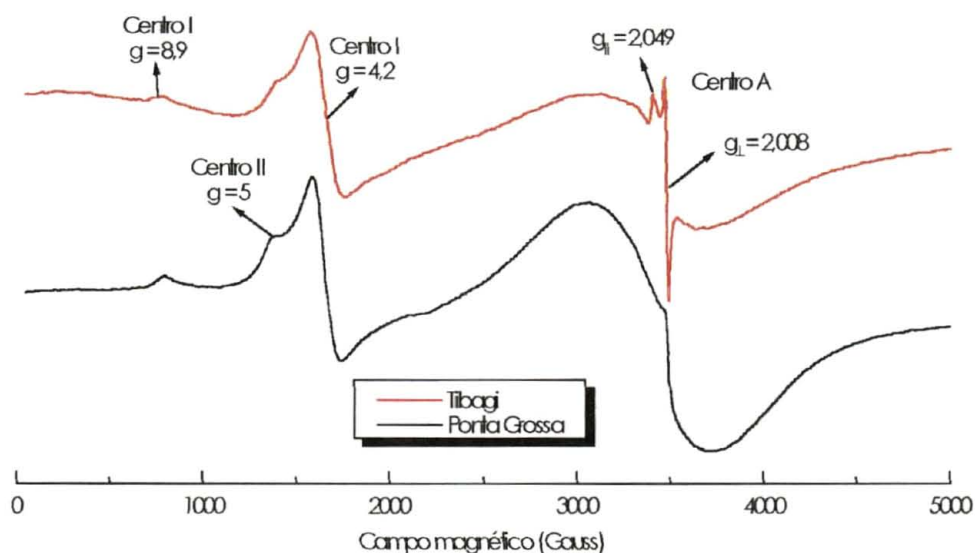
Ponta Grossa (ROUXHET et al., 1977; PROST et al., 1989; RUSSELL e FRASER, 1994, p. 18-21). Outras bandas típicas de caulinita ficam em 937 e 915 cm^{-1} (RUSSELL e FRASER, 1994, p. 21).

Gibbsita bem cristalizada (3378, 3396, 3530 e 3450 cm^{-1}) (figura 7) foi também facilmente identificados por IVTF (RUSSELL e FRASER, 1994, p. 49).

II.3.4 ESPECTROSCOPIA DE RPE

Os espectros de RPE das amostras de argila provenientes de Ponta grossa e Tibagi são dados na figura 8.

FIGURA 8 - ESPECTRO DE RPE DAS AMOSTRAS DE ARGILAS PROVENIENTES DE PONTA GROSSA E TIBAGI. POTÊNCIA DE MICROONDAS: 2 mW (20dB), VARREDURA DE CAMPO: 5000 G, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 1 G, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K)

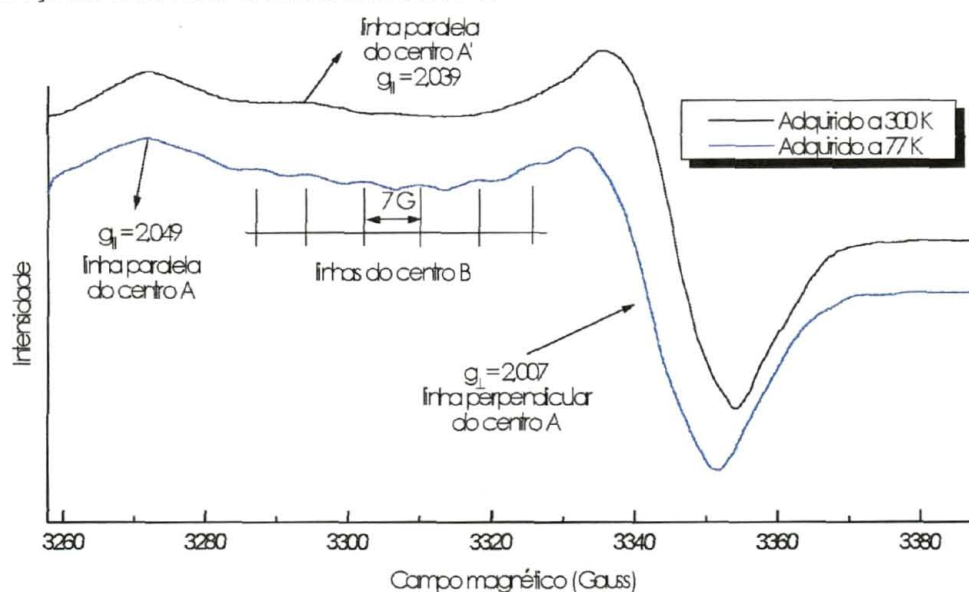


Os sinais de RPE comuns a todas as amostras foram: uma linha larga em $g \approx 2$, devido à interação dipolar (GOODMAN e HALL, 1994, p.191), indicando a presença de impurezas de Fe associadas às argilas, linhas centradas em $g \approx 4,2$ e em $g \approx 8,9$ (centro I, figura 8), as quais são atribuídas a íons Fe^{3+} em sítio onde a

relação entre os parâmetros de campo cristalino E (distorção rômbrica) e D (distorção axial), definidos por $\lambda=E/D$ igual a $1/3$, ou seja, com máxima distorção rômbrica (MEADS e MALDEN, 1975), e outras duas linhas em $g \cong 5$ e $g \cong 3,5$ (centro II, figura 8) que podem ser atribuídas a Fe^{3+} em sítio com a relação $\lambda=1/4$, ou seja de maior simetria, com distorção rômbrica tendendo para axial (AASA, 1970). GOODMAN e HALL (1994, p. 202) afirmam que, especialmente o centro I está associado a defeitos na estrutura das caulinitas ou ruptura de pontes de H entre camadas, comum a caulinitas Fe-substituídas, pobremente ordenadas, típicas de Oxisolos.

CLOZEL et al. (1994), afirmaram que caulinitas apresentam ainda outros centros paramagnéticos denominados A (figura 8), A' e B (figura 9), cujos sinais só foram resolvidos na amostra proveniente de Tibagi. O centro A é caracterizado por um dubleto de linhas com simetria axial e com $g_{\parallel} = 2,049$ e $g_{\perp} = 2,007$, oriundo provavelmente da deficiência de um elétron localizado em um átomo de oxigênio apical, ligado a Si (Si-O), e com o eixo z orientado perpendicularmente ao plano ab (MULLER et al., 1990). O centro A' possui também simetria axial com $g_{\parallel} = 2,039$ e g_{\perp} não resolvido pela pequena intensidade deste sinal mas, possivelmente com valor análogo ao do centro A, ou seja $g_{\perp} \cong 2,009$. Este sinal é atribuído a um segundo tipo de "buraco de elétron" em sítio Si-O, porém este com o eixo z contido no plano ab (CLOZEL et al., 1994). O centro B corresponde a um multiplete na região de $g = 2$, e com constante de interação superhiperfina, $A = 7$ gauss, resolvido a 77K (figura 9). A existência deste centro B indica deficiência eletrônica num átomo de oxigênio, ligado a dois átomos de alumínio (^{27}Al , spin nuclear $I = 5/2$) adjacentes e em simetria octaédrica ($Al_{VI}-O-Al_{VI}$) (CLOZEL et al., 1995).

FIGURA 9 - ESPECTRO DE RPE DA AMOSTRA DE ARGILA PROVENIENTE DE TIBAGI. POTÊNCIA DE MICROONDAS: 20 mW (10dB), VARREDURA DE CAMPO: 150 G, REGIÃO DE $g = 2$, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 2 G, TEMPERATURA: 300 E 77 K



Embora a existência dos centros A, A' e B (figura 9) dependa de substituições isomórficas apropriadas, eles não são observados até que os minerais tenham sido expostos à radiação de alta energia. A presença do centro A sugere a exposição desta argila a alguma fonte de radiação natural durante o período de formação destes minerais, possivelmente urânio e/ou tório, especialmente pela grande capacidade dos géis férricos em adsorver urânio ou outros radionuclídeos, mesmo em baixas concentrações. Já o centro A' só ocorre, em quantidades apreciáveis, em caulinitas coexistindo ainda com minerais de urânio (MULLER et al., 1990).

Clozel et al. (1994, 1995), a partir de medidas em Banda-X, Banda-Q e simulações, determinaram os seguintes valores para os centros paramagnéticos de caulinitas na região de $g = 2$: (a) centro A ($g_z = 2,0490 \pm 0,0005$, $g_y = 2,006 \pm 0,001$ e $g_x = 2,001 \pm 0,001$) atribuído à um centro Si-O⁻ com simetria quase ortorrômbica, com o eixo z próximo à direção c; (b) centro A' ($g_{||} = 2,039 \pm 0,002$ e $g_{\perp} = 2,008 \pm 0,001$) atribuído à um centro Si-O⁻ com simetria axial, com o eixo z perpendicular ao

plano (ab) e (c) centro B ($g_1 = 2,040 \pm 0,0005$, $g_2 = 2,020 \pm 0,0005$ e $g_3 = 2,002 \pm 001$) atribuído à um buraco de elétron sobre a ligação oxigênio-alumínio em posições octaédricas adjacentes ($Al_{VI}-O-Al_{VI}$).

A não observação dos centros A, A' e B na amostra de Ponta Grossa pode ser devido à menor quantidade de caulinita, assim como à sua menor cristalinidade, pois há uma relação direta entre a cristalinidade da caulinita e a concentração do centro A (CUTLER, 1980).

II.4 ANÁLISE FATORIAL

II.4.1 METODOLOGIA

A análise estatística dos dados foi efetuada por métodos multivariados (análise fatorial) utilizando-se o programa STATISTICA® for Windows®.

Para o reconhecimento da estrutura dos dados estes foram padronizados e com base na matriz de correlação é possível o cálculo de novas variáveis artificiais e independentes (fatores) o que reduz a dimensão do grupo de dados, ou seja o número de variáveis, mas mantém a variância total. Os carregamentos calculados para as variáveis originais podem ser considerados como o coeficiente de correlação entre as variáveis e o fator relacionado. Além do mais, estes carregamentos indicam quais variáveis são intercorrelacionadas dentro do fator. A obtenção destes carregamentos permite uma discussão da intercorrelação entre um grande grupo de variáveis (Schulten et al., 1990). Com o objetivo de obter um claro padrão para os carregamentos, isto é, identificar a estrutura dos dados

através do “agrupamento” das variáveis originais em fatores de modo que estas apresentem altos carregamentos apenas dentro de um determinado fator e baixos nos demais, é feita a rotação varimax, que equivale à maximizar a variância na coluna da matriz de carregamentos normalizados. Este é o método de rotação mais utilizado.

II.4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tabela 3 mostra as características químicas e conteúdo de argila dos solos estudados.

Não se observou grandes diferenças no conteúdo de C orgânico (C_o) entre os solos cultivados e não cultivados. No Paraná, a degradação da matéria orgânica do solo devido ao cultivo tem sido bem documentada (IAPAR, 1979; SIDIRAS e PAVAN, 1986; CASTRO FILHO et al., 1991; MACHADO e GERZABEK, 1993). Entretanto, o manejo conservacionista do solo, como por exemplo com a adoção do plantio direto, pode resultar na manutenção ou mesmo aumento da quantidade de matéria orgânica do solo (HAVLIN e SCHLEGEL, 1989; KARLEN, 1989), porém este efeito nem sempre é observado (STALEY, et al., 1988; LIMA et al., 1994; FRANZLUEBBERS e ARSHAD, 1996). HAVLIN et al. (1990) demonstraram que o efeito de diferentes sistemas de cultivo sob a matéria orgânica do solo pode estar relacionado à textura do solo e/ou rotação de culturas. Os solos não cultivados eram ácidos, e pobres em bases e P. Isto reflete a condição original dos solos nesta região do Paraná (“Campos Gerais”). Calagem e fertilização deste solo originalmente pobre leva à maior produção de resíduos vegetais, minimizando os

efeitos do cultivo na redução da quantidade de C_o (MAPLES, 1989; REICOSKY et al., 1997). A diminuição do conteúdo de C_o , na área estudada, devido ao manejo mais intenso do solo com o cultivo mínimo foi relativamente pequeno e concorda com os dados de LIMA et al. (1994).

TABELA 3 - ANÁLISE QUÍMICA DE ROTINA E CONTEÚDO DE ARGILA DOS SOLOS ESTUDADOS

Amostra	pH CaCl ₂	Alcmol _c dm ⁻³	H+Al*cmol _c dm ⁻³	Ca+Mgcmol _c dm ⁻³	Ca ⁺cmol _c dm ⁻³	K	P ^o μg g ⁻¹	C _o g dm ⁻³	Argila g kg ⁻¹
CN1**	4,1	3,0	15,2	1,4	0,7	0,26	2	38	600
CN2	3,9	3,0	14,1	0,6	<1	0,16	1	31	580
CN3	3,9	2,6	13,1	0,5	<1	0,12	1	27	600
CN4	4,3	2,0	11,3	0,5	<1	0,08	1	15	520
F1	4,1	3,1	13,1	0,6	<1	0,14	1	37	380
F2	4,1	1,8	11,3	0,3	<1	0,09	1	21	380
F3	4,2	1,5	10,5	0,4	<1	0,04	1	21	340
F4	4,2	1,0	9,0	0,3	<1	0,02	1	14	400
PD1	5,0	0,1	5,0	8,6	5,8	0,50	13	37	340
PD2	4,9	0,2	6,7	5,0	2,9	0,25	4	25	360
PD3	4,5	0,5	8,4	2,3	1,0	0,18	2	21	380
PD4	4,6	0,4	7,8	1,8	0,9	0,10	1	15	400
CM1	5,1	0,1	6,2	6,8	4,5	0,56	19	32	320
CM2	5,2	0,1	5,8	5,7	3,6	0,31	8	29	380
CM3	4,9	0,2	6,2	4,1	2,5	0,24	2	23	400
CM4	4,8	0,3	6,2	1,5	0,8	0,10	1	15	460

H+Al*: Método SMP.

Ca⁺: Ca < 1,0 quando Ca+Mg ≤ 1,0.

P^o: P extraível por Mehlich.

CN** = Campo nativo.

F = Reflorestamento de eucalipto.

PD = Plantio direto.

CM = Cultivo mínimo.

1 = 0 - 5 cm; 2 = 5 - 10 cm; 3 = 10 - 20 cm e 4 = 20 - 50 cm.

Observou-se uma ligeira acumulação de C_o na camada superficial (0 - 5 cm) dos solos sob reflorestamento e plantio direto em relação à área sob cultivo mínimo, o que é suportado por dados da literatura (STEVENSON, 1982, p. 5; STALEY et al., 1988; HAVLIN, et al., 1990; MERTEN e MIELNICZUK, 1991; BEYER et al., 1992).

Os resultados da análise fatorial efetuada com os dados das análises granulométrica e química de rotina indicaram a possibilidade de reduzir o grupo de variáveis, utilizando-se o método de Kaiser, para três dimensões sem perda de

muita informação, pois estes três fatores foram responsáveis por 94 % da variância explicada. Após a rotação varimax foi possível a identificação destes fatores (tabela 4): o primeiro fator foi o cultivo; o segundo foi a matéria orgânica do solo (MOS) e o último foi a textura ou local.

TABELA 4 - CARREGAMENTOS DOS FATORES CALCULADOS À PARTIR DAS ANÁLISES GRANULOMÉTRICA E QUÍMICA DOS SOLOS, EXTRAÇÃO DOS FATORES PELO MÉTODO DE KAISER, ROTAÇÃO VARIMAX NORMALIZADA

Variável	Fator Cultivo	Fator MOS	Fator Textura
pH	0,913972†	-0,093859	-0,308275
Al	-0,788403†	0,403119	0,421475
H+Al	-0,818417†	0,332166	0,433095
Ca+Mg	0,918034†	0,307894	-0,197431
K	0,804182†	0,539764	-0,020550
P	0,800675†	0,337225	-0,128004
C _o (WB) *	0,182209	0,956525†	0,184663
C _t (CE) †	0,015031	0,951471†	0,203924
N _t †	0,313093	0,893922†	0,254849
C _t /N _t †	-0,790558†	-0,459367	-0,317206
C (H) †	-0,120110	0,924879†	-0,133447
N (H) †	0,585940	0,708533†	-0,252833
C/N (H) †	-0,941657†	-0,137505	0,238770
Argila	-0,374245	0,074420	0,907292†
Areia	0,200408	-0,100899	-0,967807†
Variância explicada	6,438436	5,003913	2,655860
Proporção da total	0,429229	0,333594	0,177057

* C_o determinado pelo método Walk-Black.

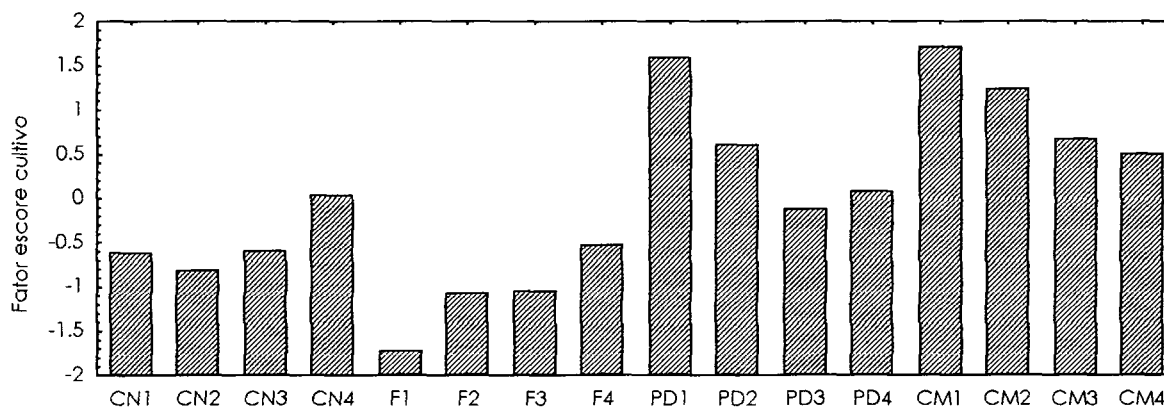
† C e N totais e do húmus (H) determinados por combustão via seca (Carlo Erba).

‡ Carregamentos marcados são > 0,7.

O fator cultivo foi caracterizado por: aumento do pH, e das concentrações de Ca e Mg e diminuição da concentração de Al e H+Al. Isto pode ser atribuído à calagem; aumento da concentração de K e P e diminuição da relação C/N total e da relação C/N do húmus extraído por pirofosfato, que pode ser atribuído à fertilização. O fator MOS foi caracterizado por: aumento da concentração de C e N total e C e N do húmus extraído por pirofosfato. E o fator textura ou local foi caracterizado por aumento do conteúdo de argila e diminuição do conteúdo de areia.

A figura 10 indica que o efeito do cultivo foi equivalente entre plantio direto e cultivo mínimo somente na primeira profundidade (0-5 cm).

FIGURA 10 - FATOR ESCORE CULTIVO CALCULADO À PARTIR DOS DADOS DAS ANÁLISES GRANULOMÉTRICA E QUÍMICA DE ROTINA, EXTRAÇÃO DOS FATORES PELO MÉTODO DE KAISER, ROTAÇÃO VARIMAX NORMALIZADA



CN = Campo nativo.

F = Reflorestamento de eucalipto.

PD = Plantio direto.

