

Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro

D. C. Primo¹, R. S. C. Menezes¹, T. O. da Silva²

¹*Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540, Recife-PE*

²*Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE.*

darioprino@gmail.com, rmenezes@ufpe.br, tacios@ufs.br

(Recebido em 30 de janeiro de 2011; aceito em 12 de maio de 2011)

O presente estudo objetiva apresentar uma síntese do atual conhecimento sobre os conceitos e fundamentos das substâncias húmicas, métodos de extração, fracionamento, purificação e caracterização, através do uso de técnicas espectroscópicas, além de traçar um panorama dos avanços dos estudos científicos relacionados ao tema na região Nordeste do Brasil. A matéria orgânica do solo (MOS) tem uma série de funções no meio ambiente, que incluem a fertilidade e a reciclagem de nutrientes e de carbono. No entanto, devido à sua natureza extremamente complexa, sua caracterização sempre foi um desafio na química do solo. Dada à comprovação da MOS em aumentar a capacidade produtiva dos solos, em particular em solos tropicais, pesquisas visando o melhor entendimento de sua dinâmica no solo tem sido incentivadas. Há crescente interesse no melhor entendimento de suas frações estáveis, denominadas substâncias húmicas (SHs), constituídas por ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina. O estudo das SHs no meio ambiente desenvolveu-se bastante nas últimas três décadas, graças a novas metodologias e equipamentos, porém sua origem e métodos adequados para mensurar o grau de humificação ainda são tema de discussão. As várias técnicas utilizadas atualmente nem sempre são acessíveis por serem complexas e requererem equipamentos de alto custo, o que pode ter limitado o desenvolvimento das pesquisas em algumas regiões do Brasil, como a Nordeste.

Palavras - chave: Métodos de extração, Técnicas espectroscópicas, Fracionamento da matéria orgânica, Região Nordeste

This study aims to present a synthesis of current knowledge about the concepts and fundamentals of humic substances, methods of extraction, fractionation, purification and characterization, by using spectroscopic techniques, and provides an overview of the developments of scientific studies related to the subject in Northeastern Brazil. The soil organic matter (SOM) has a number of functions in the environment, including fertility, nutrient cycling and carbon. However, by their very nature extremely complex, its characterization has always been a challenge in soil chemistry. Given the evidence of SOM to increase the productive capacity of soils, particularly in tropical soils, research aimed at better understanding the dynamics of the soil has been encouraged. There is growing interest in better understanding of their stable fractions, called humic substances (HSs), consisting of fulvic acid, humic acids and humin. The study of SHs in the environment has grown significantly in the last three decades, thanks the new methods and equipment, but their origin and methods for measuring the degree of humification are still widely discussed. The various techniques used today not always accessible because they are complex and require costly equipment, which may have limited the development of research in some areas of Brazil, like the Northeast.

Keywords: Extraction methods, spectroscopic techniques, Fractionation of organic matter, Northeast Region

1. INTRODUÇÃO

A matéria orgânica do solo (MOS) compreende componentes vivos e não-vivos. Os vivos são as raízes de plantas e os organismos do solo, constituindo aproximadamente 4% do total. Os componentes não-vivos representam a matéria macromolecular, constituída de resíduos de plantas em decomposição, as substâncias humificadas e as não humificadas. Sabe-se que a MOS constitui o maior reservatório de carbono da superfície terrestre e que é dinâmico, podendo variar em decorrência de práticas de manejo. Na maioria dos solos, o teor de MOS pode variar de 5 a 50 g.kg⁻¹ nos horizontes minerais [1,2].

A importância da adição e conservação da MOS nos solos bastante intemperizados como, por exemplo, no semiárido do Nordeste brasileiro, advém do seu baixo teor, associada normalmente ao baixo pH do solo devido à presença de óxidos de alumínio. Por outro lado, nos sistemas agrícolas onde não há entrada de nutrientes de fontes externas, a matéria orgânica do solo (MOS) é a principal fonte de nutrientes, como é o caso da agricultura de subsistência da região semiárida do nordeste do Brasil [3]. O uso da matéria orgânica em solos com baixo pH e baixa fertilidade natural, permite dentre outros fatores, o aumento da CTC, rápida correção da acidez, tendendo a estabilizar o pH próximo à neutralidade e o fornecimento de nutrientes às plantas [4], tornando-se fator de grande relevância para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos dessa região.

A comprovação da MOS em aumentar a capacidade produtiva dos solos, em particular, em solos tropicais, tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas visando melhor entendimento da sua dinâmica, especificamente de suas frações estáveis, denominadas de substâncias húmicas (SHs). As SHs podem ser entendidas como produtos das transformações químicas e biológicas dos resíduos vegetais e animais, assim como da atividade dos micro-organismos do solo. Contudo, os conhecimentos sobre suas origens e processos de humificação, em diferentes sistemas de cultivo e ecossistemas, ainda são hipotéticos, principalmente sobre a estrutura físico-química e o potencial de retenção de nutrientes.

As SHs, constituintes de aproximadamente 70 a 80% da MOS na maioria dos solos são compostas pelas frações ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e humina (HUM), determinadas com base na solubilidade em meio ácido ou alcalino [1, 2]. O estudo das SHs no meio ambiente desenvolveu-se bastante nas últimas três décadas, graças ao desenvolvimento de novas metodologias e equipamentos, porém as rotas de suas origens e os métodos para mensurar o grau de humificação são ainda tema de discussão, pois não há um modelo definido para a estrutura química das frações humificadas da MOS.

Os estudos das SHs vão desde os métodos de extração, fracionamento e purificação até a caracterização por métodos espectroscópicos. Os métodos de extração mais utilizados são Kononova, Dabin, Danneberg & Ullah, Schmitzer, Swift, Benites e os de purificação são os com ácido fluorídrico (HF), resina DAX-8, diálise e liofilização. A caracterização é feita por técnicas espectroscópicas, sendo as espectroscopias na região do ultravioleta-visível (UV), na região do infravermelho (IV), fluorescência, ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) as mais utilizadas ultimamente.

