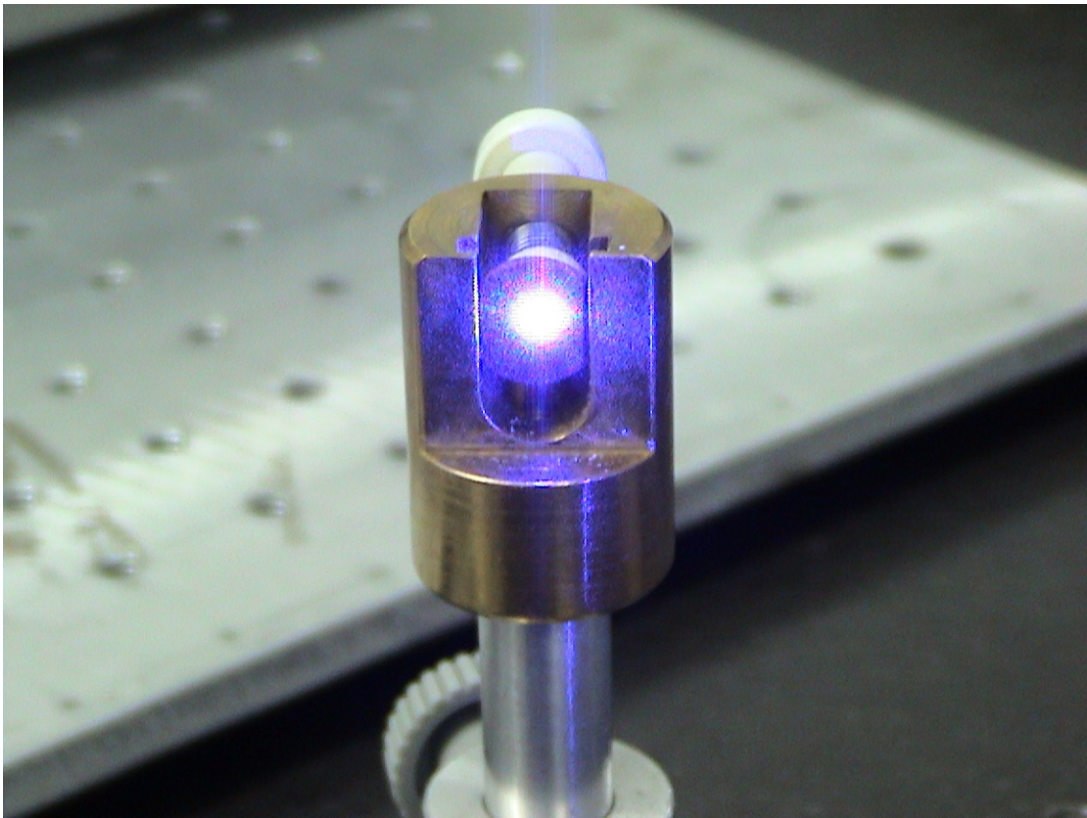


**Índice de Humificação Obtido
Através da Fluorescência
Induzida por Laser**



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Dietrich Garhard Quast

Alexandre Kalil Pires

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Hebert Cavalcante de Lima

Mariza Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Ladislau Martin Neto

Chefe-Geral

Álvaro Macedo da Silva

Chefe-Adjunto de Administração

Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Ricardo Yassushi Inamasu

Gerente da Área de Comunicação e Negócios

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 07

Índice de Humificação Obtido Através da Fluorescência Induzida por Laser

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Ladislau Martin-Neto
Helder Vinicius Avanço Galeti
Martha González Pérez
Cimélio Bayer
João Mielniczuk
Júlio Salton

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropacuária
Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 3374 2477
Fax: (16) 3372 5958
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Secretária-Executiva: Valéria de Fátima Cardoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Rubens Bernardes Filho
Revisor de texto: Valéria de Fátima Cardoso
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Foto(s) capa: Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2004): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

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

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

Milori, Débora Marcondes Bastos Pereira

Índice de Humificação Obtido Através da Fluorescência Induzida Por Laser /
Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, Ladislau Martin-Neto, Helder Vinicius
Avanço Galeti, Martha González-Pérez, Cimélio Bayer, João Mielniczuk, Júlio Salton.
-- São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2004.
17p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento, ISSN1678-0434; n.07).

1. Humificação. 2. Fluorescência induzida por laser. 3. Solo. 4. Ácido húmico.
5. Matéria orgânica. I. Martin-Neto, L. II. Galeti, H.V. A. III. González-Pérez, M. IV.
Bayer, C. V. Mielniczuk, J. VI. Salton, J. VII. Título. Série.