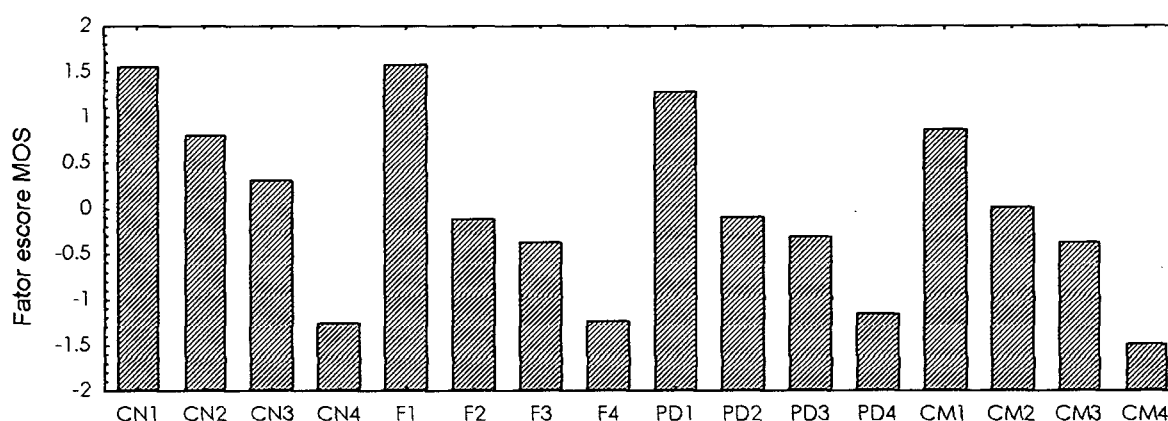
CM = Cultivo mínimo.

1 = 0 - 5 cm; 2 = 5 - 10 cm; 3 = 10 - 20 cm e 4 = 20 - 50 cm.

O fator escore cultivo diminuiu rapidamente com a profundidade no plantio direto e estabilizou-se na terceira profundidade (10-20 cm). Já sob cultivo mínimo observou-se uma contínua diminuição deste fator escore com a profundidade. Entretanto maiores valores foram observados sob cultivo mínimo em relação a plantio direto. O aparente aumento deste fator com a profundidade sob reflorestamento pode ter sido causado por uma diminuição da concentração de Al e H+Al no perfil. O aumento da acidez potencial (H+Al) nas camadas mais superficiais pode ser devido à maior concentração de matéria orgânica pobre em bases nestas camadas, pois HAAG et al. (1961) mostraram que a grande maioria dos nutrientes é exportada como madeira pelo eucalipto.

Observou-se uma relação inversa entre o fator MOS e a profundidade amostrada (figura 11). O solo sob campo nativo apresentou uma distribuição mais uniforme da matéria orgânica do solo no perfil quando comparado com o acúmulo superficial da área sob reflorestamento. Este dado está de acordo com os dados da literatura e é atribuído à maneira como os restos vegetais de solos sob florestas são misturados com a matéria mineral (STEVENSON, 1982, p. 5) e à distribuição mais uniforme do sistema radicular de gramíneas no perfil do solo. O conteúdo de matéria orgânica do solo na parcela sob plantio direto é maior do que na parcela sob cultivo mínimo nas duas primeiras camadas amostradas (0-5 e 5-10 cm). Isto confirma os relatos de acúmulo superficial da matéria orgânica do solo sob plantio direto (STALEY et al., 1988; HAVLIN et al., 1990; MERTEN e MIELNICZUK, 1991; ANGERS et al., 1997; BAYER e MIELNICZUK, 1997; LAL, 1997; NOVOTNY et al., 1997a).

FIGURA 11 - FATOR ESCORE MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO (MOS) CALCULADO À PARTIR DOS DADOS DAS ANÁLISES GRANULOMÉTRICA E QUÍMICA DE ROTINA, EXTRAÇÃO DOS FATORES PELO MÉTODO DE KAISER, ROTAÇÃO VARIMAX NORMALIZADA



CN = Campo nativo.

F = Reflorestamento de eucalipto.

PD = Plantio direto.

CM = Cultivo mínimo.

1 = 0 - 5 cm; 2 = 5 - 10 cm; 3 = 10 - 20 cm e 4 = 20 - 50 cm.

CAPÍTULO III: RESPOSTA DO HÚMUS DO SOLO EXTRAÍDO POR
PIROFOSFATO DE SÓDIO E FRACIONADO POR CE-VPC A DIFERENTES
SISTEMAS DE MANEJO DO SOLO

III.1 MATERIAL E MÉTODOS

O húmus do solo foi extraído com uma solução de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Este extrator é considerado brando quando comparado a soluções de NaOH (STEVENSON, 1982, p. 39).

Para a extração foram usados 10 g de solo e 50 mL da solução de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Esta mistura foi mantida sob agitação em agitador orbital ajustado a 200 rpm durante 16 h e então centrifugada a 17000 g por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro faixa preta - 589¹ e completado com água bidestilada até 100 mL. O extrato assim obtido foi analisado colorimetricamente medindo-se a absorbância (abs.) em 400 nm ($E_4\text{Hu}$) e 600 nm ($E_6\text{Hu}$) em uma solução a pH 10 utilizando-se 5 mL do extrato em 5 mL de uma solução tampão de glicina-NaOH (GERZABEK et al., 1993, p.107-109). Outros 5 mL do extrato foram acidificados a pH \cong 2 com HCl e o AH precipitado e AF dissolvido foram separados por centrifugação a 17000 g por 10 min. O AH foi redissolvido com 10 mL da solução tampão de glicina-NaOH e analisado colorimetricamente ($E_4\text{AH}$ e $E_6\text{AH}$).

Como a abs. do extrato de SH de solos coincide com a soma das abs. do AH e AF, e as diferenças podem ser explicadas por perdas de AH durante a separação e no todo os desvios podem ser negligenciados (ORLOV, 1986, p.147-149), estimou-se a $E_4\text{AF}$ por diferença: $E_4\text{AF} = E_4\text{Hu} - E_4\text{AH}$. Calculou-se a abs. g^{-1} de solo ($E_4\text{Hu} * 20$)

como uma estimativa da quantidade de SH, abs. g⁻¹ de C orgânico ($E_4H_u * 2000 / \% C_o$) e a relação AF/AH (E_4AH/E_4AF). O restante do extrato foi congelado.

A extração e análise colorimétrica foi repetida três vezes na mesma amostra de solo (sequencialmente), e os extratos foram adicionados ao extrato congelado proveniente da primeira extração, congelados e ao final liofilizados e armazenados em dessecadores com sílica gel até serem utilizados para as análises cromatográficas.

A cromatografia foi efetuada de acordo com MACHADO e GERZABEK (1993). Uma coluna (Chromodul-columns, Hölzen, Germany) com 18 mm de diâmetro interno e 1000 mm de comprimento foi empacotada com vidro de porosidade controlada ("controlled pore glass" - CPG, Electronucleonics, Fairfield, NJ) de 120-200 mesh e um diâmetro de poros de 17,7 nm. O problema com gases dissolvidos foi minimizado utilizando-se o eluente evacuado. Este era uma solução de tetraborato de sódio ($Na_4B_2O_7$) 0,02 mol L⁻¹ e cloreto de sódio (NaCl) 0,05 mol L⁻¹ que resultava numa solução tamponada com valor de pH próximo a 9. Os parâmetros de calibração volume total (V_t) e volume morto (V_o) foram calculados para a coluna utilizada e estes valores foram determinados pela eluição de 3 mL de uma solução teste contendo 0,5 % de "blue dextran 2000" (peso molecular, PM = 2×10^6 ; Pharmacia) e 1 % de uma solução alcoólica de fenolftaleína a 0,1 % (PM = 318,3). A eluição foi efetuada a um fluxo constante de 1,5 mL min⁻¹ e obtinha-se o cromatograma medindo-se a absorvância do eluato em 554 nm com um espectrofotômetro equipado com uma célula de fluxo e um "plotter".

Não calibrou-se a coluna utilizada com padrões de diferentes PM pois CAMERON et al. (1972) mostraram que o comportamento hidrodinâmico de AH é

diferente daquele de proteínas globulares e dextranas usados na calibração de colunas cromatográficas de permeação em gel e, como a MOS é uma mistura de diversas substâncias com diferentes geometrias moleculares, pode-se esperar que cada grupo de compostos teria uma relação diferente entre $\log(PM)$ e K_d (KUITERS e MULDER, 1993).

Parte do extrato liofilizado (1/5 da massa total) foi redissolvido em 10 mL do eluente e então centrifugado a 17000 g por 10 min. O sobrenadante foi separado e 3 mL deste foi injetado na coluna. Seus cromatogramas de distribuição de tamanho molecular foram medidos a 400 nm com um espectrofotômetro equipado com uma célula de fluxo e um "plotter", os dados foram convertidos para absorvância por grama de solo (abs. g^{-1} de solo).

O valor K_d dos cromatogramas, como uma medida do tamanho molecular, foram calculados por:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (7)$$

Onde V_e é o volume eluído, V_0 é o volume morto e V_t o volume total.

O fracionamento foi efetuado coletando-se o eluato em diferentes classes de valor K_d , classes estas determinadas baseando-se na deconvolução dos picos de cromatogramas previamente obtidos. Estas classes foram em valores K_d : -0,07 a 0,09 (substâncias macro-húmicas); 0,09 a 0,46 (substâncias meso-húmicas); 0,46 a 0,88 (substâncias micro-húmicas) e 0,88 a 1,2 (substâncias não húmicas). Os valores E_4 e E_6 das frações húmicas foram medidos.

O extrato da amostra campo nativo (20-50 cm), amostra selecionada ao acaso, foi quimicamente fracionado antes da caracterização cromatográfica. Este

fracionamento foi baseado em DANNEBERG e ULLAH (1982). Uma alíquota do extrato liofilizado foi dissolvido em 25 mL de uma solução de NaOH a pH 10 e então centrifugado a 17000 g por 10 min. O sobrenadante foi separado e 10 mL deste foi acidificado a pH \cong 2 com HCl; o AH precipitado e o AF dissolvido foram separados por centrifugação a 17000 g por 10 min. O AF foi liofilizado e redissolvido em 10 mL do eluente para a cromatografia.

Outra alíquota de 10 mL do extrato foi tratado com 1,2 g de NaCl. O AH cinza precipitado e o AH marrom e AF dissolvidos foram separados por centrifugação a 17000 g por 10 min. O AH cinza foi redissolvido em 10 mL do eluente para a cromatografia. A mistura de AH marrom e AF foi acidificada a pH \cong 2 com HCl e centrifugada a 17000 g por 10 min e o AH marrom precipitado foi redissolvido em 10 mL do eluente para a cromatografia.

Os espectros de IVTF das frações cromatográficas foram adquiridos utilizando-se cartões descartáveis com filme de polietileno (3M Disposable IR Card, Type 61) como base para as amostras. Estes foram adquiridos em equipamento Perkin Elmer System 2000 FT-IR somando-se 20 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} , numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

As frações cromatográficas húmicas (macro, meso e micro-húmicas) da amostra reflorestamento (10-20 cm), amostra selecionada ao acaso, foram submetidas a um ensaio com sucessivas centrifugações a 37000 g com o intuito de reduzir a quantidade de contaminantes minerais observados por IVTF na fração macro-húmica e verificar se estes contaminantes interferiam no valor da relação E_4/E_6 . Mediu-se os valores E_4 e E_6 destas frações antes e após a centrifugação da amostra por 10, 20 e 60 min a 37000 g.

Após 60 min de centrifugação preparou-se amostras para análises por IVTF com o sobrenadante e o precipitado. Parte do sobrenadante foi acidificado a $\text{pH} \cong 2$ com HCl e o material precipitado, separado por centrifugação a 37000 g por 10 min, foi redissolvido em uma solução de NaHCO_3 a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e preparado para análise por IVTF.

A análise matemática dos cromatogramas foi efetuada pela deconvolução dos mesmos (modelo Lorentziano) utilizando-se o programa Microcal-Origin[®], o ajuste foi testado calculando-se o valor χ^2 . A avaliação estatística dos dados foi efetuada através da análise de correlação de Pearson, utilizando-se os escores fatoriais, calculados no capítulo II.4, como variáveis preditoras, estas análises foram efetuadas com o auxílio do programa STATISTICA[®] for Windows[®].

III.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.2.1 EXTRAÇÃO E CROMATOGRÁFIA DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

Embora a quantidade de matéria orgânica do solo fosse praticamente a mesma entre os diferentes sistemas de manejo, a quantidade de SH extraída por pirofosfato foi claramente diferenciada entre os sistemas, principalmente nas duas camadas mais superficiais (figura 12).

A intensidade de humificação da matéria orgânica do solo, expressa pela abs. g^{-1} de C_o (GERZABEK e ULLAH, 1989), foi muito maior para a matéria orgânica do solo extraída da área sob reflorestamento em relação às demais, e nestas aumenta com a profundidade (figura 13).

FIGURA 12 - ABSORBÂNCIA EM 400 nm POR GRAMA DE SOLO DO HÚMUS EXTRAÍDO POR $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ A $0,02 \text{ mol L}^{-1}$

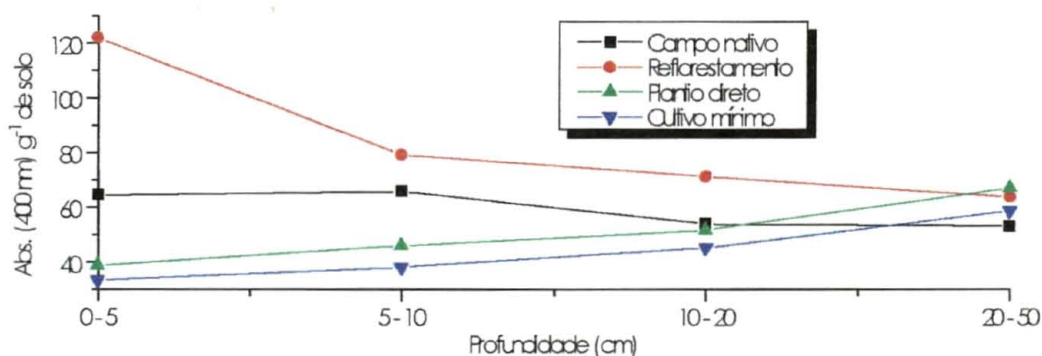
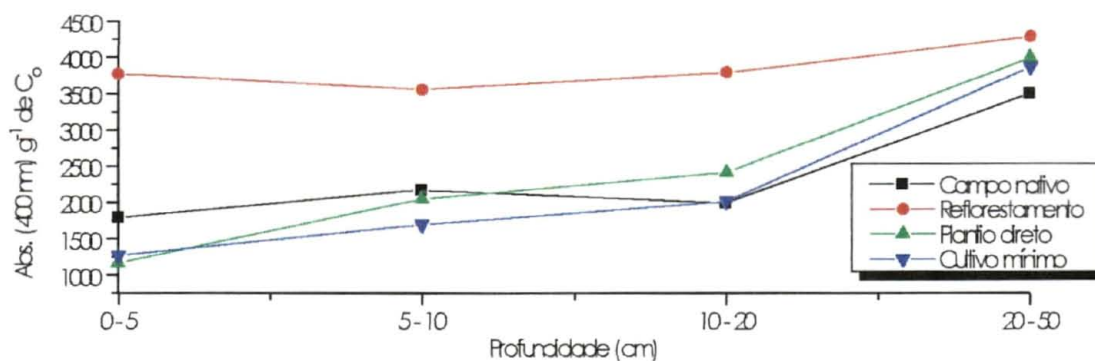
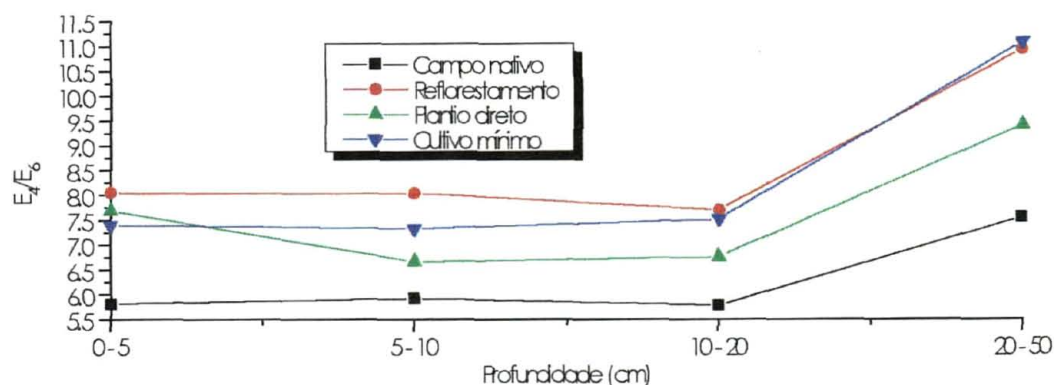


FIGURA 13 - ABSORBÂNCIA EM 400 nm POR GRAMA DE CARBONO ORGÂNICO DO HÚMUS EXTRAÍDO POR $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ A $0,02 \text{ mol L}^{-1}$



A baixa absorvância da matéria orgânica do solo proveniente das camadas mais superficiais é devido ao enriquecimento destas camadas com resíduos orgânicos frescos e a presença de, comparativamente, SH "juvenis" (ORLOV, 1986, p. 157). A maior intensidade de humificação em áreas sob eucalipto comparativamente a solos cultivados concordam com os dados obtidos por MACHADO e GERZABEK (1993).

Os altos valores para a relação E_4/E_6 do húmus extraído dos solos estudados (figura 14) concordam com os dados de BRAVARD e RIGHI (1991) que afirmaram que em latossolos o valor da relação E_4/E_6 é alto tanto para o AH como para o AF, devido provavelmente à alta alifaticidade das SH encontradas nestes solos.

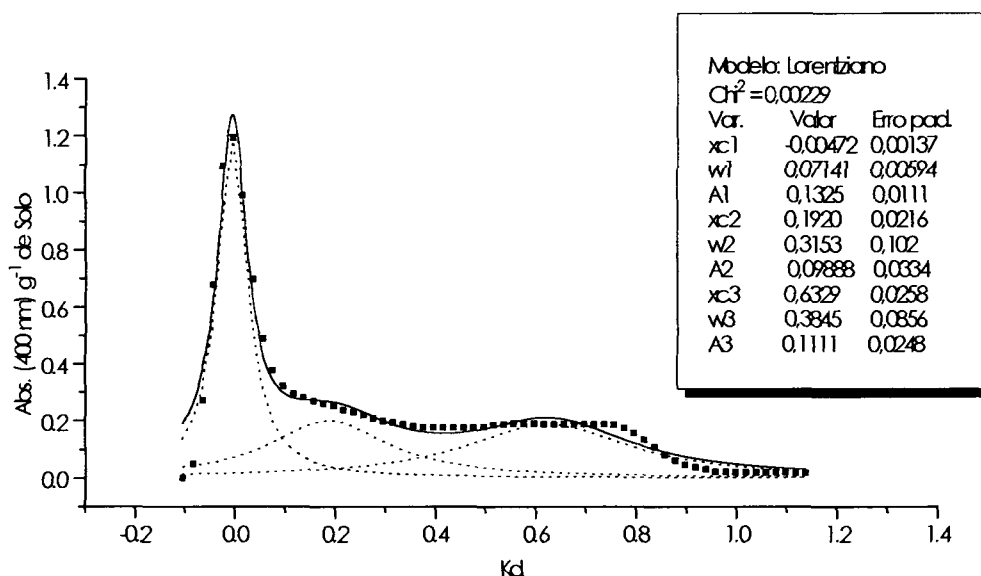
FIGURA 14 - RELAÇÃO E_4/E_6 DO HÚMUS EXTRAÍDO POR $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ A $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ 

O húmus extraído da área sob campo nativo apresentou a menor relação E_4/E_6 , isto pode ser devido à maior conjugação dos anéis aromáticos das SH (KONONOVA, 1966, p. 404) formadas sob estas condições ou ao maior peso molecular destas, visto que CHEN et al. (1977) afirmaram que a relação E_4/E_6 é principalmente controlada pelo tamanho ou peso molecular das SH, onde altos valores da relação E_4/E_6 refletem SH de pequeno tamanho e/ou baixo peso molecular.