Várias das técnicas utilizadas atualmente nos estudos das frações estáveis da matéria orgânica são de pouca acessibilidade, por serem complexas e os equipamentos necessários são de alto custo de aquisição e manutenção, o que pode estar limitando o desenvolvimento de pesquisas dessa natureza em algumas regiões do Brasil. As reuniões bianuais realizadas pela Sociedade Internacional das Substâncias Húmicas (IHSS) vem oferecendo grande contribuição na oferta e organização de informações sobre as frações húmicas da MOS no solo e nas águas, sua estrutura e transformação no meio ambiente.

Assim, o presente estudo apresenta uma síntese do atual conhecimento sobre os conceitos e fundamentos das SHs, métodos de extração, fracionamento, purificação e caracterização, através do uso de técnicas espectroscópicas, além de traçar um panorama dos avanços dos estudos científicos relacionados ao tema na região Nordeste do Brasil. O conhecimento gerado pode servir para a tomada de decisão relacionada ao uso e manejo dos solos dessa região.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 CONCEITOS E ESTRUTURA DAS SHs

A matéria orgânica do solo (MOS) é considerada como todo material no solo que contém carbono orgânico, incluindo os micro-organismos vivos e mortos, resíduos de plantas e animais em estágios variados de decomposição, a biomassa microbiana, as raízes e a fração mais estável, denominada húmus [5]. A MOS desempenha papel fundamental nas funções do solo, sendo, por

isso, considerada a principal característica indicadora da sua qualidade, por apresentar forte interrelação com quase todas as características físicas, químicas e biológicas do solo, exercendo forte influência na sua capacidade produtiva e, de modo muito intenso, na nutrição das plantas [2].

A MOS tem recebido atenção considerada nas pesquisas, particularmente na última década. É constituída por C, H, O, N, S e P, com os teores 58%, 6%, 33% e os três últimos 3% [4]. Estudos mais recentes têm mostrado que a MOS na fração pesada associada ao material sedimentado (areia, silte e argila) geralmente compreende aproximadamente 80% do carbono orgânico total (COT) e nela estão presentes as frações estáveis denominadas de substâncias húmicas (SHs). Segundo [1], as SHs podem ser definidas como uma série de polímeros amorfos de coloração amarela, marrom a preta, de peso molecular relativamente alto e formado por reações de sínteses secundárias, bióticas e abióticas, usualmente classificados em relação a sua solubilidade em álcali e ácidos.

São divididas em três frações com distintas características físico-químicas: ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e humina (HUM). As SHs contribuem com cerca de 85 a 90% do COT e são o principal componente da MOS, consistindo em grande reserva orgânica do solo [4]. A parte humificada da MOS do solo é formado por moléculas recalcitrantes de origem vegetal, animal e microbiana e representa um estado indefinido da MOS. Mesmo com os recursos da química moderna, a estrutura molecular das SHs é ainda assunto de muitos estudos e controvérsias. São formadas por mistura heterogênea e bastante complexa de moléculas orgânicas, polimerizadas e com massa molecular bastante variada [2].

2.2. Ácidos Fúlvicos

Os ácidos fúlvicos são solúveis em meio alcalino e em ácido diluído. São constituídos, sobretudo, por polissacarídeos, aminoácidos e compostos fenólicos, que são mais reativos do que as outras duas frações pela maior quantidade de grupos carboxílicos e fenólicos que contém. Estudos da ação direta das SHs sobre o metabolismo e o crescimento das plantas têm sido centrados principalmente, sobre os AF, a fração humificada considerada de menor massa molecular e maior solubilidade e mobilidade no solo [1, 6].

2.3. Ácidos Húmicos

Os ácidos húmicos são solúveis em meio alcalino e insolúveis em meio ácido diluído. Têm sido definidos como substâncias de coloração escura, compostas por macromoléculas de massa molecular relativamente elevada, formadas por meio de reações de síntese secundárias a partir de resíduos orgânicos de plantas, animais e micro-organismos [1]. Entretanto, alguns estudos têm sugerido novas concepções para a estrutura complexas dessas frações. Os AH apresentam maior teor de C, menor de O e teor similar de H que os AF [7]. Isso pode ser comprovado com os estudos realizados por [8] em amostras de um Argissolo Amarelo.

A massa molecular relativa dos AH é maior do que a dos AF, tendendo a ter mais aromáticos e menos carboxílicos e grupos C-O alquil do que os AF [7] possivelmente por possuírem maior conteúdo de estruturas tipo polissacarídeos. Entre as SHs, os AF e AH são os mais estudados. As composições médias de unidades básicas de AF e AH, em termos de fórmulas químicas, são respectivamente $C_{135}H_{182}O_{95}N_5S_2$ e $C_{187}H_{186}O_{89}N_9S_2$ [9]. Os AH e AF são bastantes reativos e essa elevada reatividade deve-se principalmente, à presença de grupos funcionais que contem oxigênio, tais como carboxilas e hidroxilas fenólicas que são responsáveis pela sua acidez. A acidez dos AH é menor que a AF, o que está relacionado com seus menores teores de carboxilas [8].

2.4. Humina

A humina é insolúvel em meio alcalino e meio ácido e pode ter composição variada. Possui reduzida capacidade de reação. A sua não insensibilidade em meio aquoso pode ser devida simultaneamente à elevada hidrofobicidade e forte interação com os componentes inorgânicos e

também por conter compostos lipídicos, estruturas de carboidratos e aromáticos em diferentes proporções [10]. A HUM apresenta baixa acidez em comparação aos AF e AH, o que, ao lado da forte associação com os minerais, acarreta insolubilidade em meio aquoso alcalino [1]. A insolubilidade da HUM pode ser proveniente da sua firme adsorção ou ligação a constituintes inorgânicos do solo.

3. FORMAÇÃO DAS SHs

Os estudos sobre a formação e estrutura das SHs não são recentes. Ao final do século XIX, já se considerava que as SHs possuíam natureza principalmente coloidal e com propriedades fracamente ácidas. Havia também informações a respeito de sua interação com outros componentes do solo e a noção de que os AH seriam essencialmente lignina modificada. No início da década de 30 do século XX, sabia-se que os AH eram os constituintes mais característicos das SH. Inferia-se que havia grupos carboxílicos e os AH eram formados principalmente por compostos nitrogenados (proteínas) e anéis aromáticos derivados da lignina [1].