CDD (21. Ed.) 631.41

© Embrapa 2004

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	11
Conclusões	14
Referências Bibliográficas	14

Índice de Humificação Obtido Através da Fluorescência Induzida por Laser

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori¹
Ladislau Martin-Neto²
Helder Vinicius Avanço Galeti³
Martha González Pérez⁴
Cimélio Bayer⁵
João Mielniczuk⁶
Júlio Salton⁷

Resumo

O processo de humificação da matéria orgânica do solo é afetado pelo clima, tipo de solo e sistemas de manejo, resultando na formação de grupos fluorescentes como anéis aromáticos e quinonas, que podem ser avaliados por espectroscopia de fluorescência. Neste estudo, a espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL) foi aplicada a amostras de solos para avaliar o grau de humificação da matéria orgânica. As amostras de solo foram extraídas em diferentes profundidades a partir de três experimentos de campo, provenientes de dois diferentes solos da região do cerrado brasileiro. Adicionalmente, soluções aquosas (20 mg L^{-1}) dos ácidos húmicos (AH) extraídos das mesmas amostras de solo foram analisadas por espectroscopia de fluorescência convencional e três índices do grau de humificação (A_4/A_1 , I_{465}/I_{399} , A_{465}) foram medidos e comparados com o grau de humificação (H_{FIL}), determinado por FIL. Todos três índices de humificação dos AH tiveram uma boa correlação com os valores H_{FIL} determinados por FIL nos dois solos.

PALAVRAS CHAVE: fluorescência induzida por laser, humificação, solo, ácido húmico, matéria orgânica.

¹Física, Dra., Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP, e-mail: debora@cnpdia.embrapa.br

²Físico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP, e-mail: martin@cnpdia.embrapa.br

³Graduado, UFSCar, C.P. 676, 13565-905, São Carlos-SP, Brasil

⁴Graduado, USP, Instituto Química de São Carlos, C.P. 369, 13560-970, São Carlos -SP, Brasil

⁵Eng. Agrônomo, Dr., UFRGS, cimelio.bayer@ufrgs.br

⁶Dr., RGS, Departamento de Ciência do Solo, C.P. 15100, 90001-970, Porto Alegre-RS, Brasil

⁷Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163, km 253,6 -Dourados-MS - Brasil - CEP: 79804-970.

Humification Index Obtained Using Laser Induced Fluorescence

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Ladislau Martin-Neto
Helder Vinicius Avanço Galeti
Martha González-Pérez
Cimélio Bayer
João Mielniczuk
Júlio Salton

Abstract

Humification process of soil organic matter (SOM), affected by climate, soil type and soil management systems, gives rise to fluorescent groups as aromatic rings and quinone, which can be evaluated by fluorescence spectroscopy. In this study we applied laser-induced fluorescence (FIL) spectroscopy to evaluate organic matter humification degree of soil samples collected from different soil depths (0-2.5, 2.5-5, 5-10 and 10-20 cm) of three long-term field experiments in two soils of the Brazilian Cerrado region. In addition, humic acid (HA) solutions (20 mg L^{-1}) extracted from the same soil samples were analyzed by conventional fluorescence spectroscopy and three humification degree indexes (A_4/A_1 , I_{465}/I_{399} , A_{465}) were measured in order to compare them with humification degree (H_{FIL}) determined by FIL. All three humification indexes of soil HA had a close relationship with H_{FIL} values determined by FIL in the two soils.

Introdução

A matéria orgânica (MO) é componente imprescindível para a qualidade dos solos e ambientes tropicais. Ela desempenha um papel mais significativo na produtividade dos solos, pois representa a reserva dominante de nutrientes das plantas (p.e. N, P, S); além disso ela influencia fatores como pH, capacidade de troca iônica, e a estrutura do solo (Zech et al., 1997), contribui para o seqüestro de C da atmosfera (Glatzela et al., 2003, Bayer et al., 2000), tendo efeito também na atividade microbiana (Schnitzer & Khan, 1978, Fassbender, 1980, Lovley et al., 1996, Preston, 1996, Zhang et al., 1997, Salinas-Garcia et al., 1997) e na estabilidade de agregados (Balesdent et al., 2000, Kalbitz et al., 2003).