A relação E_4/E_6 do húmus extraído da camada mais profunda (20-50 cm) foi maior, indicando que as SH lixiviadas foram, principalmente, as com menor conjugação dos anéis aromáticos ou de menor peso molecular.

O cromatograma do AH cinza e sua deconvolução matemática é dado na figura 15. Este cromatograma foi caracterizado por três picos, o primeiro pico com um K_d de aproximadamente 0,0 (substâncias macro-húmicas), o segundo pico com um K_d de 0,19 (substâncias meso-húmicas) e o terceiro com um K_d de 0,63 (substâncias micro-húmicas).

FIGURA 15 - CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g⁻¹ DE SOLO DO AH CINZA EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR Na₄P₂O₇ A 0,02 mol L⁻¹



Onde: xc: centro do pico
w: largura do pico à meia altura
A: área sob o pico
1, 2 e 3: primeiro, segundo e terceiro picos.

Sugere-se a seguinte interpretação para os parâmetros ajustados:

- Centro do pico (xc): medida do tamanho molecular (relação inversa).
- Largura do pico à meia altura (w): medida da homogeneidade da distribuição de tamanhos moleculares (relação inversa).
- Área sob o pico (A): medida quantitativa da fração (relação direta).

A fração macro-húmica apresentou uma relação E₄/E₆ de 18,5 (tabela 5). Como esta é a fração com maior tamanho molecular, o alto valor da relação E₄/E₆ não concorda com as conclusões de CHEN et al. (1977) que afirmaram que a relação E₄/E₆ é principalmente controlada pelo tamanho ou peso molecular das SH, numa relação inversa, e os estudos de BAES e BLOOM (1990) demonstraram que as SH não apresentam propriedades de espalhamento da luz, e por isto a relação E₄/E₆ não seria controlada pelo tamanho molecular.

TABELA 5 - RELAÇÃO E_4/E_6 DAS SH EXTRAÍDAS DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20-50 cm) POR PIROFOSFATO E FRACIONADAS QUIMICAMENTE, FISICAMENTE POR CE-VPC E AMBOS OS MÉTODOS SEQUENCIALMENTE

		Frações químicas*		
		AHC	AHM	AF
<i>Total†</i>		7,2	5,0	13,4
Frações	Macro-húmica	18,5	-	-
Físicas	Meso-húmica	8,2	-	-
(CE-VPC)	Micro-húmica	3,5	5,1	15,0
<i>Média ponderada**</i>		7,5	5,1	15,0

Frações químicas*: AHC: AH cinza; AHM: AH marrom e AF: AF.

Total†: Relação E_4/E_6 das frações químicas da amostra CN4 antes da cromatografia.

Média ponderada**: A massa da fração foi o peso para as médias dos valores E_4 e E_6 da amostra CN4 fracionada quimicamente e fisicamente.

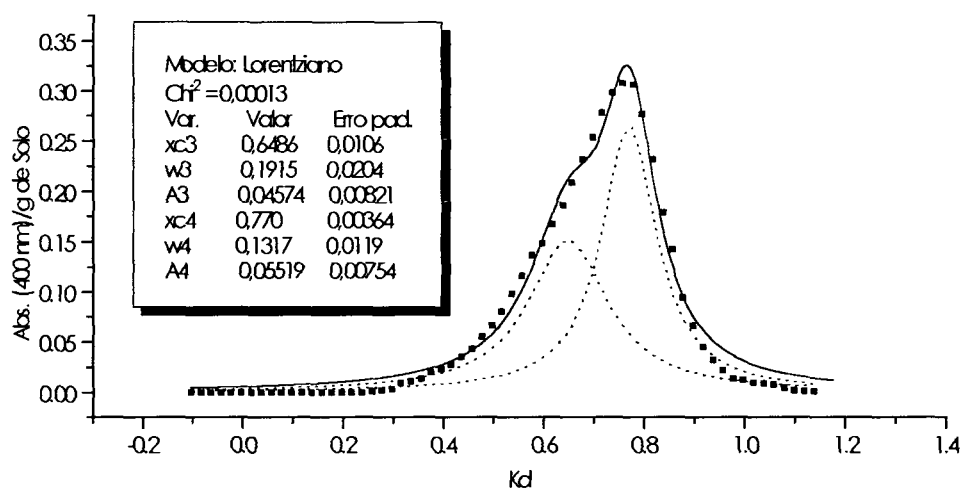
Este alto valor para a relação E_4/E_6 pode ser relacionado a uma baixa conjugação dos anéis aromáticos (KONONOVA, 1966, p. 404) nesta primeira fração do AH cinza.

A relação inversa entre tamanho molecular da fração e relação E_4/E_6 do AH cinza (tabela 5) pode ser explicada pelo encontrado por KONONOVA (1966, p. 102). A primeira fração precipitou com o eletrólito, provavelmente devido ao seu grande tamanho molecular. As demais moléculas (que apresentavam aumento do valor K_d) precipitariam, provavelmente devido ao aumento da conjugação dos anéis aromáticos, pois KONONOVA (1966, p. 102) reportou que o aumento da aromaticidade facilita a coagulação das SH por eletrólitos. Isto é confirmado pela diminuição da relação E_4/E_6 .

Pelas medidas da relação E_4/E_6 pode-se concluir que o AH cinza não é uma fração homogênea, mas sim, uma mistura de no mínimo duas frações com diferentes características de absorção de luz na região do visível. Torna-se aparente que o fracionamento cromatográfico seria uma técnica apropriada para isolar estas diferentes frações.

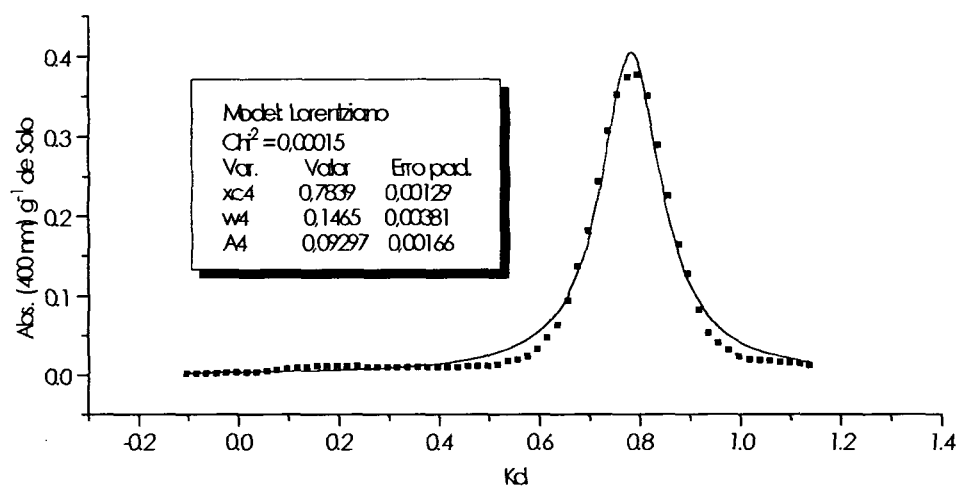
O cromatograma do AH marrom (figura 16) foi caracterizado por um pico centrado num valor $K_d = 0,65$ e outro em $0,77$. O cromatograma do AF (figura 17) foi caracterizado por apenas um pico centrado em $0,78$.

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g^{-1} DE SOLO DO AH MARROM EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR $Na_4P_2O_7$ A $0,02 mol L^{-1}$



Onde: xc: centro do pico
w: largura do pico à meia altura
A: área sob o pico
3 e 4: terceiro e quarto picos.

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g^{-1} DE SOLO DO AF EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR $Na_4P_2O_7$ A $0,02 mol L^{-1}$



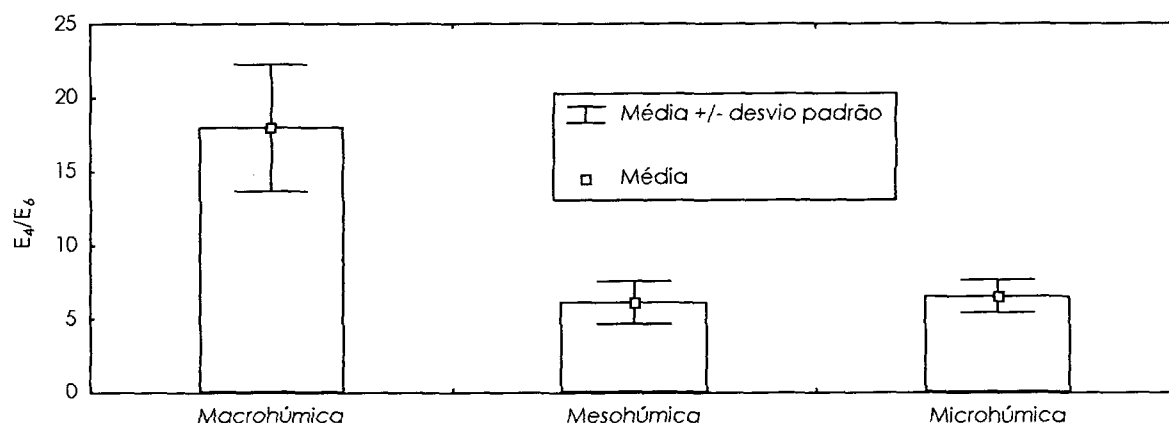
Onde: xc4: centro do quarto pico
w4: largura do quarto pico à meia altura
A4: área sob o quarto pico.

Todas estas porções do húmus caracterizadas por estes picos foram coletadas na terceira fração (Kd entre 0,46 a 0,88). A soma dos cromatogramas de cada fração química ajustou-se muito bem ao cromatograma do extrato total ($R = 0,99$). Os dados da tabela 5 confirmam as conclusões a respeito do comportamento do AH cinza. Embora o AH marrom tenha uma grande porção com tamanho molecular similar ao do AF, ele seria precipitado pela acidificação da solução provavelmente devido à maior conjugação, visto que apresentava um baixo valor da relação E_4/E_6 .

A partir dos dados da tabela 5 e figuras 15, 16 e 17 pode-se concluir que as frações macro-húmicas e meso-húmicas são porções distintas do AH cinza, e a fração micro-húmica é uma mistura de uma pequena porção do AH cinza, e a totalidade do AH marrom e AF.

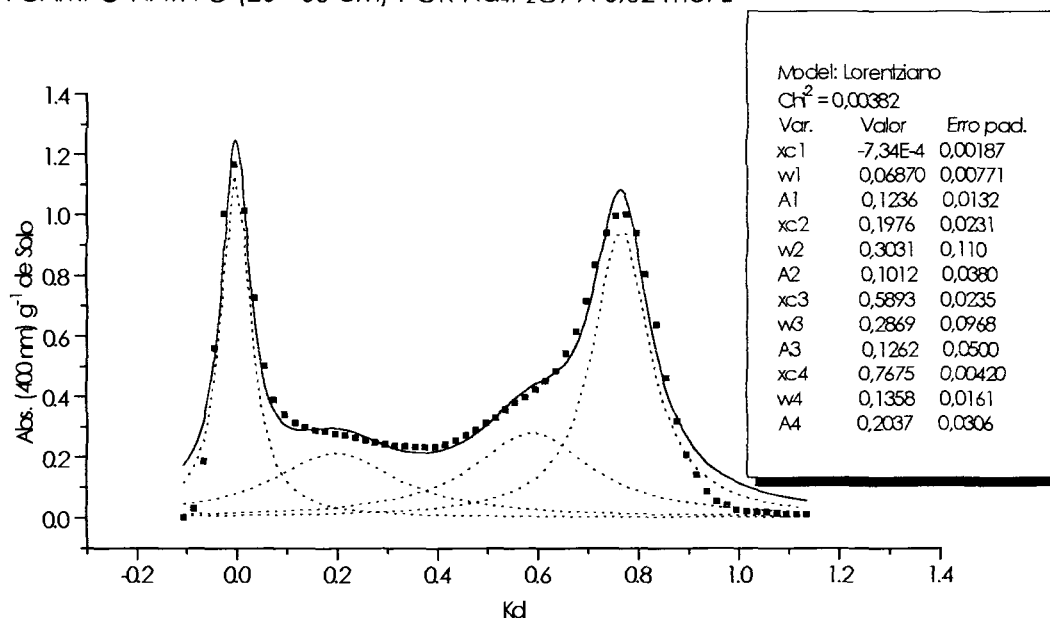
O alto valor da relação E_4/E_6 da fração macro-húmica foi observado em todas as amostras analisadas (figura 18).

FIGURA 18 - VALORES MÉDIOS DA RELAÇÃO E_4/E_6 DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS SH EXTRAÍDAS POR $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ A $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ DE TODAS AS AMOSTRAS



A figura 19 mostra o cromatograma e deconvolução do extrato total da amostra campo nativo (20-50 cm). Os parâmetros ajustados para este e todos os demais cromatogramas são dados na tabela 6.

FIGURA 19 - CROMATOGRAMA EM ABS. (400 nm) g⁻¹ DE SOLO DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (20 - 50 cm) POR Na₄P₂O₇ A 0,02 mol L⁻¹



Onde: xc: centro do pico
w: largura do pico à meia altura
A: área sob o pico
1, 2, 3 e 4: primeiro, segundo, terceiro e quarto picos.

TABELA 6 - PARÂMETROS AJUSTADOS DA DECONVULÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DO HÚMUS EXTRAÍDO POR PIROFOSFATO

Amostra	Parâmetros ajustados							
	xc1	A1	xc2	A2	xc3	A3	xc4	A4
CN ₁	0,0103	0,1162	0,2300	0,1178	0,6187	0,2675	0,7689	0,3224
CN ₂	-0,0022	0,1205	0,1979	0,0734	0,5688	0,2492	0,7610	0,2828
CN ₃	0,0029	0,1149	0,1840	0,0911	0,5773	0,1593	0,7555	0,2024
CN ₄	-0,0007	0,1236	0,1976	0,1012	0,5893	0,1262	0,7677	0,2037
F ₁	0,0012	0,1798	0,1985	0,1604	0,6661	0,3581	0,7690	0,3284
F ₂	0,0094	0,1630	0,1878	0,1090	0,6277	0,1853	0,7677	0,2777
F ₃	-0,0043	0,2114	0,1768	0,1545	0,6109	0,1766	0,7636	0,2616
F ₄	0,0052	0,1231	0,1817	0,1172	0,5880	0,0306	0,7658	0,1649
PD ₁	0,0093	0,0351	0,1770	0,0293	0,6750	0,2284	0,7795	0,1636
PD ₂	0,0092	0,0660	0,2386	0,0582	0,6634	0,2027	0,7728	0,2074
PD ₃	-0,0009	0,1595	0,1898	0,0973	0,6217	0,1917	0,7673	0,2934
PD ₄	0,0000	0,1513	0,1868	0,1253	0,6304	0,0962	0,7757	0,2318
CM ₁	0,0086	0,0293	0,1516	0,0257	0,6793	0,2191	0,7792	0,1720
CM ₂	0,0084	0,0397	0,2150	0,0439	0,6353	0,1891	0,7726	0,2018
CM ₃	0,0034	0,1015	0,1909	0,0840	0,6421	0,1475	0,7743	0,2519
CM ₄	0,0002	0,1716	0,1992	0,1140	0,6248	0,0581	0,7784	0,2258

Onde: xc_n = centro do pico.
A_n = área sob o pico.
índice n: 1 = 1º pico; 2 = 2º pico; 3 = 3º pico e 4 = 4º pico.
CN_m = Campo nativo.
F_m = Reflorestamento de eucalipto.
PD_m = Plantio direto.
CM_m = Cultivo mínimo.
Índice m: 1 = 0 - 5 cm; 2 = 5 - 10 cm; 3 = 10 - 20 cm e 4 = 20 - 50 cm.

Como mostrado acima, os picos 1 e 2 são compostos unicamente do AH cinza (R entre A₁ e A₂ de 0,93). O pico 4 é uma mistura do AH marrom (porção do AH marrom com grande conjugação dos anéis aromáticos) e AF e o pico 3 é uma mistura do AH cinza (porção do AH cinza com grande conjugação) e uma porção do AH marrom.

Foi efetuada a análise de correlação para os escores fatoriais e os parâmetros ajustados dos cromatogramas (tabela 7).

TABELA 7 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AJUSTADOS DA DECONVOLUÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DO HÚMUS EXTRAÍDO POR PIROFOSFATO E OS ESCORES FATORIAIS DA ANÁLISE FATORIAL

Variável	Fator cultivo	Fator MOS	Fator textura
A1	-0,82*	-0,32	-0,18
W2	-0,41	0,55*	-0,17
A2	-0,85*	-0,24	-0,16
XC3	0,54*	0,40	-0,60
W3	-0,61*	-0,13	0,50*
A3	-0,13	0,94*	-0,11
XC4	0,71*	-0,06	-0,32
W4	-0,52*	-0,48	0,43
A4	-0,66*	0,37	-0,06
A4/A1	0,81*	0,47	-0,03
A1/A3	-0,26	-0,75*	-0,03
A4/A3	-0,18	-0,75*	-0,00
A4/A2	0,78*	0,49	-0,02
A2/A3	-0,25	-0,69*	-0,04

* Correlações marcadas são significantes a $p < 0,05$.

N = 16.

Onde: xc: centro do pico

w: largura do pico à meia altura

A: área sob o pico

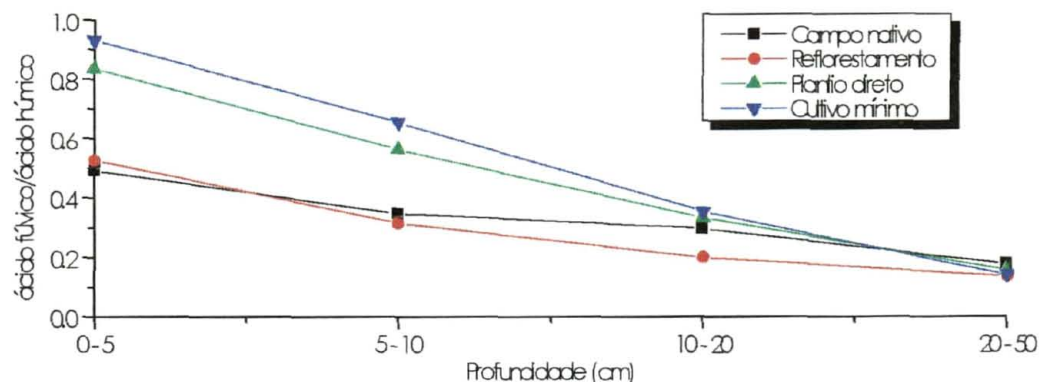
A_n/A_{n'} = relação entre as áreas sob os picos.