A via de insolubilização refere-se à humificação dos compostos fenólicos solúveis, a partir da sua oxidação a quinona e polimerização, formando inicialmente dímeros e trímeros que compõem a maior parte da policondensação dos núcleos aromáticos. A partir da policondensação dos núcleos aromáticos destes compostos (dímeros e trímeros) são formados os ácidos fúlvicos, os quais se condensam, formando os ácidos húmicos castanhos que, por sua vez, formam os ácidos húmicos cinzentos [11].

Por apresentarem alta complexidade química e forte interação com a fração coloidal inorgânica do solo, essas substâncias decompõem-se lentamente e acumulam-se nos solos. As SHs são formadas a partir do processo denominado humificação. Dentre as várias possibilidades, encontra-se desde a clássica teoria que considera que são formadas a partir da lignina modificada até a teoria mais aceita na atualidade, a chamada de rota dos polifenóis. As rotas que envolvem a síntese das SHs a partir da condensação de polifenóis e compostos aminados são as mais aceitas atualmente [6].

A lignina é um polímero disperso numa faixa de massa molecular que varia de menos de 1000 até vários milhões de Daltons [12] e a sua resistência à degradação biológica no solo tem sido atribuída a sua estrutura macromolecular. As ligninas são formadas a partir de três precursores básicos, que são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Algumas ligninas consistem de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila [13].

Muitos pesquisadores têm tentado desenvolver modelos químicos para representar a estruturas médias dessas substâncias, como as apresentadas para AH por [14] e por [15]. A grande variação no grau de polimerização e no número de cadeias laterais e radicais que podem ser encontradas nas SHs faz com que não existam similaridade entre duas moléculas húmicas. Conforme argumento apresentado por [1] as substâncias húmicas são quimicamente muito parecidas, mas as frações podem ser diferenciadas umas das outras pela cor, massa molecular, presença de grupos funcionais, grau de polimerização e teores de C, O, H, N e S.

Estudos com microscopia de ressonância magnética nuclear têm demonstrado que as SHs resultam da agregação de várias classes de compostos orgânicos como açúcares, aminoácidos, ésteres e éteres alifáticos e aromáticos [16]. Com o uso da técnica de “dosy” (diffusion ordered spectroscopy), [17] afirmou que é possível identificar várias classes de compostos nos agregados do solo e, demonstrou que as SHs são, na realidade, associações ou agregações de moléculas de menores pesos moleculares que podem ser rompidas pela ação de ácido.

4. IMPORTÂNCIA DAS SHs PARA O SOLO E AS PLANTAS

As SHs exercem influência amplamente reconhecida nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e, conseqüentemente, no crescimento das plantas [18]. Não encontrando

estudo na região Nordeste, citou-se um estudo recente desenvolvido na região Sudeste, objetivando estudar os efeitos de concentrações de C-ácido húmico na nutrição e no crescimento de mudas de Eucalipto em solução nutritiva, em que [19] afirmaram que a altura e o diâmetro do caule reduziram de modo linear com a aplicação de concentrações de C-ácido húmico.

A utilização do material húmico, em baixas concentrações de C-ácido húmico (0,07-4,3 mg.L⁻¹), propiciou a máxima produção de matéria seca de raiz, caule, folha e total. Adicionalmente, as SHs melhoram a estrutura do solo, aumentam a produtividade e a qualidade dos cultivos, disponibilizam fósforo adsorvido na fração argila, aumentam a superfície específica, a CTC e o efeito tampão, dando maior estabilidade ao solo e atuam como reservatório de N, P, S e micronutrientes. Neste contexto, as SHs são, portanto, importantes reguladores funcionais dos processos químicos e biológicos do solo e das plantas, representando, por isso, um forte fator para a sustentabilidade dos ecossistemas terrestres [2].

Segundo [20] as SHs têm poder redutor suficiente para transformar Fe³⁺ em Fe²⁺, forma absorvida pelas plantas. Os AF desempenham importante papel na complexação de metais polivalentes além de alterarem as reações de sorção e disponibilidade de P. Combina-se com os óxidos de Fe e de Al, argilas e outros compostos orgânicos. Possuem propriedades redutoras e formam complexos estáveis com Fe, Cu, Ca e Mg [20].

As SHs podem se ligar à fração mineral do solo através de cátions polivalentes [21]. Os grupos ácidos reativos distribuem-se por toda a macromolécula e, dessa forma, a ligação com cátions polivalentes pode ocorrer em diferentes partículas de argila simultaneamente. Como resultado, aumenta a agregação das partículas do solo. Essa adsorção não somente une as partículas de argila, mas também orienta a porção hidrofóbica das substâncias húmicas para o lado externo do agregado reduzindo a infiltração de água e aumentando a estabilidade do solo [22].

Estudos realizados por [23] em Cambissolos derivados de calcário na região de Irecê-Ba constataram diferenças pedogenéticas em função do grau de polimerização das SHs. Em certos perfis houve predomínio de compostos pouco polimerizados (AF) e maiores quantidades de compostos bem polimerizados (HUM). Em ambientes diferentes a do Nordeste brasileiro, como de florestas subtropicais, [24] observaram que a substituição de mata nativa por cultivo de pinheiro (*Araucaria cunninghamii*) com 51 anos de idade resultou na diminuição do estoque de C da fração AF, enquanto o estoque de C da fração AH ficou inalterado. Isso mostrou que a fração AF é mais sensível à mudança de uso do solo que a AH.

Os AH ajudam na germinação das sementes, aumentando a retenção de calor pelo solo, graças à coloração, tipicamente escura, que possuem. Esses ácidos exercem efeitos fisiológicos na planta na permeabilidade das membranas das células, absorção de nutrientes e atividade enzimática [25]. A ação detergente e o conseqüente aumento da fluidez das membranas é defendida até hoje como um dos principais efeitos das SHs no metabolismo celular dos vegetais [26].