1, 2, 3 e 4: primeiro, segundo, terceiro e quarto picos.

Esta análise indica que o cultivo promoveu uma diminuição geral no conteúdo de SH, com exceção do terceiro pico (Kd de aproximadamente 0,6) que mostrou-se dependente do fator MOS. Entretanto o cultivo levou a um aumento da relação entre as SH pequenas e grandes (A₄/A₁ e A₄/A₂). O mesmo foi observado pela relação AF/AH do extrato total sendo esta consideravelmente maior nas

camadas mais superficiais das áreas agrícolas e diminuiu com a profundidade (figura 20).

FIGURA 20 - RELAÇÃO AF/AH DO HÚMUS EXTRAÍDO POR $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ A $0,02 \text{ mol L}^{-1}$



Como a relação E_4/E_6 do húmus extraído da camada mais profunda (20-50 cm) foi maior (figura 14) e a proporção de AF é menor nesta mesma profundidade (figura 20) supõem-se que as SH lixiviadas foram, principalmente, as com menor conjugação dos anéis aromáticos, embora com uma maior proporção de AH.

Estes resultados podem ser explicados supondo-se que o cultivo teria dois diferentes efeitos. O primeiro, um efeito físico de ruptura de agregados causando a degradação da matéria orgânica do solo anteriormente protegida. Visto que a agregação é promovida pelo AH (ROTH et al., 1992; ARIAS et al., 1996; PICCOLO et al., 1997) e PICCOLO e MBAGWU (1990) encontraram que quanto maior o tamanho molecular das SH, maior é a estabilidade dos microagregados, logo esta fração, de maior tamanho molecular, poderia ser preferencialmente degradada com a ruptura dos agregados. O segundo efeito seria químico e biológico causados pela fertilização e calagem que levaria a uma maior entrada de C_o fresco e síntese de AF (considerando-se a via de síntese de SH: $\text{AF} \rightarrow \text{AH}$; STEVENSON e GOH, 1971). Outra hipótese seria que a degradação de resíduos vegetais frescos, depositados

na superfície do solo ou incorporados, produziram ácidos orgânicos que promoveriam a ruptura de grandes micelas de SH em pequenas micelas, quando da dissolução das SH no tampão alcalino antes das medidas cromatográficas (PICCOLO et al., 1996). Além do mais, segundo POTT et al. (1985), a distribuição de massa molecular, caracterizada por ultrafiltração, cromatografia de permeação em gel e osmometria a pressão de vapor não é a massa molecular efetiva, mas o arranjo espacial das unidades estruturais das SH (estrutura terciária). Resultados recentes com "matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) - MALDI-TOF-MS" de frações de SH obtidas por ultrafiltração suportam a hipótese da preexistência de unidades básicas com o tamanho de poucos kDa, e pela associação de um número maior ou menor destas sub-unidades tem-se o tamanho aparente das SH (REMMLER et al., 1995).

Um efeito interessante do cultivo foi a pronunciada degradação das SH grandes, que é observada pela correlação negativa entre o fator escore cultivo e as áreas sob os picos 1 e 2 (tabela 7) e a relativa estabilidade das SH com K_d de aproximadamente 0,6 (pico 3, fração micro-húmica do AH cinza e AH marrom). Esta porção do húmus seria independente do cultivo, provavelmente devido à alta conjugação dos seus anéis aromáticos indicado pelo baixo valor da relação E_4/E_6 (tabela 5) e em conseqüência disto, seria mais resistente à degradação. Concomitantemente, a fração macro-húmica do húmus representada pelos picos 1 e 2, apresenta alto tamanho molecular, porém é mais alifática, o que é indicado pelo alto valor da relação E_4/E_6 , e logo seria mais facilmente degradada após a ruptura dos agregados pelo cultivo, e pelo aumento da atividade microbiana

ocasionada pela fertilização e calagem deste solo originalmente ácido, visto que frações hidrolizáveis por ácidos são menos estáveis (STEVENSON, 1982, p. 49).

Outro efeito do cultivo foi a diminuição do tamanho das SH representadas pelo quarto pico. Portanto, o cultivo não somente aumentou a proporção de SH com menor tamanho molecular, como também reduziu o tamanho molecular destas SH.

A capacidade do método empregado para a identificação de alterações das características da matéria orgânica do solo causadas por diferentes sistemas de cultivo, que não foi encontrado na literatura, pode ser atribuída ao uso de um extrator brando e ao fracionamento físico do húmus, minimizando com isto possíveis alterações da matéria orgânica do solo ocasionadas pelo emprego de extratores alcalinos e fracionamento químico com o uso de soluções ácidas concentradas.

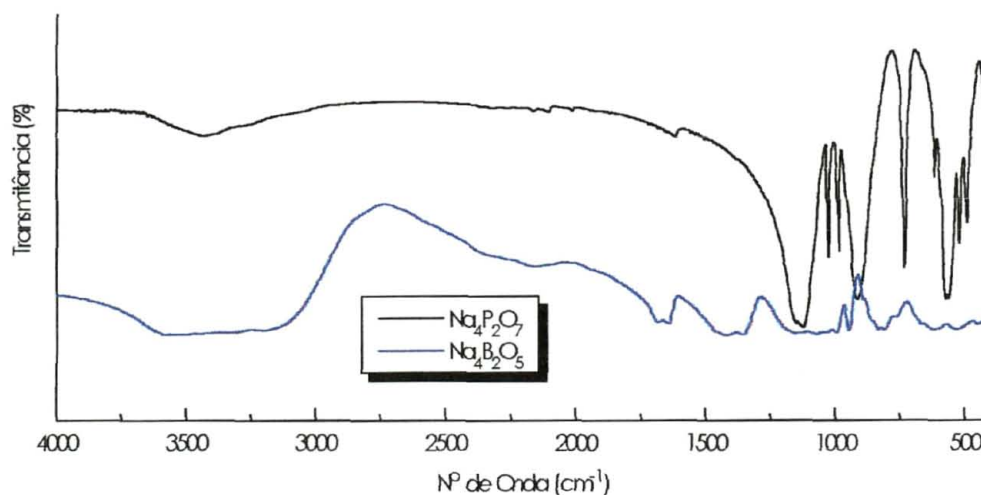
A textura dos dois solos estudados é diferente, sendo que esta diferença, entretanto, afetou apenas em pequena extensão (R pequeno), somente a posição do terceiro pico, com moléculas de maior tamanho com o aumento do conteúdo de argila. Este efeito, porém, pode também ser atribuído às diferenças da vegetação entre os dois locais estudados.

III.2.2 ESPECTROSCOPIA DE IVTF E CONTAMINANTES DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Análises de IVTF das frações cromatográficas foram dificultadas pelo alto conteúdo de contaminantes oriundos do extrator e da solução tampão utilizados

(pirofosfato e borato). Estes contaminantes possuem diversas bandas de absorção na região do infravermelho de interesse para a análise de SH (figura 21).

FIGURA 21 - ESPECTRO DE IVTF DE AMOSTRAS DE PIROFOSFATO E BORATO DE SÓDIO



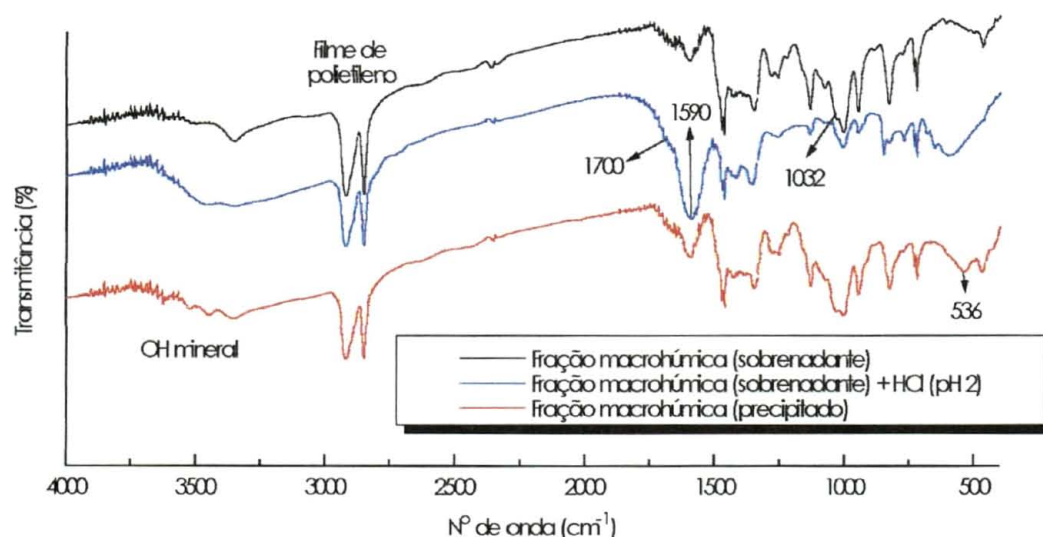
Estudos da influência da presença de contaminantes coloidais na relação E_4/E_6 foram efetuados através de sucessivas centrifugações, sendo que o valor da relação E_4/E_6 das frações húmicas da amostra reflorestamento (10-20 cm) não se alterou após este tratamento (tabela 8), já os valores de E_4 e E_6 da fração macro-húmica diminuíram quase que igualmente após cada centrifugação.

TABELA 8 - VALORES E_4 E E_6 E DA RELAÇÃO E_4/E_6 DAS FRAÇÕES HÚMICAS DA AMOSTRA REFLORESTAMENTO (10-20 cm) APÓS SUCESSIVAS CENTRIFUGAÇÕES

Tratamento	Fração	E_4	E_6	E_4/E_6
Antes da centrifugação	Macro-húmica	0,458	0,024	19,1
	Meso-húmica	0,159	0,021	7,6
	Micro-húmica	0,377	0,062	6,1
Centrifugado por 10 min a 37000 g	Macro-húmica	0,329	0,017	19,4
	Meso-húmica	0,155	0,020	7,8
	Micro-húmica	0,379	0,065	5,8
Centrifugado por 20 min a 37000 g	Macro-húmica	0,235	0,012	19,6
	Meso-húmica	0,158	0,021	7,5
	Micro-húmica	0,397	0,064	6,2
Centrifugado por 60 min a 37000 g	Macro-húmica	0,135	0,007	19,3
	Meso-húmica	0,151	0,020	7,6
	Micro-húmica	0,373	0,062	6,0

Estudos dos centrifugados por IVTF mostraram que a centrifugação levou à redução da intensidade das bandas de absorção atribuídas à deformação axial de grupos OH minerais e bandas atribuídas à hematita (536 cm^{-1}) no sobrenadante, e ao aumento destas no precipitado (figura 22).

FIGURA 22 - ESPECTROS DE IVTF DA FRAÇÃO MACRO-HÚMICA, CENTRIFUGADA E TRATADA COM HCl, EXTRAÍDA DA AMOSTRA REFLORESTAMENTO (10-20 cm) POR PIROFOSFATO E FRACIONADA COM ELUENTE BORATO/NaCl



O tratamento com HCl levou à redução da intensidade da banda de absorção em 1030 cm^{-1} atribuída aos polissacarídeos (PAIM et al., 1990). Em média, aproximadamente metade do C orgânico presente na fração solúvel em ácido seria de substâncias não húmicas (ORLOV, 1986, p. 162). STEVENSON e GOH (1971) constataram que a hidrólise ácida de preparados de húmus leva a uma grande redução de intensidade da banda atribuída aos polissacarídeos (1050 cm^{-1}), porém não se sabe se estes são componentes estruturais das SH ou impurezas co-adsorvidas ou co-precipitadas. Este tratamento levou também ao aumento da banda de absorção em 1595 cm^{-1} atribuída ao grupo carboxilato (STEVENSON, 1982, p. 272), indicando que a acidificação do húmus pode levar à oxidação de

carboidratos em grupos carboxílicos, estes grupos estão na forma dissociada pois o precipitado por HCl foi redissolvido em uma solução de NaHCO_3 a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

III.3 CONCLUSÕES

O método proposto de extração branda do húmus do solo, caracterização e fracionamento por CE-VPC, seguida pela deconvolução matemática dos cromatogramas obtidos, mostra ser uma técnica sensível para a investigação dos impactos ocasionados por diferentes sistemas de manejo do solo.

O cultivo no presente exemplo, levou à diminuição do conteúdo de SH, enquanto que o conteúdo de matéria orgânica do solo não foi significativamente afetado. Este levou também a um aumento da proporção de SH de pequeno tamanho molecular, provavelmente devido à degradação preferencial das SH de maior tamanho molecular e/ou neo-síntese de SH de pequeno tamanho molecular devido à maior entrada de resíduos vegetais, promovida pela fertilização e calagem deste solo inicialmente pobre, ou pela ruptura da configuração das SH, na presença de ácidos orgânicos produzidos pelos resíduos vegetais, em pequenas micelas de SH a partir de uma grande.

Com o presente método de fracionamento é possível obter-se duas diferentes frações do AH cinza com diferentes propriedades de absorção de luz na região do visível. Sendo que uma destas frações apresentou uma alta relação E_4/E_6 , o que é incomum e que pode ser devido a uma pequena conjugação dos anéis aromáticos desta fração. Análises das frações por IVTF são dificultadas pela presença de pirofosfato e borato nas frações obtidas, por isto, no próximo capítulo

descreve-se modificações do presente método com a finalidade de obter-se amostras adequadas para este tipo de estudo.

Pelas análises por IVTF é evidente a necessidade de um tratamento mais cuidadoso por centrifugação dos extratos antes da cromatografia para redução da quantidade de contaminantes minerais nas frações cromatográficas.

O tratamento com uma solução de HCl, procedimento rotineiro para o fracionamento químico tradicional, de uma das amostras das frações cromatográficas, levou à redução no conteúdo de polissacarídeos e aumento do grupo carboxilato indicando que o tratamento ácido do húmus pode levar à alterações deste.

CAPÍTULO IV: UM NOVO MÉTODO PARA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO POR TAMANHO MOLECULAR DO HÚMUS DO SOLO

IV.1 MATERIAL E MÉTODOS

O húmus do solo foi extraído por três métodos diferentes: com uma solução de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, resina trocadora catiônica (Chelex 100, Bio Rad, CA) e resina com a dispersão do solo com uso de vibração ultrassônica. Estes extratores são considerados brandos, quando comparado aos solventes alcalinos (i.e.: NaOH) (STEVENSON, 1982, p. 39 e 41; MACHADO e GERZABEK, 1993).

Extração com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$:

Para a extração foram utilizados 10 g de solo e 50 mL da solução de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$; esta mistura foi mantida sob agitação em agitador orbital ajustado a 200 rpm durante 16 h e então centrifugada a 17000 g por 30 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro faixa preta - 589¹, centrifugado a 29000 g por 15 min, descartando-se o precipitado, e completado com água bidestilada até 100 mL (NOVOTNY et al., 1997a).

Extração com resina:

Para a extração foram utilizados 10 g de solo, 30 g de resina e 50 mL de água bidestilada; esta mistura foi mantida sob agitação em agitador orbital ajustado a 200 rpm durante 16 h e então centrifugada a 17000 g por 30 min. O

sobrenadante foi filtrado em filtro faixa preta - 589¹, centrifugado a 29000 g por 15 min, descartando-se o precipitado, e completado com água bidestilada até 100 mL (NOVOTNY et al., 1997a).

Para a extração por resina mais ultra-som foi aplicado, antes da agitação, à suspensão do solo com resina uma potência de 100 W mL⁻¹ utilizando-se um equipamento de ultra-som com sonda.

Os extratos, assim obtidos, foram analisados colorimetricamente medindo-se a absorbância (abs.) em 465 nm (E₄Hu) e 665 nm (E₆Hu) em uma solução a pH 8,5 (CHEN et al., 1977) utilizando-se 5 mL do extrato em 5 mL de uma solução tampão de NaHCO₃ a 0,1 mol L⁻¹. Outros 5 mL do extrato foram acidificados a pH \cong 2 com HCl e o AH precipitado e AF dissolvido foram separados por centrifugação a 17000 g por 10 min. O AH foi redissolvido com 10 mL de uma solução tampão de NaHCO₃ a 0,05 mol L⁻¹ e analisado colorimetricamente (E₄AH e E₆AH). Estimou-se a E₄AF por diferença: $E_{4AF} = E_{4Hu} - E_{4AH}$. Calculou-se a abs. g⁻¹ de solo (E₄Hu * 20), a abs. g⁻¹ de C (E₄Hu * 2000 / % C_o) e a relação AF/AH (E₄AH / E₄AF) (GERZABEK et al., 1993). O restante do extrato foi congelado.

A extração e análise colorimétrica foi repetida três vezes na mesma amostra de solo (sequencialmente), e os extratos foram adicionados ao extrato congelado proveniente da primeira extração, congelados e ao final liofilizados e armazenados em dessecadores com sílica gel até serem utilizados para as análises cromatográficas.

Para as análises por CE-VPC foram selecionadas oito amostras, devido à maior disponibilidade de material: campo nativo (0-5 e 10-20 cm); reflorestamento (5-10 e 20-50 cm); plantio direto e cultivo mínimo (0-5 e 5-10 cm).

Esta análise foi efetuada com um método similar ao descrito no capítulo anterior. As principais diferenças foram a ressolubilização de 80 mg para o extrato por pirofosfato e 30 mg para os extratos por resina e resina/ultra-som em 10 mL do eluente; centrifugação desta solução a 29000 g por 30 min descartando-se o precipitado, visando reduzir o conteúdo de contaminantes minerais nas frações cromatográficas; uso de uma coluna cromatográfica mais curta (500 mm de comprimento ao invés de 1000 mm) e um fluxo maior (2 mL min^{-1}) o que possibilitou a análise e fracionamento em menos tempo; obtenção dos cromatogramas nos comprimentos de onda de 254, 465 e 665 nm, sendo que para a obtenção dos cromatogramas em 254 nm a solução do extrato foi diluída cinco vezes no eluente (1:5), e uso de uma solução tampão de KHCO_3 a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,5) como eluente ao invés de $\text{Na}_4\text{B}_2\text{O}_7/\text{NaCl}$ (pH 9). O KHCO_3 foi selecionado pelas seguintes razões: (a) o pH resultante é próximo a 8, que é o pH recomendado para medidas da relação E_4/E_6 (KONONOVA, 1966, p. 402; CHEN et al., 1977); (b) é possível a obtenção de um material "limpo" para posteriores análises por IVTF e RPE com a transformação do KHCO_3 a KCl pela adição de uma solução de HCl ; (c) KHCO_3 mostra-se mais adequado, para as análises citadas, do que NaHCO_3 pois o KCl é menos higroscópico em relação ao NaCl .

A calibração da coluna e cromatografias foram efetuadas de modo similar ao anteriormente descrito.

O fracionamento foi efetuado coletando-se o eluato em diferentes classes de valor K_d , classes estas determinadas baseando-se na deconvolução dos picos de cromatogramas previamente obtidos. Estas classes foram em valores K_d : -0,12 a

0,06 (fração A); 0,06 a 0,24 (fração B); 0,24 a 0,48 (fração C); 0,48 a 0,77 (fração D) e 0,77 a 1,15 (fração E - substâncias não húmicas).

A concentração de C_0 do eluato foi estimada como descrito em BRANDSTETTER et al. (1996) que utilizaram a absorção na região do UV (254 nm) para estimar a concentração de C na solução do solo.

Os dados foram convertidos para absorbância em 465 nm por grama de solo (abs. g^{-1} de solo), relação E_4/E_6 e uma estimativa da absorvidade ($\hat{E}_{1cm}^{1mgL^{-1}C}$) dado por: absorbância do eluato em 465 nm/estimativa da concentração de C_0 do eluato. A importância da absorvidade é intensamente discutida em ORLOV (1986, p. 149-166).

Os espectros de UV-Vis de todas as frações e os valores E_4 e E_6 das frações húmicas foram medidos.

A análise matemática dos cromatogramas foi efetuada pela deconvolução dos mesmos (modelo Gaussiano) utilizando-se o programa Microcal-Origin®, o ajuste foi testado calculando-se o valor χ^2 . Análises de correlação de Pearson foram efetuadas utilizando-se os escores fatoriais calculados no capítulo anterior utilizando-se o programa STATISTICA® for Windows®.

IV.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação E_4/E_6 , uma medida da condensação/conjugação das SH e/ou tamanho molecular, variou de 4,9 a 8,7 (tabela 9), intervalo este considerado típico de SH extraídas de solos minerais (SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 12). O método de

extração, entretanto, claramente influenciou os resultados, sendo que, o húmus e o AH extraídos por resina apresentaram uma relação E_4/E_6 distintamente menor em relação àqueles extraídos por pirofosfato. O método da resina/ultra-som apresentou valores intermediários (tabela 9). Visto que a extração com resina produz extratos mais polimerizados do que aqueles extraídos por álcalis diluídos (SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 5) ou por pirofosfato (DANNEBERG e SCHAFFER, 1974), é provável que o menor valor da relação E_4/E_6 , para o material extraído por resina, pode ser relacionado ao maior tamanho molecular deste (CHEN et al., 1977), embora os estudos de BAES e BLOOM (1990) demonstraram que as SH não exibem características de espalhamento da luz, e por isto a relação E_4/E_6 não seria controlada pelo tamanho molecular.

TABELA 9 - ANÁLISE COLORIMÉTRICA DO HÚMUS (Hu) E DOS ÁCIDOS HÚMICO (AH) E FÚLVICO (AF) OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Amostra ¹	Extrator	$E_4:E_6$ Hu	$E_4:E_6$ AH	AF/AH	Abs. g ⁻¹ Solo
CN	Pirofosfato	6,3	5,4	0,33	59,3
	Resina	4,9	4,4	0,27	25,4 (43%) ²
	Resina/ultra-som	5,5	5,1	0,21	56,3 (95%)
F	Pirofosfato	8,7	8,2	0,29	84,1
	Resina	6,3	5,5	0,29	35,3 (42%)
	Resina/ultra-som	7,1	6,3	0,26	49,3 (59%)
PD	Pirofosfato	7,6	7,0	0,47	50,8
	Resina	5,7	5,1	0,23	39,1 (77%)
	Resina/ultra-som	6,9	6,2	0,22	42,8 (84%)
CM	Pirofosfato	8,3	7,8	0,52	43,8
	Resina	5,9	5,2	0,29	26,1 (60%)
	Resina/ultra-som	7,5	6,9	0,23	20,8 (48%)

¹ Valores médios das quatro profundidades amostradas.

² Percentagem em relação ao pirofosfato.

Com exceção da área sob reflorestamento, a relação AF/AH foi maior no extrato do pirofosfato, o que concorda com os dados de DANNEBERG e SCHAFFER (1974). Isto justifica em parte o maior valor da relação E_4/E_6 do húmus extraído por

pirofosfato, visto que o AF apresenta valores maiores para a relação E_4/E_6 do que o AH (SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 12).

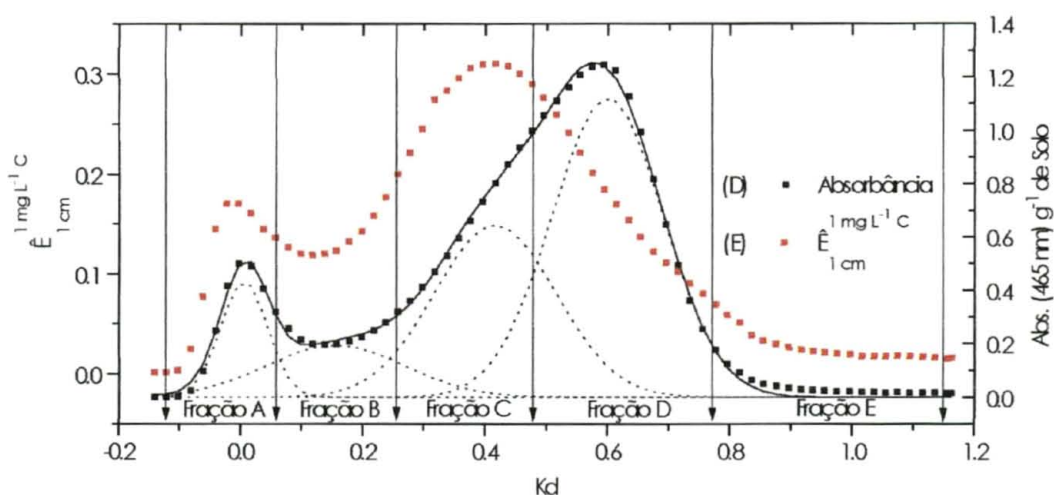
A relação AF/AH do extrato foi relativamente maior para pirofosfato nos solos cultivados (plantio direto e cultivo mínimo) comparado aos solos sob reflorestamento e campo nativo (tabela 9). Transformando-se os dados da relação AF/AH do extrato por resina e resina/ultra-som em valores relativos ao extraído por pirofosfato, observou-se que há uma correlação negativa entre este valor relativo e o escore fatorial cultivo (análise de correlação $R = -0,80$ e $-0,77$, para o extrato por resina e resina/ultra-som, respectivamente). Tal observação indica que, com o aumento da intensidade do cultivo o pirofosfato extraiu preferentemente AF ou que este extrator promoveu a ruptura de SH de maior peso molecular em SH menores, e que SH de solos cultivados foram mais sujeitas a este efeito.

O aumento da eficiência da extração por resina após dispersão do solo por ultra-sonificação foi evidente em três dos quatro casos estudados (tabela 9). A abs. g^{-1} de solo foi na média 1,38 vezes maior após a dispersão dos colóides do solo pelo tratamento com ultra-som, comparado à extração com resina sem este pré-tratamento. Este efeito foi especialmente evidente no solo mais argiloso (campo nativo). Em geral o aumento da eficiência da resina como extratora pela ultra-sonificação foi menos pronunciado nas áreas cultivadas.

As figuras 23, 24 e 25 mostram exemplos da distribuição de tamanhos moleculares do húmus do solo extraído das amostras campo nativo (0-5 cm). Estes cromatogramas são mostrados como exemplos de todas as demais amostras analisadas. As frações de A a E representam substâncias orgânicas com tamanho molecular em ordem decrescente. A partir de dados do capítulo anterior pode-se

concluir que as frações A e B são porções distintas do AH cinza, a fração C é composta de parte do AH cinza e parte do AH marrom, a fração D é uma mistura de outra parte do AH marrom e a totalidade do AF e a fração E compreende principalmente as substâncias não húmicas.

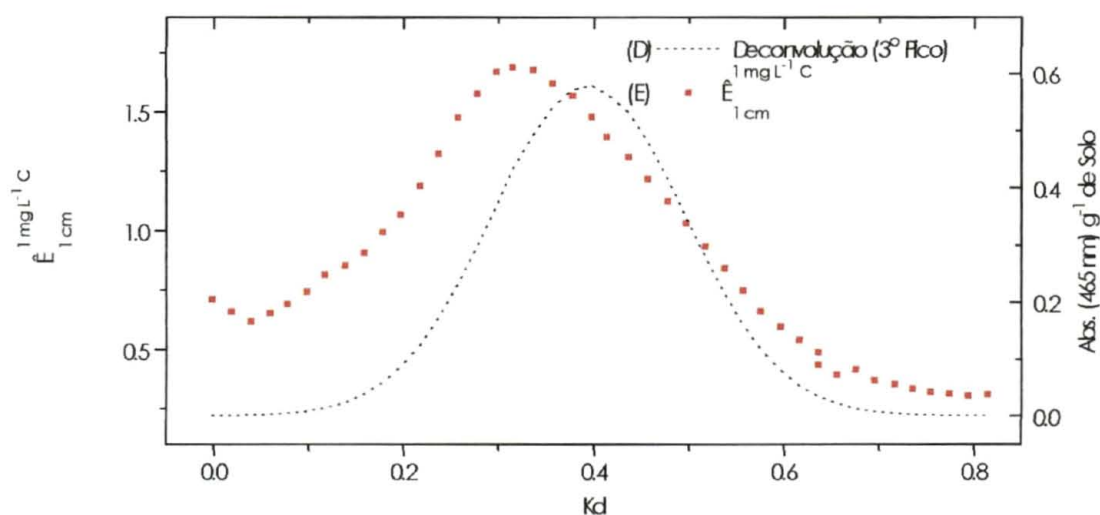
FIGURA 23 - CROMATOGRAMAS EM ABS. (465 nm) g^{-1} DE SOLO E $\hat{E}_{1\text{cm}}^{1\text{mgL}^{-1}\text{C}}$ DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM



A figura 23 mostra um cromatograma típico do húmus do solo extraído pelo método da resina/ultra-som. Embora a estimativa da concentração de C_0 seja precária, devido à diferentes absorvidades das substâncias orgânicas, o cromatograma da $\hat{E}_{1\text{cm}}^{1\text{mgL}^{-1}\text{C}}$ (figura 23) concorda com medidas diretas da concentração de C_0 e absorvidade da literatura (DANNEBERG, 1981; DANNEBERG e SCHAFFER, 1984; MOHAMAD et al., 1993). O maior desvio entre os dois métodos foi observado na região das substâncias não húmicas - fração E (Kd 0,77 a 1,15), que pode ser explicado pela menor absorvidade na região do UV nesta região do cromatograma devido, provavelmente, à alta concentração de pequenos compostos orgânicos saturados possivelmente presentes nesta fração.

A posição do segundo máximo do cromatograma de $\hat{E}_{1\text{cm}}^{1\text{mgL}^{-1}\text{C}}$ praticamente coincidiu com a posição do terceiro pico da deconvolução do cromatograma de abs. g^{-1} de solo (figura 24), pico este que foi independente do fator escure cultivo (tabela 7). Esta observação confirma as conclusões à respeito da estabilidade desta fração do húmus atribuída à alta conjugação dos seus anéis aromáticos indicado pelo baixo valor da relação E_4/E_6 (tabela 5) e alta absorvidade específica (figura 24).

FIGURA 24 - CROMATOGRAMA EM $\hat{E}_{1\text{cm}}^{1\text{mgL}^{-1}\text{C}}$ E DECONVOLUÇÃO DO TERCEIRO PICO DO CROMATOGRAMA EM ABS. (465 nm) g^{-1} DE SOLO DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM



Nos solos cultivados, o segundo máximo do cromatograma de $\hat{E}_{1\text{cm}}^{1\text{mgL}^{-1}\text{C}}$ foi mudado para uma região de maior K_d , especialmente o material extraído por resina/ultra-som. Isto indica que o cultivo do solo promoveu a quebra/degradação de SH de grande tamanho molecular para SH menores (dados não mostrados).

A partir da deconvolução do cromatograma de abs. g^{-1} de solo e do cromatograma $\hat{E}_{1\text{cm}}^{1\text{mgL}^{-1}\text{C}}$ (figura 23) pode-se concluir que o método proposto

mostra-se eficiente para a obtenção de frações de SH com diferentes características espectroscópicas (UV-Vis).

A largura dos picos à meia altura foi relativamente constante entre os métodos de extração, exceto o quarto pico que apresentou um maior valor para o extrato com pirofosfato (tabela 10).

TABELA 10 - PARÂMETROS AJUSTADOS DA DECONVOLUÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DO HÚMUS EXTRAÍDO POR DIFERENTES MÉTODOS

Parâmetro ¹	Pirofosfato ²	Resina ²	Resina/ultra-som ²
XC ₁	0,0184	0,0217	0,0073
W ₁	0,0795	0,0797	0,0751
A ₁	0,0569	0,0221 (39%) ³	0,0342 (60%)
XC ₂	0,1158	0,1306	0,1137
W ₂	0,1550	0,1693	0,1675
A ₂	0,0378	0,0154 (41%)	0,0244 (65%)
XC ₃	0,5002	0,5046	0,5017
W ₃	0,3422	0,3327	0,3064
A ₃	0,2448	0,0931 (38%)	0,1773 (72%)
XC ₄	0,6589	0,6473	0,6194
W ₄	0,1886	0,1497	0,1437
A ₄	0,1333	0,0441 (33%)	0,0810 (61%)

¹ Onde:

xc_n = centro do pico

w_n = largura do pico à meia altura

A_n = área sob o pico

índice n: 1 = 1º pico; 2 = 2º pico; 3 = 3º pico e 4 = 4º pico

² Valores médios das oito amostras analisadas por cromatografia

³ Percentagem em relação ao pirofosfato.

O emprego de ultra-som produziu uma fração A com menor valor K_d (xc), enquanto que as demais frações apresentaram valores de K_d similares entre os métodos de extração (tabela 10). A partir das áreas sob os cromatogramas pode-se deduzir que o pirofosfato foi o extrator mais eficiente, seguido pelo método da resina/ultra-som, o que confirma os dados obtidos pela análise colorimétrica dos extratos.

A fração de menor tamanho molecular apresentou os maiores valores da relação E₄/E₆ (figura 25 e tabela 11). Valores acima de 10 são típicos de AF

(SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 12). Os resultados da relação E_4/E_6 das frações cromatográficas dos extratos com pirofosfato, resina e resina após ultra-sonificação (tabela 11) confirmam os resultados apresentados acima (tabela 9), onde o material extraído por resina apresentou uma relação E_4/E_6 distintamente menor em relação àqueles extraídos por pirofosfato e o método da resina/ultra-som com valores intermediários. Novamente observou-se um valor alto da relação E_4/E_6 para a fração A em todas as amostras e extratores estudados.

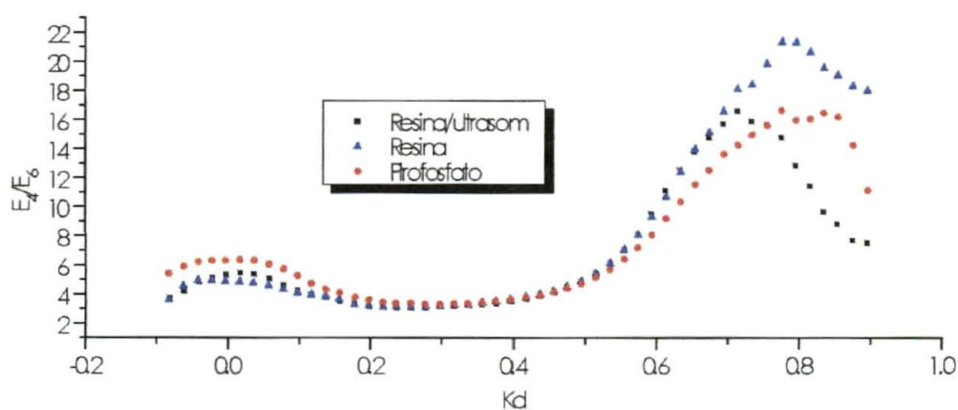
TABELA 11 - RELAÇÃO E_4/E_6 DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DAS SH EXTRAÍDAS POR PIROFOSFATO, RESINA E RESINA/ULTRA-SOM

Fração cromatográfica	Extrator		
	Pirofosfato*	Resina*	Resina/ultra-som**
A	10,6	7,4	9,0
B	7,5	5,5	6,6
C	5,8	4,5	4,8
D	16,8	9,9	11,8

* Média de oito amostras

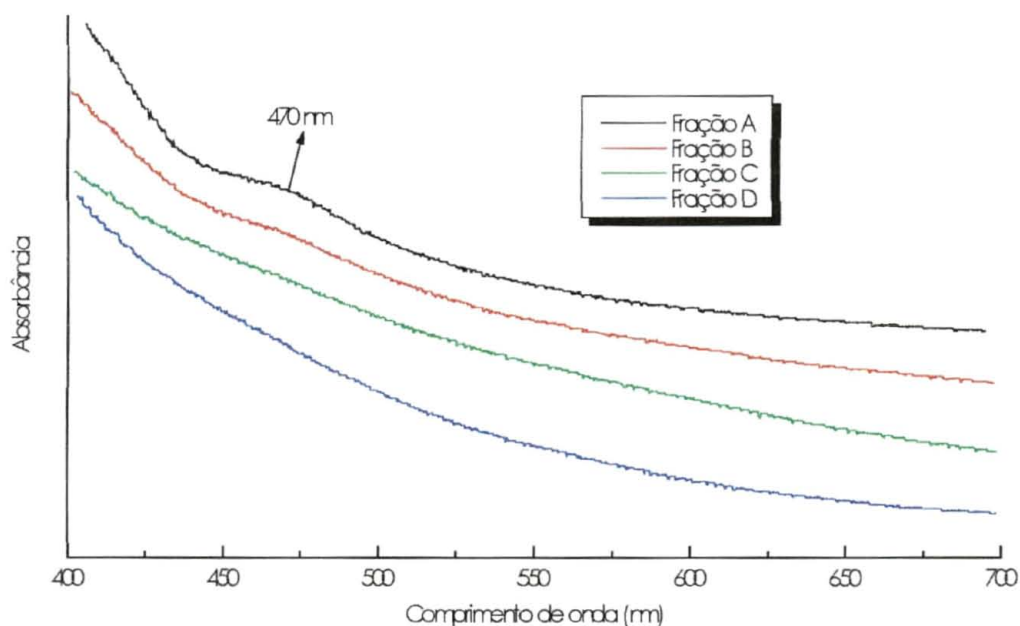
** Média de todas as dezesseis amostras

FIGURA 25 - CROMATOGRAMAS DA RELAÇÃO E_4/E_6 DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) POR PIROFOSFATO A 0,02 mol L⁻¹, RESINA E RESINA/ULTRA-SOM



Observou-se nos espectros de UV-Vis das frações A e com menor intensidade na B uma banda centrada em 470 nm (figura 26). Espectros similares ao mostrado foram obtidos para todas as demais amostras e extratores empregados; esta banda em 470 nm contribuiu para o alto valor da relação E_4/E_6 da fração A.

FIGURA 26 - ESPECTROS NA REGIÃO DO VISÍVEL DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE SH EXTRAÍDAS DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0 - 5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM



SCHNITZER e KHAN (1978, p. 11) afirmaram que os espectros na região do visível de SH não apresentam nenhuma banda característica, exceto materiais húmicos denominados de AH "verde" (P_9) que apresentam bandas de absorção em 450, 570 e 620 nm e podem ser devido à derivados do 4,9-dihidroxiperileno-3,10-quinona (SCHNITZER e KHAN, 1972, p. 60). ORLOV (1986, p. 166-171) apresentou espectros com pequenas bandas nesta região e as atribui à fração P_9 das SH. As bandas observadas, neste trabalho, em 470 nm podem ser atribuídas aos compostos do tipo das hidroxiantraquinonas (ORLOV, 1986, p. 171).