5. MÉTODOS ANALÍTICOS DE EXTRAÇÃO DAS SHs

Muitos trabalhos são realizados utilizando extratores brandos como pirofosfato de sódio, agentes complexantes, ácido fórmico, misturas ácidas e solventes orgânicos. Mesmo havendo risco de alterações estruturais, há pesquisadores que preferem à extração mais completa das SHs utilizando álcalis. A International Humic Substances Society (IHSS) método [27] recomenda um procedimento baseado em 4 horas de extração com solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ à temperatura ambiente, na razão solo/extrator 1:10 (m/v). Entretanto, vários fatores influenciam no procedimento de extração e muitas questões ainda estão por serem respondidas.

Atualmente são conhecidos vários métodos de extração e fracionamento das SHs: Kononova [28], Dabin [29], Danneberg e Ullah [30], Schnitzer [31], Swift [27], Benites [32], purificação com ácido fluorídrico (HF), resina DAX-8, diálise e liofilização, Swift [27]. Esses métodos diferem quanto ao uso de substâncias extratoras, relação massa da amostra/extrator, tempo de agitação, centrifugação e formas de purificação.

O método Dabin utiliza pirofosfato de sódio (Na₄P₂O₇ 0,1 mol.L⁻¹), relação solo/extrator de 1:20. O método Danneberg e Ullah utiliza água deionizada e resina quelatizante saturada com

sódio numa relação solo/resina/água de 1:2,5:5, agitação por 16 horas e centrifugação por 30 minutos a 15.000 rpm. O método Kononova usa solução de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 mol.L⁻¹), relação solo/solução de 1:20, com agitação e centrifugação. O método Schnitzer usa hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol.L⁻¹), relação solo/solução de 1:10 agitação horizontal a 250 rpm, por 24 horas, e centrifugação. O método de Benites usa o hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol.L⁻¹), relação solo/extrator de 1:10 agitação por 4 horas, centrifugação 15 minutos a 2,5 rpm e o método de Swift usa ácido clorídrico (HCl 0,1 mol.L⁻¹) e hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol.L⁻¹), relação solo/extrator de 1:10, agitação por 1 hora e centrifugação de 9000 rpm por 10 minutos. Os métodos de extração, fracionamento e purificação são procedimentos antecedentes aos estudos de caracterização das SHs por meio de técnicas espectroscópicas.

6. CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

As Substâncias húmicas extraídas do solo apresentam, normalmente, uma quantidade elevada de impurezas inorgânicas, podendo em alguns casos chegar até 50%, devendo ser, portanto, eliminadas antes dos estudos de caracterização. Uma redução considerável dessas impurezas inorgânicas é obtida através de redissoluções e reprecipitações sucessivas, modificando-se o pH da suspensão. Particularmente, eficiente é o tratamento do extrato com solução diluída da mistura de ácido clorídrico e fluorídrico [33]. O extrator ideal deve retirar completamente as substâncias húmicas sem alterar suas características [1]. Nesse sentido, diversas técnicas têm sido empregadas como as espectroscopias na região do ultravioleta-visível (UV), na região do infravermelho (IV), a fluorescência, a ressonância magnética nuclear (RMN) e a ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

6.1. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

A técnica de UV construiu o caminho para as outras técnicas espectroscópicas. Apesar de representar um salto histórico, hoje raramente a espectroscopia de UV-VIS é usada como o principal método na análise estrutural. Isso porque espectros UV-VIS de substâncias húmicas apresentam pouca definição, e a absorção decresce linearmente com o aumento do comprimento de ondas, fornecendo pouca informação estrutural. A espectroscopia de absorção de luz UV-VIS é utilizada especialmente para medidas da razão E_4/E_6 (absorbância a 465 nm/absorbância a 665 nm) que tem sido associada também ao grau de humificação das SHs. Razão E_4/E_6 baixo – significa constituintes aromáticos mais humificados, alto - estruturas alifáticas menos humificadas. Quanto menor E_4/E_6 maior grau de condensação da amostra [33].

Resultados contraditórios podem ser obtidos por essa técnica e, apesar da simplicidade do procedimento experimental, os dados precisam ser utilizados com cautela, sendo recomendado, portanto, comparação com outros métodos mais exatos [34]. Essa técnica baseia-se nas transições eletrônicas, resultantes de absorção de luz por moléculas. Durante o processo de irradiação, a molécula absorve energia e um dos elétrons é excitado do orbital que ocupa no seu estado funcional para outro orbital de maior energia [10].

É uma técnica muito utilizada devido ao fácil manuseio, a rapidez e ao baixo custo operacional. Porém possui baixos limites de detecção e os espectros correspondem a um gráfico de frequência ou comprimento de ondas de absorção, relacionada com a intensidade de absorção medida em transmitância ou absorbância. Essa técnica é largamente utilizada em estudos com SHs de solo para avaliar o grau de humificação, principalmente de AF e de AH [35]. Entretanto, não pode ser utilizada para determinação direta de grupos funcionais quando da análise de ácidos húmicos [36]. Para investigação da MO, o maior interesse em espectroscopia de UV.vis reside em análises qualitativas [37].

6.2. Espectroscopia na região do infravermelho

Os princípios da espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) são os mesmos da espectroscopia na região do ultravioleta-visível, exceto que, na região do IV a quantidade de energia é suficiente para provocar somente movimentos vibracionais nas ligações entre os átomos. Diferentemente das poucas bandas de absorção observadas na região do ultravioleta visível para substâncias húmicas, o espectro de infravermelho fornece maior quantidade de bandas de absorção e mais bem definidas.

Algumas dessas bandas não podem ser interpretadas com segurança. Isso é o caso das substâncias húmicas. A recomendação para o caso de material húmico é o uso do modo comparativo, ou seja, sempre confrontar um espectro contra outro gerando mais informações sobre processos ocorridos no material do que sobre determinação estrutural. A técnica é de alta energia, é absorvida por moléculas orgânicas e a energia é convertida em rotação molecular. Esta absorção é quantizada e assim os sinais de absorção são linhas discretas [33].

O espectro de infravermelho consiste na representação gráfica da correlação entre a intensidade de absorbância (A) ou transmitância (T) e a energia da radiação de IV, expressa em número de ondas. A aplicação dessa técnica na análise de substâncias húmicas é relativamente comum e pode ser aplicada em amostras sólidas, líquidas e gasosas. A restrição quanto à aplicação mais abrangente em substâncias húmicas está relacionada com a complexidade do espectro e com o baixo grau de pureza das amostras analisadas [33]. Os espectros na região de IV de ácidos húmicos, são relativamente simples, quando comparados aos de substâncias puras, possuindo poucas bandas de absorção e geralmente alargadas [33].