A pureza de um material colorido pode ser medido através da sua extinção específica ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) ou absortividade (DANNEBERG, 1973; MOHAMAD et al., 1993). O método da resina/ultra-som produziu as SH mais "puras" pela sua maior $\hat{E}_{1\text{cm}}^{1\text{mgL}^{-1}\text{C}}$ seguido por pirofosfato e por último resina (dados não mostrados). Estes dados

estão de acordo com os de DANNEBERG (1973) que encontrou que a extração com pirofosfato produziu SH com maior grau de pureza (alta $E_{1\text{cm}}^{1\%C}$) do que a extração com resina; o pior resultado foi obtido com NaOH.

IV.3 CONCLUSÕES

A extração do húmus do solo com resina após dispersão dos colóides do solo por ultra-som, mostra-se um método adequado, pois aumenta a eficiência da resina, provavelmente sem criar artefatos e produz SH relativamente "puras". A quantidade de SH extraídas por este método é comparável àquela obtida com o método convencional de extração com pirofosfato e apresenta a vantagem de fornecer um extrato não contaminado com outros sais e então, pode ser utilizado para análises posteriores por IVTF sem preparações adicionais.

CE-VPC é um meio adequado para análise e fracionamento do húmus em classes de tamanho molecular e o uso de KHCO_3 como solução eluente com posterior acidificação com uma solução de HCl para a sua transformação em KCl previne a contaminação do húmus fracionado por sais que poderiam interferir nas análises por IVTF.

A estimativa da absorvidade pela absorbância na região do UV é um método não destrutivo e produz dados comparáveis aos apresentados na literatura com medidas diretas da concentração de C_o .

Observou-se nas frações A e em menor extensão na B de todas as amostras a presença de uma banda centrada em 470 nm que pode ser atribuída aos compostos do tipo das hidroxiantraquinonas.

CAPÍTULO V: ESPECTROSCOPIA DE IVTF E RPE DO HÚMUS FRACIONADO EM VIDRO DE POROSIDADE CONTROLADA

V.1 MATERIAL E MÉTODOS

As frações do húmus, obtidas conforme descrito no capítulo anterior, foram acidificadas até pH 4 com uma solução diluída ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) de HCl para a transformação do KHCO_3 em KCl e a seguir congeladas e liofilizadas.

Para as análises por IVTF e RPE foram selecionadas as frações do húmus extraído por resina/ultra-som obtidas da camada mais superficial (0-5 cm) das quatro áreas em estudo e adicionalmente, para as análises por RPE, as frações do húmus da amostra campo nativo (0-5 cm) extraído por pirofosfato de sódio a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, selecionou-se esta amostra pela sua maior concentração em SH.

As análises por IVTF foram efetuadas em equipamento Bohmen 100 e segundo método bem estabelecido na literatura (PAIM et al., 1990) diluindo-se aproximadamente 2 mg de amostra em 100 mg de KBr e manufacturando-se pastilhas com o emprego de uma prensa hidráulica. Os espectros foram adquiridos somando-se 20 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

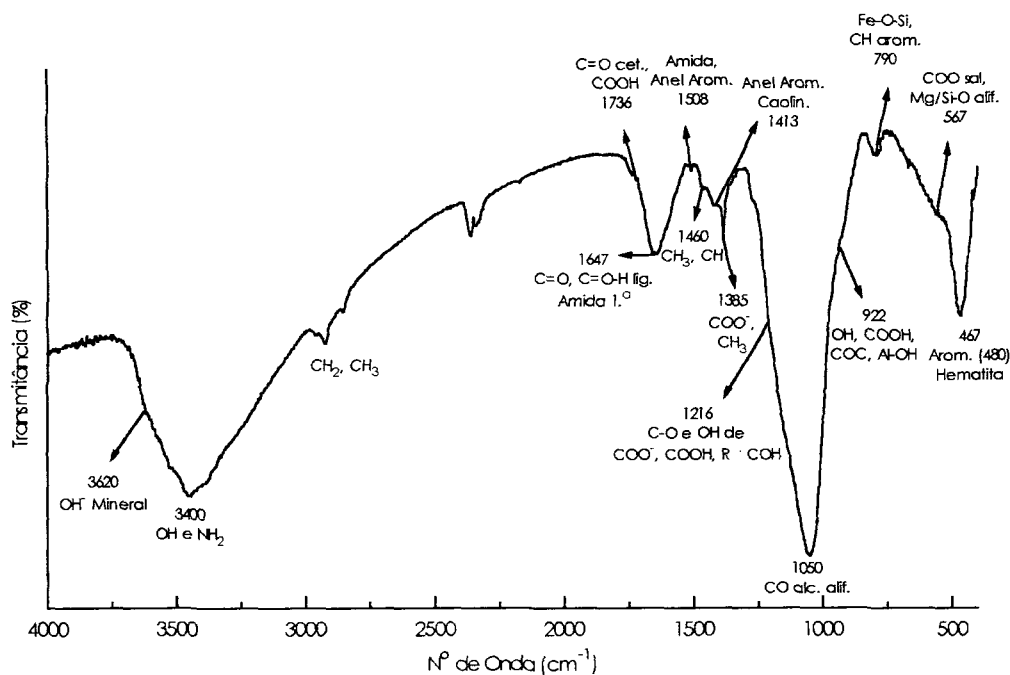
Os estudos por RPE foram efetuados em espectrômetro BRUKER ESP 300 E operando em banda-X ($\sim 9,7 \text{ GHz}$), utilizando modulação de 100 kHz , à temperatura ambiente. As amostras foram colocadas em tubos de quartzo de 4 mm de diâmetro interno. Utilizou-se o N,N-difenilpicrilhidrazil (DPPH) como padrão para a correção do campo magnético e fator-g.

Para otimização dos parâmetros do equipamento efetuou-se diversos ensaios em uma das amostras com variação da amplitude de modulação e potência de microondas de modo a determinar-se a máxima potência sem saturação do sinal (GEHRING et al., 1993).

V.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as frações cromatográficas analisadas por IVTF apresentaram uma banda de absorção intensa e larga em $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ (figuras 27-31), que é atribuída à deformação axial de grupos OH e NH_2 (STEVENSON e GOH, 1971; PAIM et al., 1990).

FIGURA 27 - ESPECTROS DE IVTF DA FRAÇÃO A EXTRAÍDA DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM



As bandas de absorção na região de 2900 cm^{-1} , que são atribuídas aos grupos CH alifáticos (DICK et al., 1997; NIEMEYER et al., 1992), variaram de

intensidade entre as frações cromatográficas e entre as diferentes áreas estudadas, sendo menos intensas nas frações E e nas amostras obtidas das áreas agrícolas. Estas bandas foram especialmente intensas nas frações húmicas (frações A, B, C e D) da amostra campo nativo (figuras 28-31).

FIGURA 28 - ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM

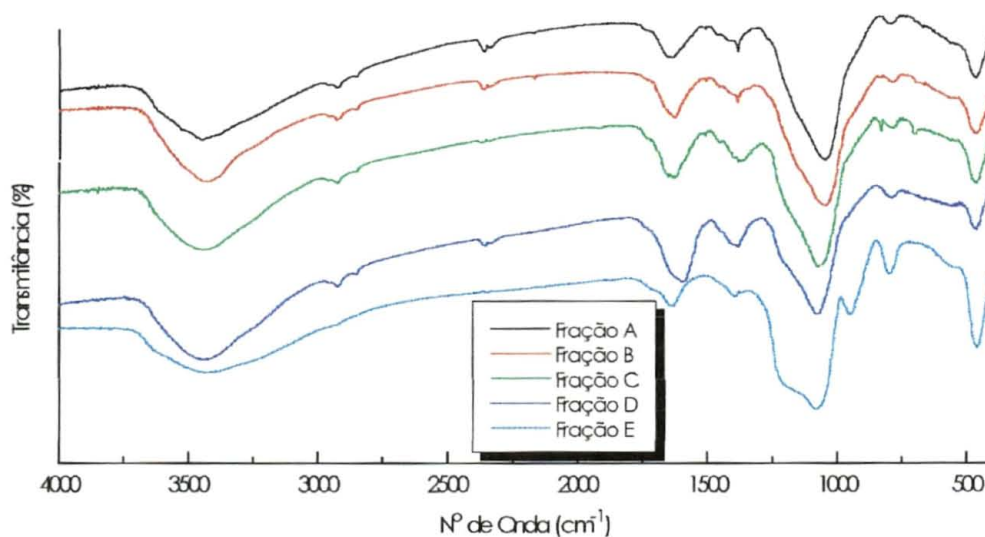


FIGURA 29 - ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA REFLORESTAMENTO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM

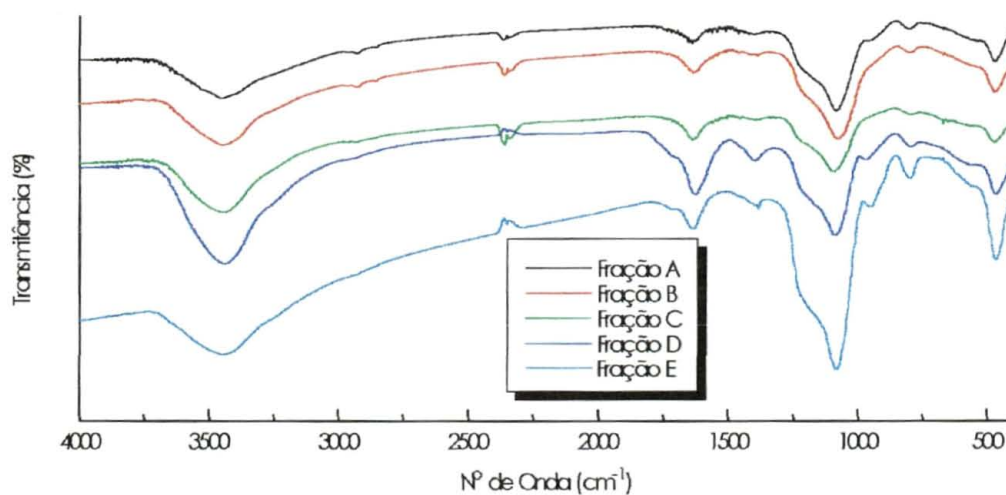


FIGURA 30 - ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA PLANTIO DIRETO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM

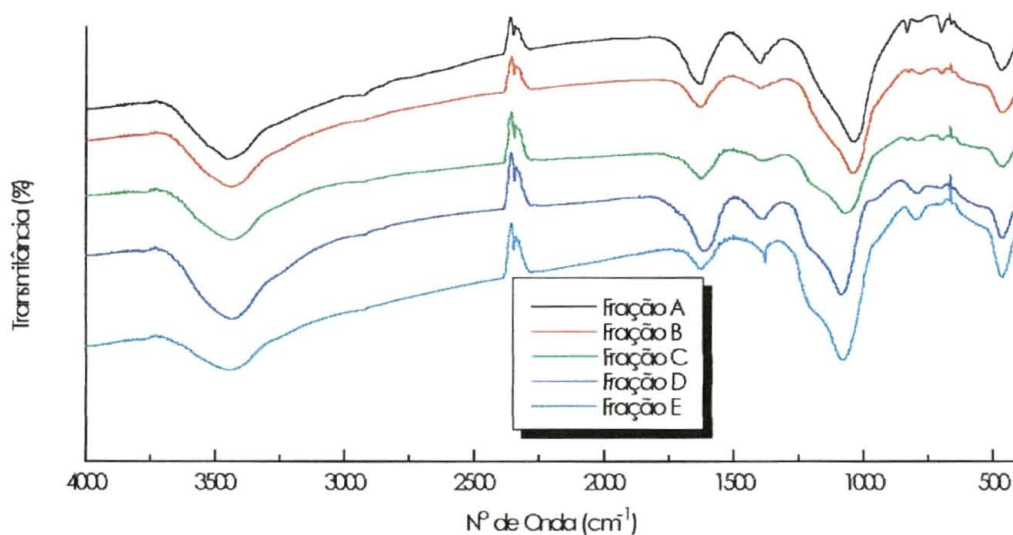
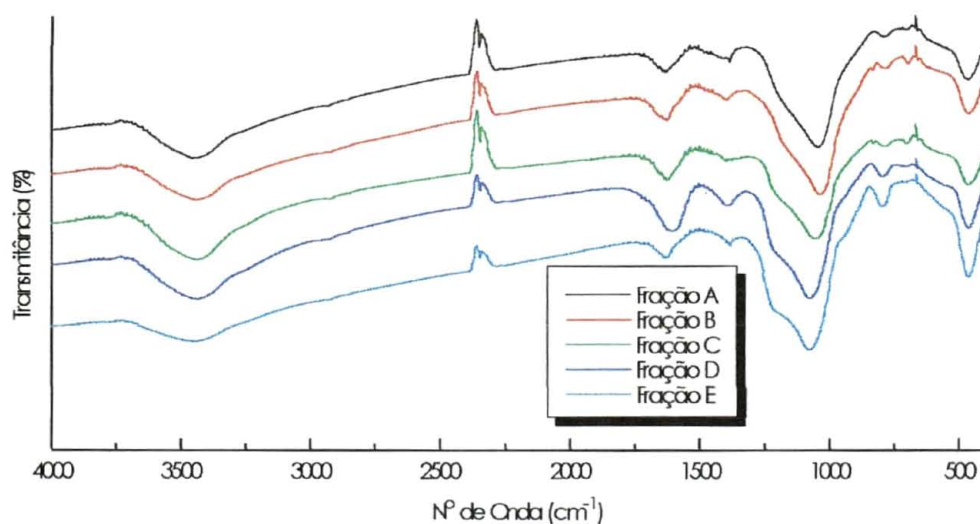


FIGURA 31 - ESPECTROS DE IVTF DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CULTIVO MÍNIMO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM



As bandas de absorção atribuídas aos grupos carboxílicos (1720 cm^{-1}) e carboxilatos (1640 e 1420 cm^{-1}) (PAIM et al., 1990) apresentaram baixa intensidade em todas as amostras, o que é incomum para SH, enquanto que a banda de absorção em 1216 cm^{-1} foi observada em todas as frações cromatográficas com intensidade relativamente alta. Esta banda apresentou maior intensidade nas

frações E de todas as amostras e em todas as frações cromatográficas da amostra reflorestamento. Como esta banda é atribuída à deformação axial de C-O (DICK et al., 1997), e as demais bandas de COOH ou COO⁻ são de baixa intensidade, supõem-se que outros grupos, tais como aril-éters contribuam significativamente para a absorção nesta região (STEVENSON e GOH, 1971).

Observou-se uma banda intensa em 1050 cm⁻¹, provavelmente devido a uma alta concentração de polissacarídeos. Carboidratos representam cerca de 10% da matéria orgânica do solo (MIANO, 1990) e BRAVARD e RIGHI (1991) observaram a presença de carboidratos em espectros de IVTF de AF extraído de latossolos. A menor intensidade desta banda de polissacarídeos em SH obtidas pelo método clássico pode ser devido ao fato que, com o uso de soluções básicas concentradas para a extração e fracionamento químico por precipitação com ácido, pode-se eliminar grande parte destes carboidratos, pois, aproximadamente metade do C orgânico presente na fração solúvel em ácido seria de substâncias não húmicas (ORLOV, 1986, p. 162) que seriam descartadas ao isolar-se o AH. STEVENSON e GOH (1971) constataram que a hidrólise ácida de preparados de SH do tipo III, que apresentam altos conteúdos de material proteínico e polissacarídeos, leva a uma grande redução de intensidade da banda atribuída aos polissacarídeos (1050 cm⁻¹) sem levar ao desaparecimento das bandas de absorção de C-H alifático (2920 e 2840 cm⁻¹), porém não se sabe se estes polissacarídeos são componentes estruturais das SH ou impurezas co-adsorvidas ou co-precipitadas. Estudos de infravermelho de melaninas de fungos, que podem contribuir para a formação de SH nos solos, não tratadas por soluções ácidas ou básicas, apresentam a banda em 1030 cm⁻¹ relativamente intensa, enquanto que o

AH, proveniente do mesmo solo de onde foram isolados os fungos geradores das melaninas em causa, extraídos e fracionados pelo método clássico, praticamente não apresentam esta banda de absorção (PAIM et al., 1990).

Pelos espectros de IVTF observa-se que as frações obtidas são praticamente livres de contaminantes minerais pela ausência das bandas típicas de deformação axial de OH de silicatos e minerais de Al na região de 3400 a 3700 cm^{-1} , logo, pode-se afirmar que a banda de absorção em 1050 cm^{-1} seja devido principalmente aos polissacarídeos e não a impurezas minerais, visto que esta banda pode também ser atribuída à deformação axial de Si-O (GRESSEL et al., 1995).

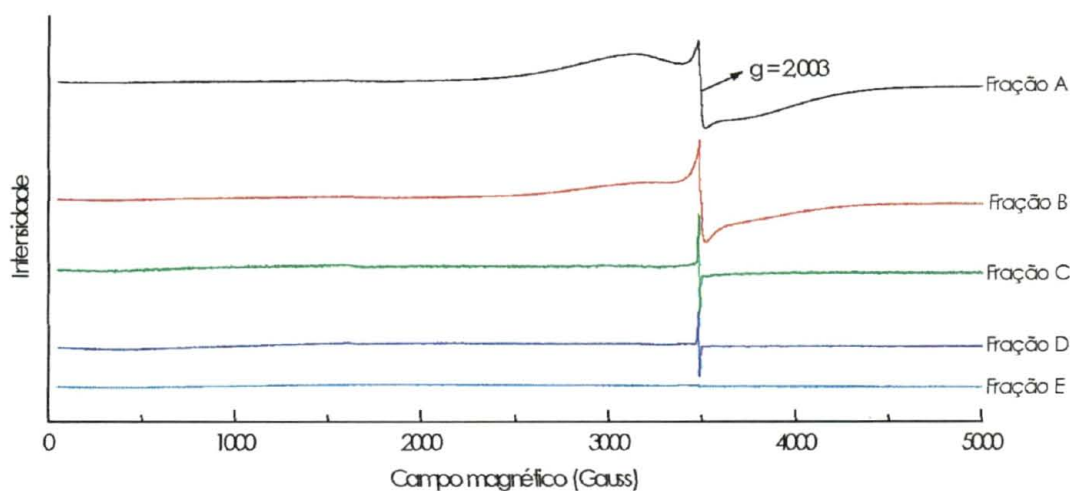
Bandas de absorção em baixas frequências (900-400 cm^{-1}) são de interpretação incerta (PICCOLO e STEVENSON, 1982).

Os espectros de IVTF (figuras 27-31) são típicos de SH do tipo III, embora as bandas atribuídas a grupos carboxílicos (1720 cm^{-1}), carboxilatos (1640 e 1420 cm^{-1}), peptídeos (1540 cm^{-1}) e em alguns casos C-H alifático (2920 e 2850 cm^{-1}) (STEVENSON e GOH, 1971) são muito pouco intensas.

Os espectros de RPE com varredura de campo de 5000 G (figura 32) apresentaram como sinais típicos uma linha larga ($\Delta B \cong 580$ G) centrada em $g \cong 2$ que diminui marcadamente de intensidade com a diminuição do tamanho molecular da fração, sendo ausente nas frações D e E. Este sinal pode ser atribuído à interação dipolar (GOODMAN e HALL, 1994, p. 191) entre íons de Fe^{3+} próximos. A presença deste sinal com maior intensidade na fração A sugere que esta fração possa estar contaminada por minerais, o que não se confirma pelos espectros de IVTF, logo estes íons de Fe^{3+} estariam ligados a fase orgânica. As linhas de ressonância de Fe^{3+} em sítio com simetria rômbrica ($g_1 \cong 4,3$ e $g_2 \cong 8,9$) (MEADS e

MALDEN, 1975), apresentaram intensidade muito baixa, podendo até serem negligenciadas.

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RPE DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM. POTÊNCIA DE MICROONDAS: 2 mW (20dB), VARREDURA DE CAMPO: 5000 G, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 10 G, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K)



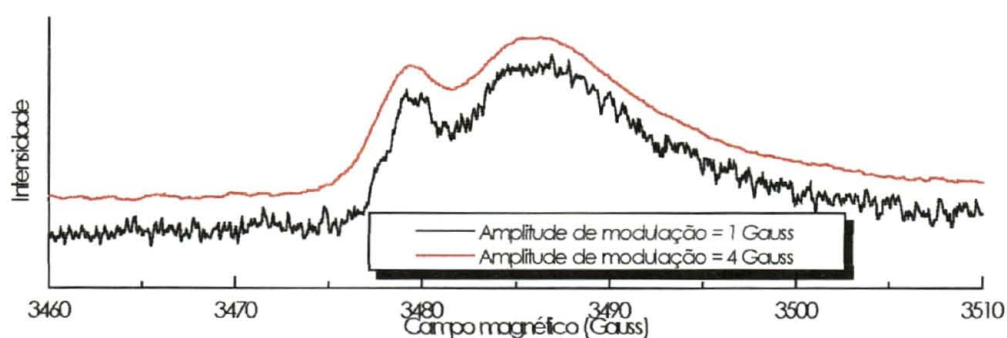
A não observação de sinais de outros metais paramagnéticos como Mn e Cu e a baixa intensidade do sinal de Fe^{3+} em sítio com simetria rômbrica, normalmente observados em espectros de RPE de SH (SENESI et al., 1989), pode ser devido à alta capacidade de quelação da resina e do pirofosfato utilizados como extratores e que levariam à eliminação destes metais contidos no húmus. Exceção é feita ao Fe^{3+} que é observado como impurezas ferri ou ferromagnéticas principalmente nas frações A e B, sendo que este sinal pode ser proveniente de óxidos-hidróxidos de Fe coloidal associados às SH e que passariam através da coluna cromatográfica. O pirofosfato é eficiente para a extração de Fe^{3+} complexado à fração orgânica, mas o Fe^{3+} inorgânico precipitado não é extraído por este reagente (HERMANN e GERKE, 1992).

Um sinal típico em todas as frações húmicas (frações de A a D) foi uma linha estreita centrada em $g \cong 2$ (figura 32), que pode ser atribuída a radicais livres do tipo semi-quinonas (RIFFALDI e SCHNITZER, 1972; SCHNITZER e KHAN, 1978, p. 16; ORLOV, 1986, p. 146-147; SENESI et al., 1989), embora CHESHIRE e McPHAIL (1996) tenham afirmado que os espectros de RPE de SH por eles adquiridos não são similares àqueles de monômeros de semi-quinonas.

A fração E não apresentou nenhum centro paramagnético.

Os espectros de RPE adquiridos em segunda derivada e em detalhe da região de $g \cong 2$ com varredura de campo de 50 G e amplitude de modulação de 1 G nesta região é dado na figura 33.

FIGURA 33 - ESPECTRO DE RPE, COM VARIAÇÃO DA AMPLITUDE DE MODULAÇÃO, DA FRAÇÃO A DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) POR PIROFOSFATO A 0,02 mol L⁻¹. SEGUNDA DERIVADA, POTÊNCIA DE MICROONDAS: 10,1 mW (13dB), VARREDURA DE CAMPO: 50 G, REGIÃO DE $g = 2$, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K)

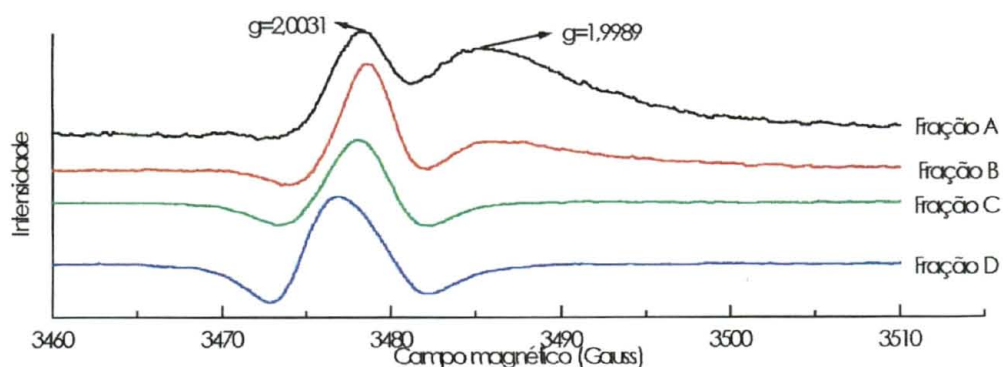


Observou-se que a linha estreita centrada em $g \cong 2$, na fração A, desdobrava-se em duas linhas, uma centrada em $g \cong 2,0030$ com largura de linha de 5 G, e outra centrada em $g \cong 1,9989$ com largura de linha de 16 G ambos devidos, provavelmente, a radicais livres orgânicos pela sua pequena largura de linha em relação a sinais de RPE de metais. Um sinal de RPE com valor- g desta magnitude foi relatado por SENESI et al. (1989a) em amostras de AH aquáticos e foi considerado atípico por estes autores.

Como não se conseguiu maior resolução nesta região, trabalhando-se com amplitude de modulação de 1 G e acumulando-se 1000 varreduras em aproximadamente três horas de aquisição em comparação à aquisição com amplitude de modulação de 4 G (figura 33), resolveu-se adquirir os espectros com sobremodulação de 4 G, mesmo sabendo-se estar deformando o sinal de menor campo e acumulando-se 100 varreduras em aproximadamente 10 minutos de aquisição.

Os espectros de RPE adquiridos com varredura de campo de 50 G, potência de microondas de 10 mW e amplitude de modulação de 4 G das frações A e B de todas as amostras apresentaram estes dois sinais, sendo que na fração A o sinal em campo mais alto foi mais intenso (figura 34).

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RPE DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM. SEGUNDA DERIVADA, POTÊNCIA DE MICROONDAS: 10,1 mW (13 dB), VARREDURA DE CAMPO: 50 G, REGIÃO DE $g = 2$, AMPLITUDE DE MODULAÇÃO: 4 G, TEMPERATURA AMBIENTE (300 K)



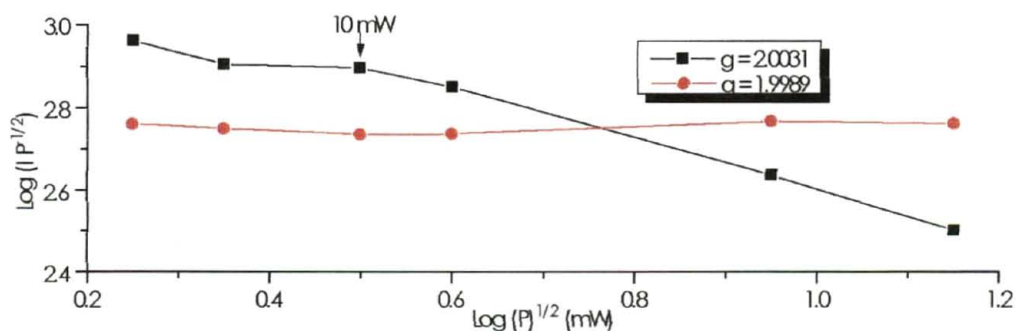
Esta observação pode ser relacionada aos dados de espectroscopia na região do visível, pois a banda em 470 nm foi mais intensa na fração A, diminuiu de intensidade na fração B e quase não foi observada nas demais frações (figura 26), o mesmo ocorrendo com o sinal de RPE centrado em $g \cong 1,9989$. Este sinal de RPE pode ser atribuído ao ânion ou cátion radical de hidroxiantrasemiquinonas

(VATANEN e PEDERSEN, 1996), vistos que medidas de RPE deste tipo de composto apresentavam sinais com larguras de linhas de até 16 G.

As demais frações húmicas apresentaram apenas o sinal centrado em $g \cong 2,0030$ (tabela 12 e figura 34) que pode ser atribuído a cátions ou ânions radicais de semi-quinonas, sendo que este sinal apresenta o maior valor g para a fração D.

Desde que não haja a saturação do sinal de RPE, a intensidade deste é proporcional à raiz quadrada da potência de microondas aplicada, então pode-se determinar facilmente a potência de saturação de um sinal adquirindo-se os espectros, nas mesmas condições, porém variando-se a potência de microondas (GEHRING et al., 1993). Através deste ensaio observou-se que o sinal em $g \cong 2,0030$ satura em 10 mW de potência, enquanto que o sinal em $g \cong 1,9989$ não satura mesmo com 200 mW de potência de microondas (figura 35). Este comportamento diferenciado já era esperado, visto que espécies com tempo de relaxação mais curto apresentam linhas mais largas (DRAGO, 1992, p. 96) e há uma relação inversa entre o tempo de relaxação e a potência na qual ocorreria a saturação do sinal (SENESI, 1990, p. 86-87).

FIGURA 35 - ESTUDO DA VARIAÇÃO DE POTÊNCIA EFETUADO NA FRAÇÃO A DO HÚMUS EXTRAÍDO DA AMOSTRA CAMPO NATIVO (0-5 cm) PELO MÉTODO DA RESINA/ULTRA-SOM



A semelhança dos espectros de RPE de amostras de AH provenientes de solos submetidos à diferentes sistemas de manejo já foi descrita por CHESHIRE e

CRANWELL (1972), que afirmaram que o cultivo não altera o tipo do espectro de RPE do AH extraído do solo.

TABELA 12 - VALORES-g DOS RADICAIS LIVRES DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Fração cromatográfica	Campo nativo (0-5 cm)	Reflorestamento (0-5 cm)	Plantio direto (0-5 cm)	Cultivo mínimo (0-5 cm)
A	2,0031	2,0033	2,0031	2,0034
	1,9989	1,9987	1,9982	1,9990
B	2,0030	2,0031	2,0035	2,0033
	1,9984	1,9982	1,9983	1,9991
C	2,0032	2,0029	2,0032	2,0035
	nd*	nd	nd	nd
D	2,0040	2,0035	2,0040	2,0042
	nd	nd	nd	nd

nd* = não detectado.

A não observação deste segundo sinal centrado em $g \cong 1,9989$ e da sua banda correspondente no espectro de UV-Vis em SH extraídas e fracionadas por método tradicional pode ser devido às alterações do húmus ocasionadas durante estas operações. Estas observações novamente evidenciam as potencialidades do método aqui proposto para o estudo do húmus.

V.3 CONCLUSÕES

Os espectros de IVTF das frações cromatográficas do húmus da camada superficial (0-5 cm) do solo extraído por resina/ultra-som indicaram a presença de altas concentrações de carboidratos associados ao húmus e baixas de grupos carboxílicos/carboxilato.

Observou-se, por RPE, nas frações de maior tamanho molecular a presença de íons Fe^{3+} com acoplamento ferro-ferrimagnéticos e a presença de um sinal

adicional ao de semi-quinonas comumente observado, provavelmente devido também a um radical orgânico do tipo de hidroxiantrasemiquinonas, sinal este que pode estar relacionado à banda centrada em 470 nm observada nas mesmas frações por espectroscopia de UV-Vis.

Os resultados apresentados evidenciam as potencialidades do método aqui proposto para extração e fracionamento do húmus do solo.

A semelhança dos espectros de RPE, das amostras de AH provenientes de solos submetidos à diferentes sistemas de manejo, indica que o cultivo não altera o tipo do espectro de RPE do AH extraído do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AASA, R. 1970. Powder line shapes in electron paramagnetic resonance spectra of high-spin ferric complexes. *J. Chem. Phys.* 52: 3919-3930.
- 2 ABDEL-KADER, F.J.; JACKSON, M.L. e LEE, G.B. 1978. Soil kaolinite, vermiculite, and chlorite identification by an improved lithium DMSO X-ray diffraction test. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 163-167.
- 3 AKENT'YEVA, C.I. e CHIZHOVA, M.S. 1986. Changes in the formation of humus in chernozems caused by long-term sub tillage. *Sov. Soil Sci.* 18: 76-81.
- 4 ANGERS, D.A.; BOLINDER, M.A.; CARTER, M.R.; GREGORICH, E.G.; DRURY, C.F.; LIANG, B.C.; VORONEY, R.P.; SIMARD, R.R.; DONALD, R.G.; BEYAERT, R.P. e MARTEL, J. 1997. Impact of tillage practices on organic carbon and nitrogen storage in cool, humid soils of eastern Canada. *Soil Tillage Res.* 41: 191-201.
- 5 ARIAS, M.; BARRAL, M.T. e DIAZ-FIERROS, F. 1996. Effects of associations between humic acids and iron or aluminium on the flocculation and aggregation of kaolin and quartz. *Eur. J. Soil Sci.* 47: 335-343.
- 6 BAES, A.U. e BLOOM, P.R. 1990. Fulvic acid ultraviolet-visible spectra: Influence of solvent and pH. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54: 1248-1254.
- 7 BATJES, N.H. 1996. Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *Eur. J. Soil Sci.* 47: 151-163.
- 8 BAYER, C. e MIELNICZUK, J. 1997. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. *R. bras. Ci. Solo.* 21: 105-112.

- 9 BEYER, L. 1996. The chemical composition of soil organic matter in classical humic compound fractions and in bulk samples - a Review. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 159: 527-539.
- 10 BEYER, L.; SCHULTEN, H.R. e FRÜND, R. 1992. Properties and composition of soil organic matter in forest and arable soils of Schleswig-Holstein: comparison of morphology and results of wet chemistry, CPMAS-13C-NMR spectroscopy and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 55: 345-354.
- 11 BLEVINS, R.L.; THOMAS, G.W. e CORNELIUS, P.L. 1977. Influence of no-tillage and nitrogen fertilization on certain soil properties after 5 years of continuous corn. *Agron. J.* 69: 383-386.
- 12 BOHN, H.L. 1982. Estimate of organic carbon in world soils: II. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 1118-1119.
- 13 BORGES, G. de O. 1993. Capítulo I: Resumo histórico do plantio direto no Brasil. In: CNPT-EMBRAPA, FUNDACEP-FECOTRIGO e FUNDAÇÃO ABC (Ed.). *Plantio Direto no Brasil. Passo Fundo : Aldeia Norte.* p. 13-17.
- 14 BORIN, M.; MENINI, C. e SARTORI, L. 1997. Effects of tillage systems on energy and carbon balance in north-eastern Italy. *Soil Tillage Res.* 40: 209-226.
- 15 BRANDSTETTER, A.; SLETTEN, R.S.; MENTLER, A. e WENZEL, W.W. 1996. Estimating dissolved organic carbon in natural waters by UV absorbance (254 nm). *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 159: 605-607.
- 16 BRAVARD, S. e RIGHI, D. 1991. Characterization of fulvic and humic acids from an Oxisol-Spodosol toposequence of Amazonia, Brazil. *Geoderma.* 48: 151-162.

- 17 BREMNER, J.M. e LEES, H. 1949. Studies on soil organic matter. Part II. the extraction of organic matter from soil by neutral reagents. *J. Agr. Sci.* 39: 274-278.
- 18 BUFFLE, J. 1990. The analytical challenge posed by fulvic and humic compounds. *Anal. Chim. Acta.* 232: 1-2.
- 19 BUNCE, N.J. 1987. *Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals.* *J. Chem. Educ.* 64: 907-914.
- 20 CAMARGO, O A.; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A. e VALADARES, J. M. A. S. 1986. *Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física dos solos.* (Boletim Técnico nº 106). Campinas : Instituto Agronômico de Campinas.
- 21 CAMERON, R.S.; SWIFT, R.S.; THORNTON, B.K. e POSNER, A.M. 1972. Calibration of gel permeation chromatography materials for use with humic acid. *J. Soil Sci.* 23: 342-349.
- 22 CASTRO FILHO C.; HENKLAIN, J.C.; VIEIRA, M.J. e CASÃO, JR. R. 1991. Tillage methods and soil and water conservation in southern Brazil. *Soil Tillage Res.* 20: 271-283.
- 23 CELI, L.; SCHNITZER, M. e NÈGRE, M. 1997. Analysis of carboxyl groups in soil humic acids by wet chemical method, fourier-transform infrared spectrophotometry, and solution-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. a comparative study. *Soil Sci.* 162: 189-197.
- 24 CHEN, Y.; SENESI, N. e SCHNITZER, M. 1977. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 352-358.
- 25 CHESHIRE, M.V. e CRANWELL, P.A. 1972. Electron-spin resonance of humic acids from cultivated soils. *J. Soil Sci.* 23: 424-430.

- 26 CHESHIRE, M.V. e McPHAIL, D.B. 1996. Hyperfine splitting in the electron spin resonance solution spectra of humic substances. *European J. Soil Sci.* 47: 205-213.
- 27 CLOZEL, B.; ALLARD, T. e MULLER J.-P. 1994. Nature and stability of radiation-induced defects in natural kaolinites: new results and a reappraisal of published works. *Clays Clay Miner.* 42: 657-666.
- 28 CLOZEL, B.; GAITE, J.M. e MULLER J.-P. 1995. Al - O - Al paramagnetic defects in kaolinite. *Phys. Chem. Minerals.* 22: 351-356.
- 29 COELHO NETO, J.A. 1992. Processamento de sinais de ressonância paramagnética eletrônica. Projeto de um sistema de varredura rápida para R.P.E. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências - Física da matéria condensada). Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 119 p.
- 30 CUTLER, A.H. 1980. The behaviour of synthetic ⁵⁷Fe doped kaolin: Mössbauer and electron paramagnetic resonance studies. *Clay Miner.* 15: 429-444.
- 31 DANNEBERG, O.H. 1973. Über die Extraktion von Huminstoffen aus Schwarzerde. *Bodenkultur.* 24: 111-119.
- 32 _____. 1977. Chromatography of humic substances on controlled pore glass. In: *Soil organic matter studies.* v. II. Wien : International Atomic Energy Agency.
- 33 _____. 1981. Eine Möglichkeit zur Trennung von Huminstoffen und Nichthuminstoffen. *Bodenkultur.* 32: 93-104.
- 34 DANNEBERG, O.H. e SCHAFFER, K. 1974. Eine einfache kolorimetrische Analyse des Huminstoffsystems. *Bodenkultur.* 25: 360-368.