6.3. Espectroscopia de fluorescência induzida a laser (FIL)

A espectroscopia de fluorescência permite diferenciar, rapidamente, as diversas frações humificadas do solo, uma vez que os comprimentos máximos de emissão e de excitação se encontram-se em faixas maiores para os AH em relação aos AF. O fenômeno de fluorescência é altamente provável em sistemas moleculares que contêm átomos com pares solitários de elétrons, tais como: C = O, aromáticos, fenólicos, quinonas e, sistemas alifáticos conjugados insaturados rígidos. Esses grupos funcionais estão presentes nas SHs. As propriedades de fluorescência são dependentes de uma série de parâmetros tais como massa molar, concentração, pH, força iônica, temperatura, potencial redox e origem das substâncias húmicas. O estudo das relações entre as propriedades de fluorescência e estes parâmetros pode, portanto, fornecer informações indiretas sobre as características moleculares e a química das substâncias húmicas [38].

Os espectros de fluorescência podem ser medidos por: a) emissão, no qual um monocromador de excitação é mantido com uma seleção de comprimento de onda e o de emissão varre uma banda espectral medindo todos os comprimentos de onda que a amostra emite, sendo o modo mais utilizado de espectroscopia de fluorescência; b) espectro de excitação, no qual o monocromador de emissão é mantido em comprimento de onda fixo no qual a amostra está emitindo e o monocromador de excitação varre uma banda específica, fornecendo informações estruturais do material analisado e localiza a melhor excitação da fluorescência em observação; c) espectro de varredura sincronizada, no qual ambos os monocromadores varrem o espectro juntos com uma diferença fixa de comprimento de onda e obtém-se a multiplicação entre os espectros de emissão e excitação produzindo um espectro com máximos e picos mais bem definidos e característicos de cada fluoróforo que compõe o material que está sendo analisado e d) espectro tridimensional 3D, onde o gráfico é composto por um eixo relativo ao comprimento de onda de emissão, outro relativo de excitação e o terceiro de intensidade. Na formação do gráfico, vários espectros de emissão são registrados em diferentes comprimentos de onda de excitação e em seguida o espectro em 3D pode ser construído [37].

6.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A RMN é a absorção ressonante de radiação radiofrequentada (MHz) por núcleos com spin nuclear (I) diferente de zero e que estejam sujeitos a um campo magnético. Esta técnica é muito sensível na caracterização da estrutura da matéria. Embora conceitualmente simples, a RMN pode ser muito complexa, especialmente em experimentos multidimensionais [37]. As análises das SHs por RMN envolvem a identificação e quantificação dos diferentes grupos funcionais presentes na amostra. A técnica da RMN tem sido utilizada no Brasil, principalmente na avaliação qualitativa da MO em diferentes solos e sistemas de manejo [37].

Essa caracterização é feita pela identificação dos grupos funcionais alifáticos, aromáticos e carboxílicos em suas respectivas bandas representadas [1]. O método mais amplamente usado para a caracterização de SH em geral é o do ^{13}C em estado sólido, utilizando a polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP-MAS), para avaliação do processo de humificação da MOS no solo. O núcleo ideal para estes estudos é o ^{13}C , por se encontrar uniformemente distribuído. No entanto, devido à sua baixa abundância natural, as análises são muito demoradas, requerendo às vezes, um período de mais de 24 horas [37].

Após o primeiro experimento em que essa técnica mostrou-se capaz de resolver questões químicas da matéria, tornou-se uma das principais técnicas analíticas para os químicos, porém, devido à flexibilidade dos seus métodos experimentais, tem sido utilizada por outros ramos da ciência além da química [39]. Um dos problemas em análises por RMN de ^{13}C , especialmente no caso de ácidos húmicos isolados de solos de zonas tropicais com predomínio de minerais de argila é o considerável teor de Fe, que causa um alargamento dos sinais devido ao seu paramagnetismo, além de poder alterar o tempo de relaxação, que por sua vez, altera a intensidade relativa dos sinais. O problema é ainda mais acentuado pelo fato de que o isolamento dos ácidos húmicos envolve a acidificação da amostra de solo, o que causa a degradação dos minerais de Fe, aumentando ainda mais sua concentração na solução de ácido húmico [33].

6.5. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A RPE é o fenômeno de absorção de energia de elétrons desemparelhados de um átomo, molécula ou íon quando estes se encontram sujeitos a aplicação de um campo magnético [40]. Essa técnica permite analisar amostras sólidas, líquidas e gasosas. Tem alta sensibilidade, identifica e determina a concentração do elemento paramagnético, informa o estado de valência, localiza e identifica os radicais livres [41], para inferir sobre o grau de humificação da MO e dos constituintes húmicos [42]. Tem sido utilizada na quantificação do número de radicais livres semiquinona em ácidos fúlvicos e húmicos, o que caracteriza uma avaliação qualitativa das frações húmicas da MOS [43].

Tem sido utilizada em amostras de solo fracionadas fisicamente com o objetivo em reduzir o risco de alterações que possam ocorrer durante o fracionamento químico. Porém, esse procedimento apresenta restrição de aplicações em amostras com altos teores de óxidos de ferro. Isso porque o sinal de RPE do íon de Fe^{3+} , que é paramagnético, se sobrepõe aos sinais dos radicais livres semiquinona. A RPE concerne à detecção de elétrons desemparelhados, sendo uma das poucas, entre os métodos de laboratório, que podem fornecer informações estruturais sem artifícios ou condições experimentais restritivas sobre os complexos dos íons metálicos paramagnéticos (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , V^{4+} , Mo^{5+} , Cr^{3+} e outros), com os ácidos húmicos [43].

A maioria dos experimentos em EPR é efetuada em uma frequência ao redor de 9 GHz, que é conhecida como banda-X de frequência, ou de 35 GHz (banda-Q) [43]. O fenômeno de EPR é baseado no efeito Zeeman eletrônico, ou seja, a capacidade de desdobrar o estado de energia degenerado no nível de spin, o que é obtido através da aplicação de campo magnético. Em seguida, com a aplicação de uma radiação eletromagnética é possível gerar transição dos elétrons com diferentes estados de spins de menor energia para o estado excitado. No retorno ao estado fundamental, essa energia é devolvida ao meio e pode ser detectada. No caso do spin eletrônico (S), o estado de menor energia é $m_s = -1/2$ e o estado excitado é $m_s = +1/2$ [31].

O sinal do radical livre detectado na MOS é caracterizado por uma única linha (com $g \sim 2$), a qual revela estar o radical livre provavelmente associado ao átomo com spin nuclear zero, como, por exemplo, o oxigênio, isótopo mais abundante, o que explicaria a ausência de interações hiperfinas, conforme assegura a multiplicação de linhas dada por $2I + 1$ ($I=0$, então se tem uma linha). Isso permite supor que o sinal de RPE da MOS seja atribuído a semiquinonas, as quais podem ser reduzidas pela redução de quinona ou pela oxidação de fenóis, e que estejam possivelmente conjugadas a anéis aromáticos [44]. Com a RPE é possível analisar-se não destrutivamente amostras sólidas, líquidas e gasosas. É uma técnica extremamente sensível e sob condições favoráveis o limite de detecção para centros paramagnéticos encontra-se no intervalo de 1011 a 1012 spins g-1, o que equivale à parte por bilhão [39].

6.6 Comparação entre as técnicas espectroscópicas descritas

As técnicas espectroscópicas são ferramentas importantes no entendimento de várias e complexas reações no solo. A espectroscopia ultravioleta-visível é uma técnica de manuseio fácil, rápida e de baixo custo, porém com poucas bandas de absorção. Através dessa técnica pode-se avaliar o grau de humificação dos ácidos fúlvicos e húmicos da MOS [37]. Em análises espectroscópicas por infravermelho os espectros fornecem maior quantidade de bandas e mais bem definidas. A interpretação exata de espectros nem sempre é possível devida a sua complexidade [37]. Contudo, a sobreposição de bandas, em muitas situações, pode requerer o uso complementar de outros métodos analíticos. Podem ser realizadas análises em amostras sólidas líquidas e gasosa [45]. A utilidade e o potencial de uso da espectroscopia na região de infravermelho é bastante amplo, adiciona-se ainda como vantagem o custo dos equipamentos, que são bem menores comparados aos espectrômetros de massa e os de ressonância magnética nuclear [33].

A espectroscopia de fluorescência diferencia rapidamente frações humificadas em amostras de solo, porque o comprimento de ondas dos espectros de emissão e excitação encontra-se em faixas maiores que os ácidos fúlvicos e húmicos. As análises podem ser feitas diretamente na amostra, sem necessidade do processo de extração e purificação. A FIL é uma das mais sensíveis ferramentas disponíveis para propostas analíticas [37]. É de fácil implementação e, geralmente, não-invasiva, o que é bastante útil para aplicações ambientais. Além das tradicionais medidas de fluorescência com amostras em solução, usando espectrômetros comerciais, mais recentemente foram viabilizadas análises com amostras em solos, em pastilhas e resultados inéditos foram obtidos sobre MO humificada [46]. Esse método com aplicação em solos é recente e tem demonstrado resultados interessantes na avaliação do grau de humificação da MOS em solos sob diversos tipos manejos.

A ressonância magnética nuclear é uma técnica complexa e bastante demorada. Através dessa técnica, pode ser feita a identificação e a quantificação dos diferentes grupos funcionais da amostra em estudo. Tem sido utilizada em diferentes solos e diferentes sistemas de manejo. A RMN apesar de ser uma técnica de caracterização estrutural relativamente recente, constitui poderosa ferramenta para estudar a MOS, por fornecer informação estrutural das características conformacionais dos núcleos de C e sua dinâmica com alguns fatores ambientais, assim como dos seus processos de transformações e decomposição [47]. É utilizada também para avaliar o efeito do sistema de manejo do solo sobre a qualidade da MOS [48]. A RMN tem substituído à espectroscopia no infravermelho. A técnica de ^{13}C CP-MAS NMR só pode ser aplicada a amostras sólidas. Cientistas do solo e espectroscopistas têm diferentes expectativas em relação à RMN [39].

Por ressonância paramagnética eletrônica faz-se a avaliação qualitativa das frações orgânicas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos, as mais comumente estudadas [37], sendo utilizada em estudo de amostras de solo após fracionamento físico. A técnica de RPE é uma das únicas capazes de fornecer informações estruturais, sem artefatos ou condições experimentais restritivas, sobre a complexação de íons metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , V^{5+} , Cr^{3+} e outros) com substâncias húmicas de solos, água e sedimentos [49].

7. ESTUDOS CIENTÍFICOS COM SHs NO NORDESTE DO BRASIL

Os estudos científicos com as substâncias húmicas na região Nordeste do Brasil são escassos, os poucos que existem muitas vezes não trata de substâncias húmicas e sim de frações lábeis da matéria orgânica como o de [50]. Em outros momentos, iniciou-se os estudos das substâncias húmicas, como o de [51] objetivando verificar o impacto do manejo convencional nas propriedades físicas e no conteúdo e qualidade das SHs num Latossolo Vermelho-Amarelo do cerrado de São Desidério-BA, avaliaram quatro áreas sob diferentes períodos de uso e uma sob cerrado nativo. A extração e o fracionamento foram realizados pelo método Dabin. O processo de humificação e a qualidade da matéria orgânica foi influenciada pela aplicação de calcário que favoreceu o aumento dos teores de cálcio e a atividade microbiana, o que acelerou o processo de humificação da matéria orgânica, e pela rotação de culturas (milho/soja) e que o sistema de cultivo convencional, com o tempo de uso favoreceu o aumento de AF e de HUM e, uma diminuição de AH.