- 35 DANNEBERG, O.H. e SCHAFFER, K. 1984. Kompostuntersuchungen mit chromatographischer Unterscheidung von Humin- und Nichthuminstoffen. *Landwirtsch. Forschung. Kongressband*, 487-496.
- 36 DANNEBERG, O.H. e ULLAH, S.M. 1982. Chromatographische Unterscheidung von Huminstoffen und Nichthuminstoffen aus Schwarzerdehumus. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 145: 526-538.
- 37 DARST, B.C. e MURPHY, L.S. 1989. Soil Organic Matter: An integral ingredient in crop production. *Better Crops Plant Food*. 74: 4-5.
- 38 DERPSCH, R. 1984. Capítulo 1: Histórico, requisitos, importância e outras considerações sobre o plantio direto no Brasil. In: Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", TORRADO, P.V.; ALOISI, R.R. (Coord.) *Plantio Direto no Brasil*. Campinas : Fundação Cargill. p. 1-12.
- 39 DICK, D.P.; DICK, Y.P.; SILVA, L.F., ESSIG, C. e ZORTEA, R.B. 1997. Caracterização de produtos de decomposição de lodos orgânicos em diferentes tempos e meios de digestão. *R. bras. Ci. Solo*. 21: 1-8.
- 40 DICK, W.A.; McCOY, E.L.; EDWARDS, W.M.; LAL, R. 1991. Continuous application of no-tillage to Ohio soils. *Agron. J.* 83: 65-73.
- 41 DOBROVOL'SKII, V.V. 1997. Biospheric cycles of heavy metals and regulatory role of soil. *Eurasian Soil Science*. 30: 371-380.
- 42 DORMAAR, J.F. 1974. Molecular-sieve chromatography of humic substances extracted with chelating resin from chernozemic Ah horizons. *Plant Soil*. 41: 51-64.
- 43 DRAGO, R.S. 1992. *Physical methods for chemists*. 2. ed. Orlando : Saunders.

- 44 EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação). 1979. Manual de métodos de análises de solo. Rio de Janeiro : Ministério da Agricultura.
- 45 FRANZLUEBBERS, A.J. e ARSHAD, M.A. 1996. Soil organic matter pools during early adoption of conservation tillage in northwestern Canada. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60: 1422-1427.
- 46 GEHRING, A.U.; FRY, I.V. e SPOSITO, G. 1993. The chemical form of vanadium (IV) in kaolinite. *Clays Clay Miner.* 41: 662-667.
- 47 GERKE, J. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 155: 339-343.
- 48 GERRITSE, R.G. e VAN DRIEL, W. 1984. The relationship between adsorption of trace metals, organic matter, and pH in temperate soils. *J. Environ. Qual.* 13: 197-204.
- 49 GERZABEK, M.H.; DANNEBERG, O.H. e KANDELER. 1993. Bestimmung des Humifizierungsgrades. In: Schinner, F.; Öhlinger, R.; Keeler, E. e Margesin, R. (Ed.). *Bodenbiologische Arbeitsmethoden - Zweite überarbeitete und weiterte Auflage.* Berlin : Spring. p. 107-109.
- 50 GERZABEK, M.H. e ULLAH, S.M. 1989. Humic substances in soils from Bangladesh, Namibia and Canada. *International Agrophysics.* 5: 197-203.
- 51 GIL, V.M.S. e GERALDES, C.F.G.C. 1987. *Ressonância Magnética Nuclear.* Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian.
- 52 GLACKIN, J.J. 1976. Chemistry: The black art? *J. Chem. Educ.* 53: 267.

- 53 GOODMAN, B.A e HALL, P. L. 1994. Electron paramagnetic resonance spectroscopy. In: WILSON, M.J. (Ed.) *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*. London : Chapman & Hall. p. 173-225.
- 54 GRESSEL, N.; McGRATH, A.E.; McCOL, J.G. e POWERS, R.F. 1995. Spectroscopy of aqueous extracts of forest litter. I: suitability of methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59: 1715-1723.
- 55 HAAG, H.P; MELLO, F.A.F.; BRASIL SOBRINHO, M.O.C. e VEIGA, A.A. 1961. Composição química do *Eucalyptus alba* e *Eucalyptus grandis* - resultados preliminares - In: SEGUNDA CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO. (1961 : São Paulo). *Anais...* São Paulo : [s.n.] 2: 1329-1334
- 56 HARROLD, L.L.; EDWARDS, W.M. 1972. A severe rainstorm test of no-till corn. *J. Soil and Water Cons.* 27: 30.
- 57 HAVLIN, J.L.; KISSEL, D.E.; MADDUX, L.D.; CLAASSEN, M.M. e LONG, J.H. 1990. Crop rotation and tillage effects on soil organic carbon and nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54: 448-452.
- 58 HAVLIN, J.L. e SCHLEGEL, A.J. 1989. Increasing soil organic matter with soil/crop management. *Better Crops Plant Food.* 74: 7-9.
- 59 HERMANN, R. e GERKE, J. 1992. Complexation of iron (III) to humic substances of a humic podzol at pH 2.5 - 6.4 - quantification of the organically complexed iron by pyrophosphate extraction. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 155: 229-232.
- 60 IAPAR (Fundação Instituto Agronômico do Paraná). 1978. *Cartas Climáticas Básicas do Estado do Paraná*. Londrina : IAPAR.

- 61 IAPAR (Fundação Instituto Agronômico do Paraná). 1979. Relatório técnico anual. Londrina : IAPAR.
- 62 JONES, J.N.; MOODY, J.E.; SHEAR, G.M.; MOSCHLER, W.W.; LILLARD, J.H. 1968. The no-tillage system for corn (*Zea mays* L.). Agron. J. 60: 17-20.
- 63 KABATA-PENDIAS, A. e PENDIAS, H. 1985. Trace elements in soils and plants. 3. ed. Boca Raton : CRC.
- 64 KARLEN, D.L. 1989. Proper Management of Soils Can Increase Organic Matter. Better Crops Plant Food. 74: 12-14.
- 65 KITCHEN, N.R.; HAVLIN, J.L. e WESTFALL, D.G. 1990. Soil sampling under no-till banded phosphorus. Soil Sci. Soc. Am. J. 54: 1661-1665.
- 66 KONONOVA, M.M. 1966. Soil organic matter. Oxford : Pergamon Press.
- 67 KUITERS, A.T. e MULDER, W. 1993. Complexometric gel permeation chromatography of soluble humic substances using Sephadex G-25. J. Soil Sci. 44: 501-512.
- 68 KUTSCH, H. 1985. Zur Verwendung von chelatisierenden Harzen bei der Extraktion von Huminstoffen aus Mineralböden. Landwirtschaft. Forschung. 38: 245-254.
- 69 LAGALY, G. 1981. Characterization of clays by organic compounds. Clay Miner. 16: 1-21.
- 70 LAL, R. 1997. Long-term tillage and maize monoculture effects on a tropical Alfisol in western Nigeria. II. Soil chemical properties. Soil Tillage Res. 42: 161-174.

- 71 LESSA, A.S.N.; ANDERSON, D.W. e CHATSON, B. 1996. Cultivation effects on the nature of organic matter in soils and water extracts using CP/MAS ^{13}C NMR spectroscopy. *Plant Soil*. 184: 207-217.
- 72 LIMA, V.C.; LIMA, J.M.J.C.; EDUARDO, B.J.F.P. e CERRI, C.C. 1994. Conteúdo de carbono e biomassa microbiana em agrossistemas: comparação entre métodos de preparação do solo. *Revista do Setor de Ciências Agrárias*. 13: 297-302.
- 73 LOVLEY, D.R.; COATES, J.D.; BLUNT-HARRIS, E.L.; PHILLIPS, E.J.P. e WOODWARD, J.C. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*. 382: 445-448.
- 74 LYNCH, J.M. 1984. Interactions between biological processes, cultivation and soil structure. *Plant Soil*. 76: 307-318.
- 75 MAACK, R. 1981. *Geografia Física do Estado do Paraná*. 2. ed. Rio de Janeiro : J. Olympio.
- 76 MACHADO, P.L.O. de A. e GERZABEK, M.H. 1993. Tillage and crop rotation on humic substances of a Typic Haplorthox from southern Brazil. *Soil Tillage Res*. 26: 227-236.
- 77 MANGRICH, A.S. 1993. Ressonância paramagnética eletrônica no estudo da interação de íons metálicos com ligantes macromoleculares do ambiente. Curitiba. Tese (Concurso de Professor Titular). Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.
- 78 MAPLES, R.L. 1989. Nitrogen can increase cotton yeild and soil organic matter. *Better Crops Plant Food*. 74: 12-14.

- 79 MARTIN NETO, L.; ANDRIULO, A.E. e TRAGHETTA, D.G. 1994. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a Mollisol. *Soil Sci.* 157: 365-372.
- 80 MARTIN NETO, L.; NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J. e POPPI, N.R. 1991. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil. *Soil Sci.* 151: 369-376.
- 81 MATZNER, E. 1992. Factors controlling al-activity in soil solutions in an acid forest soil of the German solling area. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 155: 333-338.
- 82 MEADS, R. E. e MALDEN, P. J. 1975. Electron spin resonance in natural kaolinites containing Fe³⁺ and other transition metal ions. *Clay Miner.* 10: 313-345.
- 83 MERTEN, G.H. e MIELNICZUK. 1991. Distribuição do sistema radicular e dos nutrientes em latossolo roxo sob dois sistemas de preparo de solo. *R. bras. Ci. Solo.* 15: 369-374.
- 84 MIANO, T.M. 1990. Fractionation of water-soluble sugars in two humus profile by thin-layer chromatography. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 153: 241-244.
- 85 MILLER, W.P. e MC FEE, W.W. 1983. Distribution of cadmium, zinc, copper, and lead in soils of industrial northwestern Indiana. *J. Environ. Qual.* 12: 29-33.
- 86 MOHAMAD, S.A.; DANNEBERG, O.H.; SCHAFFER, K. e GERZABEK, M.H. 1993. Schonende Extraktion und chromatographische Kennzeichnung von Huminstoffen in Müll- und Müllklärschlammkomposten. *Bodenkultur.* 44: 219-227.
- 87 MOODY, J.E; SHEAR, G.M.; JONES Jr.; J.N. 1961. Growing corn without tillage. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 25: 516-517.

- 88 MULLER, J.-P.; ILDEFONSE, P. e CALAS, G. 1990. Paramagnetic defect centers in hydrothermal kaolinite from an altered tuff in the Nopal uranium deposit, Chihuahua, Mexico. *Clays Clay Miner.* 38: 600-608.
- 89 NASCIMENTO, E.J.; MOURA FILHO, W.; COSTA, L.M. da; CRUZ, J.C. e REGAZZI, A.J. 1991. Dinâmica da matéria orgânica em um latossolo vermelho-escuro distrófico, fase cerrado, submetido a diferentes sistemas de manejo. *Revista Ceres.* 38: 513-521.
- 90 NIEMEYER, J.; CHEN, Y. e BOLLAG, J. -M. 1992. Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 135-140.
- 91 NOVOTNY, E.H.; BLUM, W.E.H.; GERZABEK, M.H. e MANGRICH, A.S. 1997a. Response of humic substances size fractionations of a typic oxisol from southern Brazil to different management systems. *Geoderma* (submetido para publicação).
- 92 NOVOTNY, E.H.; BLUM, W.E.H.; GERZABEK, M.H. e MANGRICH, A.S. 1997b. A new method for extraction and size fractionation of humic substances. *Geoderma* (submetido para publicação).
- 93 ORLOV, D.S. 1986. *Humus Acids of Soils*. Rotterdam : A. A. Balkema.
- 94 PAIM, S.; LINHARES, L.F.; MANGRICH, A.S. e MARTIN, J.P. 1990. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. *Biol. Fertil. Soils.* 10: 72-76.
- 95 PARISH, R.V. 1990. *NMR, NQR, EPR and Mössbauer spectroscopy in inorganic chemistry*. London : Elis Horwood.

- 96 PAVAN, M.A.; BLOCH, M. de F.; ZEMPULSKI, H. da C.; MIYAZAWA, M. e ZOCOLER, D.C. 1991. Manual de análise química de solo. Londrina : IAPAR.
- 97 PAVAN, M.A. e MIYAZAWA, M. 1984. Disponibilidade do manganês no solo; dificuldades e problemas na interpretação da análise para fins de fertilidade. R. bras. Ci. Solo. 8: 285-289.
- 98 PHILLIPS, S.H e YOUNG Jr., H.M. 1973. No-tillage farming. Milwaukee : Reiman.
- 99 PICCOLO, A. e MBAGWU, J.S.C. 1990. Effects of different organic waste amendments on soil microaggregate stability and molecular sizes of humic substances. Plant Soil, 123: 27-37.
- 100 PICCOLO, A.; NARDI, S. e CONCHERI, G. 1996. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. Chemosphere. 33: 595-602.
- 101 PICCOLO, A.; PIETRAMELLARA, G. e MBAGWU, J.S.C. 1997. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. Geoderma. 75: 267-277.
- 102 PICCOLO, A. e STEVENSON, F.J. 1982. Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Ca^{2+} complexes of soil humic substances. Geoderma. 27: 195-208.
- 103 PIONKE, H.B. e COREY, R.B. 1967. Relations between acidic aluminum and soil pH, clay and organic matter. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31: 749-752.
- 104 POHLMAN, A.A. e McCOLL, J.G. 1988. Soluble organics from forest litter and their role in mineral dissolution. Soil Sci. Soc. Am. J. 52: 265-271.
- 105 POTT, D.P.; ALBERTS, J.J. e EIZERMANN. 1985. The influence of pH on the binding capacity and conditional stability constants of aluminum and naturally-occurring organic matter. Chem. Geol. 48: 293-304.

- 106 PRESTON, C.M. 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.* 161: 144-166.
- 107 PROST, R.; DAMEME, A.; HUARD, E.; DRIARD, J. e LEYDECKER, J.P. 1989. Infrared study of structural OH in kaolinite, dickite, nacrite, and poorly crystalline kaolinite at 5 to 600 K. *Clays Clay Miner.* 37: 464-468.
- 108 REICOSKY, D.C.; DUGAS, W.A. e TORBERT, H.A. 1997. Tillage-induced soil carbon dioxide loss from different cropping systems. *Soil Tillage Res.* 41: 105-118.
- 109 REMMLER, M.; GEORGI, A. e KOPINKE, F.-D. 1995. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry as a method for the determination of the molecular mass distribution of humic acids. *Eur. Mass Spectrom.* 1: 403-407.
- 110 RIEDMÜLLER, G. 1978. Neoformations and transformation of clay minerals in tectonic shear zones. *Min. Petr. Mitt.* 25: 219- 242.
- 111 RIFFALDI, R e SCHNITZER, M. 1972. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Amer. Proc.* 36: 301-305.
- 112 ROSELL, R.A.; ORTIZ, M.I. e QUEVEDO, L. 1971. A comparison of the effectiveness of various extractants for determining humus quality in a calcareous soil. *Soil Sci. Plant Anal.* 2: 275-282.
- 113 ROTH, C.H.; WILCZYNSKI, W. e CASTRO FILHO, C. 1992. Effect of tillage and liming on organic matter composition in a Rhodic Ferralsol from southern Brazil. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 155: 175-179.
- 114 ROUXHET, P.G.; SAMUDACHEATA, N.; JACOBS, H. e ANTON, O. 1977. Attribution of the OH stretching bands of kaolinite. *Clay Miner.* 12: 171-180.

- 115 RUSSELL, J.D. e FRASER, A.R. 1994. Infrared methods. In: WILSON, M.J. (Ed.) *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*. London : Chapman & Hall. p. 11-67.
- 116 SCHNITZER, M. 1991. Soil organic matter-the next 75 years. *Soil Sci.* 151: 41-58.
- 117 SCHNITZER, M. e KAHN, S.U. 1972. *Humic substances in the environment*. New York : Marcel Dekker.
- 118 _____. 1978. *Soil Organic Matter*. Amsterdam : Elsevier.
- 119 SCHULTEN, H.-R.; HEMPFLING, R.; HAIDER, K.; GRÖBLINGHOFF, F.F.; LÜDEMANN, H.-D. e FRÜND, R. 1990. Characterization of cultivation effects on soil organic matter. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 153: 97-105.
- 120 SCHULTEN, H.-R. e SCHNITZER, M. 1997. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.* 162: 115-130.
- 121 SENESI, N. 1990. Application of Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy in Soil Chemistry. *Advances in soil science*, V.14. New York : Springer.
- 122 SENESI, N.; BOCIAN, D.F. e SPOSITO, G. 1985. Electron spin resonance investigation of copper(II) complexation by soil fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 114-119.
- 123 SENESI, N.; MIANO, T.M.; PROVENZANO, M.R. e BRUNETTI, G. 1989a. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci. Total Environ.* 81-82: 143-156.
- 124 SENESI, N.; SPOSITO, G. e BRADFORD, G.R. 1989b. Iron, copper, and manganese complexation by forest leaf litter. *For. Sci.* 35: 1040-1057.

- 125 SHEAR, G.M.; MOSCHLER, W.W. 1969. Continuous corn by the no-tillage and conventional methods: a six-year comparison. *Agron. J.* 61: 524-526.
- 126 SIDIRAS, N. e PAVAN, M.A. 1986. Influência do sistema de manejo do solo no nível de fertilidade. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 10: 249-254.
- 127 SOMBROEK, W.G.; NACHTERGAELE, F.O. e HEBEL, A. 1993. Amounts, dynamics and sequestrations of carbon in tropical and subtropical soils. *Ambio.* 22: 417-426.
- 128 SPOSITO, G. 1989. *The Chemistry of Soils.* New York : Oxford University.
- 129 STALEY, T.E, EDWARDS, W.M.; SCOTT, C.L. e OWENS, L.B. 1988. Soil microbial biomass and organic component alterations in a no-tillage chronosequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52: 998-1005.
- 130 STARSINIC, M.; OTAKE, Y.; WALKER Jr., P.L; PAINTER, P.C. 1984. Application of FT-i.r. spectroscopy to the determination of COOH groups in coal. *Fuel.* 63: 1002-1007.
- 131 STEVENSON, F.J. 1982. *Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions.* New York : Wiley.
- 132 STEVENSON, F.J. e GOH, K.M. 1971. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 35: 471-483.
- 133 TAM, S.C.; SPOSITO, G. e SENESI, N. 1991. Spectroscopic and chemical evidence of variability across a pine litter layer. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55: 1320-1325.
- 134 TEDESCO, M.J.; WOLKWEISS, S.J. e BOHMEN, H. 1985. Análises de solo, plantas e outros materiais. (Boletim Técnico Solos, n. 5). Porto Alegre : UFRGS.

- 135 THENG, B.K.G.; TATE, K.R. e SOLLINS, P. 1989. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: COLEMAN, D.C.; OADE, J.M. e UEHARA, G. (Ed.) *Dynamics of Soil Organic Matter in tropical Ecosystems*. Honolulu : University of Hawaii. Cap. 1, p. 5-32.
- 136 VATANEN, V. e PEDERSEN, J.A. 1996. Electron paramagnetic resonance and cyclic voltammetry studies of the cations and anions of α -aminoanthraquinones obtained by electrochemical oxidation/reduction. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*: 2207-2212.
- 137 WALTERS, D.T.; AULAKH, M.S. e DORAN, J.W. 1992. Effects of soil aeration, legume residue, and soil texture on transformations of macro- and micronutrients in soils. *Soil Sci.* 153: 100-107.
- 138 WANDER, M.M. e TRAINA, S.J. 1996. Organic matter fractions from organically and conventionally managed soils: I. Carbon and nitrogen distribution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60: 1081-1087.
- 139 WILCKEN, H.; SORGE, C. e SCHULTEN, H.-R. 1997. Molecular composition and chemometric differentiation and classification of soil organic matter in Podzol B-horizons. *Geoderma*. 76: 193-219.
- 140 WILSON, M.J.; RUSSEL, J.D.; TAIT, J.M.; CLARK, D.R.; FRASER, A.R. e STEPHEN, I. 1981. A Swelling hematite/layer-silicate complex in weathered granite. *Clay Miner.* 16: 261-278.