[52] avaliaram e caracterizaram por métodos espectroscópicos (UV-Vis, infravermelho, Fluorescência e EPR), as possíveis mudanças qualitativas no AH extraído de solo fertirrigado com duas fontes de fertilizantes (orgânica e mineral), associadas à aplicação de ácidos orgânicos comerciais, na cultura da goiabeira no vale do São Francisco, no estado de Pernambuco. A extração e o fracionamento do húmus para obtenção dos AH, bem como sua purificação, foram realizados conforme método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas [27]. O esterco proporcionou maior grau de policondensação dos AH e o uso de esterco associado a ácidos orgânicos e fertilizantes minerais favoreceu a formação de AH mais estáveis que os tratamentos que não receberam esterco.

Entre outro estudo [25], caracterizaram AH extraído de carvão vegetal de *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) e *Aspidosperma pyrifolium* (pereiro). A extração foi feita pela metodologia proposta por Haumeir e Zech (1995) e a caracterização por análise elementar, termogravimetria, espectrofotometria no infra-vermelho (IV), espectrofotometria no UV-Visível e fluorescência. Esses autores concluíram que os AH extraídos do carvão apresentaram alta aromaticidade, alta estabilidade, alta CTC e predominância de COOH e, que as técnicas utilizadas permitiram identificar semelhança entre os ácidos húmicos extraídos do carvão vegetal e os AH do solo.

Apesar dos escassos estudos realizados até o momento na região Nordeste do Brasil referente ao tema, há muitos interesses futuros do ponto de vista técnico científico por parte de pesquisadores em ampliar o desenvolvimento de projetos de pesquisas nessa linha. Pois a compreensão dos processos envolvidos na dinâmica da MOS do solo é fundamental para a definição de estratégias de manejo e uso da terra associadas ao desenvolvimento de sistemas de produção agrícolas racionais, viáveis e sustentáveis.

8. CONCLUSÃO

A disponibilidade e o uso de técnicas espectroscópicas no estudo da matéria orgânica é limitada pelo seu alto custo e difícil acesso, especificamente nas Instituições de ensino e pesquisa na região Nordeste do Brasil. Estudos sobre substâncias húmicas em solos da região Nordeste do Brasil são escassos. Os trabalhos sobre as substâncias húmicas com uso de técnicas espectroscópicas a serem realizados no Nordeste do Brasil poderão fornecer inúmeras informações sobre os diferentes manejos nas áreas de cultivo, principalmente com culturas de ciclos curtos.

Muito pouco se sabe sobre os processos de reação das frações estáveis da matéria orgânica nos solos dessa região. As práticas de manejo e, ou de conservação de solo nos sistemas produtivos podem interferir no grau de humificação da MOS. Contudo, os estudos de pesquisas buscando esclarecer melhor a origem, a forma estrutural e importância no sistema solo-planta das frações estáveis da MOS estão aumentando consideravelmente.

1. STEVERSON, F.J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2 ed New York: John Willey, 1994, 496p.
2. MOREIRA, F.M.S. SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.
4. SANTOS, A. A. do E.; LIMA, J.S.; CARVALHO, G.C. de. Técnicas de aplicação de composto orgânico, proveniente de resíduos urbanos domésticos, no desenvolvimento vegetal. VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental 2002.
3. TIESSEN, H., SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. Organic matter turnover and management in low input agriculture of NE Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 61:99-103, 2001.
5. BERG, B.; LASKOWSKI, R. Advances in ecolical research. Litter decomposition: a guide to carbon and nutrient turnover. Academic Press, 38:1-19, 2006.
6. SILVA, I.R.; MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J. C.L. Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS, 2007 p.
7. PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75:57-134, 2002. 27
8. CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 233-240, 2004.
9. SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. Fundamentos da matéria orgânica do solo. Ed. Genesis, Porto alegre, 1999.
10. RICE, J. Humim. *Soil Science*, 166:848-857, 2001.
11. SANTOS, G.A. Contribution a I étuddes interactions matiere organique et phosphore dans un sol ferralitique. Nancy : INPL, 1984. 147f. Tese (Doutorado em engenharia-ciência do solo) Institut National Polytechnique de Loraine, Nancy. 1984.
12. ABREU, H.S. Biossíntese da lignificação. Itaguaí, Edur, 1994.
13. AMALFITANO, C.; PIGNALOSA, V.; AURIEMMA, L.; RAMUNNI, A. The contribution of lignin to the composition of humic acids from a wheat-straw amended soil during 3 years of incubation in pots. *Journal of Soil Science*, 43: 495-504. 1992.
14. SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. Soil organic matter. Elsevier, 1978.
15. AVAREZ-PUEBLA, R.A.; VALENZUELA-CALAHORRO, C.; GARRIDO, J.J. Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregations. A molecular modeling approach. [Science of the Total Environment](#), 358:243-354, 2006.
16. PICCOLO, A.; CONTE, P.; SPACCINI, R.; CHIARELLA, M. Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biology and Fertility of Soils*, 37: 255-259. 2003.
17. SIMPSON, A.J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organica matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 40: 572-582. 2002.
18. ROTH, C.H.; WILCZYNSKI, W.; CASTRO FILHO, C. Effect of tillage and liming on organic matter composition in a Rhodic Ferralsol from Southern Brazil. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 55:175-179, 1992.
19. PINHEIRO, G.L.; SILVA, C.A.; FURTINI NETO, A.E. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de C-ácido húmico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.34, p.1217-1229, 2010.
20. OLSEN, C. On the influence of humus substances on the growth of green plants in water culture. *Comptes Rendus Biologies*, 18:1-16, 1913.
21. CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B. Reações da matéria orgânica. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. Gênesis: Porto Alegre, 1999.
22. PICCOLO, A.; MBAGWU, J.S.C. Humic substances and surfactants effects on the stability of two tropical soils. *Soil Science Society of America Journal*, 58:950-955, 1994.

23. CUNHA, T.J.F.; RIBEIRO, L.P. Qualidade e relações pedogenéticas da matéria orgânica de alguns solos da região do Irecê (BA). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 22: 693-704, 1998.
24. CHEN, C.R.; XU, Z.H.; MATHERSB, N.J. Soil carbon pools in adjacent natural and plantation forests of subtropical. *Soil Science Society of America Journal*, 68:282-291, 2004.
25. PIMENTA, A.S.; SANTANA, J.A.S.; ANJOS, R.M.; BENITES, V.M.; ARAÚJO, S.O. Caracterização de ácidos húmicos produzidos a partir de carvão vegetal de duas espécies florestais do semi-árido: jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e pereiro (*aspidosperma pyrifolium*). *Revista Verde*, 4:01-11, 2009.
26. VARANINI, Z.; PINTON, R.; DE BIASE, M.G.; ASTOLFI, S.; MAGGIONI, A. Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil*, 153: 61-69. 1993.
27. SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D., ed. *Methods of soil analysis: Chemical methods*. Soil Science Society America, 1996. Part 3. p.1018-1020. (Soil Science Society of America, Series, 5).
28. KONONOVA, M.M. *Soil organic matter*. Oxford, Pergamon Press. 1966. 544p.
29. DABIN, B. Étude d'une méthode de fractionnement des matières humiques du sol. *Science du Sol*, 1:47-63, 1971.
30. DANNEBERG, O. H.; SCHMIDT, J. Characterization of humic systems by chromatography on controlled pore glass. *Bodenkerlur*, 29:1-11, 1982.
31. SCHNITZER, M. Organic matter characterization. In: PAGE, A L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. ed. *Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties*. 2^a ed. ASS, SSSA, publisher. Wisconsin USA, 1982.
32. BENITES, V.M.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O.A. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. *Embrapa Solos*, 2003. 7p.
33. CANELLAS, L.P. SANTOS, G.A.. *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. UENF, 2005. 309 p.
34. SAAB, S.C; MARTIN-NETO, L. Anéis aromáticos condensados e realação E4/E6: estudo de ácidos húmicos de gleissolo por RMN de ¹³C no estado sólido utilizando a técnica CP/MAS desacoplamento defasado. *Química Nova*, 30:260-263,2007.
35. BAYER, C. MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUH, J.; SAAB, S.C.;MILORI, D.M.B.P.; BAGNATO, V.S. Tillage an cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonante an fluorescece spectroscopies. *Geoderma*, 105:81-92, 2002.
36. MacMARTHY, P.; RICE, J.A. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances: In: ALKEN, G. R. ET AL. (Eds.) *Humic substances in soil, sediment and water*. 1985.
37. ABREU JUNIOR, C.H.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; SIMÕES, M.L.; SILVA, W.T.L. Métodos analíticos utilizados em química do solo. In: MELO, V.F; ALLEONI, L. R.F. *Química e mineralogia do solo*. Viçosa: SBCS, 2009. p.539.
38. SENESI, N.; MIANO, T>M.; PROVENANO, M.R.; BRUNETTI, G. Characterization, diferentation, and classification of humic substances spectroscopy. *Soil Science.*, 152:259-271,1991.
39. NOVOTNY, E. H. estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo. Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2004.231p. Tese (Doutorado em Ciências - Físico Química).
40. COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C.I.; NASCIMENTO, O.R.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H.; VIEEIRA, E.M.; SEIDEL, P.R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S.J. Aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR); In: CRESTANA, S. (eds) *Instrumentação agropecuária: contribuições no limiar do novo século*. 1996.
41. CERETTA, C.A.; BAYER. C.; DICK, D.P.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A. Métodos espectroscópicos. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A. O. In: *Fundamentos da*

- matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. Metropole: Porto Alegre, 2008,p.201.
42. MARTIN-NETO, L.; TRAGHETTA, D. G.; VAZ, C.M.P.; CRESTANA, S.; SPOSITO, G. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. *Journal. Of Environmental Quality.*,30:520-525,2001.
 43. MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J.; POPPI, N.R. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil. *Soil Science.* 51:369-376. 1991.
 44. PAUL, A.; STOSSER, R.; ZEHL, A. ZWIRNMANN, E.; VOGT, R. D.; STEINBERG, C.W. Nature and abundance of organic radicals in natural organic matter: effect of pH and irradiation. *Environmental Science Technology.*, 40:5897-5903,2006.
 45. McCARTY, G.W. REEVES III, J.B.;REEVES, V.B.; FOLLETT, R.F.; KIMBLE, J.M. Mid-Infrared and Near-Infrared diffuse reflectance spectroscopy for soil carbon measurement. *Soil Science Society of America Journal.*, 66:640-646, 2002.
 46. GONZÁLEZ-PEREZ, M.; MILORY, D.M.B.P.; COLNAGO, L.A.;MARTIN-NETO, L.; MELO, W.J. Study of organic matter in Brazilian Oxisol under different tillage systems by laser induced fluorescence spectroscopy, *Geoderma*, 138:20-24,2007.
 47. KNICKER, H.; SCHMIDT, M.W.I.; KOGEL-KNABNER, I. Immobilization of peptides in fine particle size separates of soils as revealed by NMR spectroscopy. *Soil Biology Biochemistry.*, 32:241-252,2000.
 48. OLK, D.C.;CASSMAN, K.G.;SCHMIDT-ROHR, K.; ANDERS, M.M.;MAO, J.D.;DEENK,J.L.Chemical stabilization of soil organic nitrogen by phenolic lignin residues in anaerobic agroecosystems. *Soil Biology Biochemistry.*, 38:3303-3312,2006.
 49. MARTIN-NETO, L.;NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J.; POPPI, N.R. EPR of micronutrients-humic substance complexes extracted from Brazilian soil. *Soil Science.* 151:369-376,1991.
 50. SOUSA, S.M.S.C.; FRAGA, V.S.; SALCEDO, I.H. Frações lábeis da matéria orgânica de solos na região semiárida. In: MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. Fertilidade do solo e produção de biomassa no semi-árido. Recife: Universitária UFPE, 2008, p. 105-122.
 51. CUNHA T.J.F.; MACEDO, J.R.; RIBEIRO, L.P.; PALMIERI, F.; FREITAS, P.L.; AGUIAR, A. C. Impacto do manejo convencional sobre propriedades físicas e substâncias húmicas de solos sob cerrado. *Ciência Rural*, 1:27-36, 2001.
 52. CUNHA T.J.F.; BASSOI L. H.; SIMÕES, M L.; MARTIN-NETO, L.; PETRERE V.G.; RIBEIRO P.R.A. Ácidos húmicos em solo fertirrigado no vale do São Francisco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33:1583-1592, 2009.