Adicionalmente, a MO é, geralmente, o principal sítio de sorção para pesticidas e metais pesados no solo (Senesi, 1992, Sposito et al., 1996, Murphy & Zachara, 1995, Martin-Neto et al., 1994, Vaz et al., 1996, 1997). A sua dinâmica é um dos fatores de grande interesse em se estudar dada sua importância tanto do ponto de vista de solos, considerando aspectos relevantes de fertilidade, de estrutura e de processos erosivos, quanto dos aspectos ambientais, com relação as reações e associações com pesticidas, metais pesados e microorganismos, em solos e águas, podendo ainda considerar aspectos globais da Terra, como o efeito estufa. Em regiões de clima temperado existe uma quantidade expressiva de informações sobre a dinâmica da MO em solos. Entretanto, existe um consenso que não há um entendimento completo desse processo.

Pode-se dizer que a MO dos solos é constituída, basicamente, de dois tipos de substâncias : as húmicas (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) e não húmicas (proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos orgânicos de baixo peso molecular, ceras e outros). Estima-se que 65% a 75% da MO de grande parte dos solos minerais sejam substâncias húmicas (SH) (Schnitzer & Khan, 1978). As substâncias húmicas são os componentes mais recalcitrantes da matéria orgânica do solo, e são constituídas de uma mistura heterogênea de grupos funcionais. Estas substâncias são formadas a partir do processo de humificação, o qual altera estruturas químicas da MO pela degradação de resíduos orgânicos via lixiviação, trituração e catabolismo, sendo controlado por variáveis como temperatura, regime de água do solo, pH e nutrientes livres. Dados obtidos através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) mostram que durante o processo de humificação ocorre o aumento grupos C-carbóxicos, C-alkyl e C-aromáticos, principalmente fenólicos, e a diminuição de grupos O-alkyl (Zech et al., 1997).

O grau de humificação pode ser avaliado através de diversas técnicas espectroscópicas, das quais as mais utilizadas são :

- Absorção de luz uv-visível (UV-Vis), que utiliza a razão E_4/E_6 , onde E_4 é a absorvância em 465 nm e E_6 é a absorvância em 655 nm (Stevenson, 1994).

- Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), que avalia o grau de humificação das SH através da quantificação de radicais livres do tipo semiquinonas (Senesi, 1990, Martin-Neto et al., 1994).
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) RMN, que permite a visualização de grupos funcionais que compõem as SH, e correlaciona o grau de humificação com o grau de aromaticidade das SH (Krøsshavn et al., 1992, Zech et al., 1997).
- Fluorescência de luz em amostras aquosas, que se apoia na presença estável de várias estruturas fluorescentes intrínsecas a molécula húmica e a seus precursores. Isso permite a proposição de metodologias (Zsolnay et al., 1999, Kalbitz et al., 1999, Milori et al., 2002a, 2003b) que tornam possível a aplicação desta técnica na avaliação de humificação das SH.

As técnicas acima citadas exigem a extração e fracionamento químico das SH do solo, resultando na geração de resíduos químicos e tornando a análise de solos um processo lento e trabalhoso. Além disso, os produtos deste tratamento (ácido húmico, ácido fúlvico e humina) podem sofrer modificações em relação a sua forma *in situ* (Feller & Beare, 1997). Em contrapartida, a Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (FIL) aplicada a solos é uma nova metodologia, que tem se mostrado eficiente na análise da MO de solos intactos, fornecendo resultados de uma maneira ágil, limpa e em condições próximas das naturais (Milori et al., 2002b, 2003a, 2004).

Este Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento procura mostrar resultados recentes a respeito da avaliação do grau de humificação da matéria orgânica do solo intacto através da técnica de FIL.

Materiais e Métodos

Amostras de solo e áreas experimentais

As amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0-2,5, 2,5-5, 5-10, 10-15 e 15-20 cm em experimentos de longa duração na região do Cerrado brasileiro. Um experimento está localizado em Costa Rica (MS) e vem sendo conduzido há 7 anos na Fazenda Planalto da Empresa SLC Agrícola, em Latossolo Vermelho, com 600 g kg⁻¹ de argila, e 210 g Fe kg⁻¹. Outros dois experimentos estão localizados em Dourados (MS), os quais vem sendo conduzidos há 13 e 5 anos, em Latossolo Vermelho com 500 g kg⁻¹ de argila, e 85,7 g Fe kg⁻¹, sob responsabilidade da Embrapa Agropecuária do Oeste. Ou seja, tratam-se de solos altamente intemperizados, como evidenciado pelos altos teores de Fe-ditionito, e representativos da região tropical brasileira.

Os experimentos consistiram em diferentes sistemas de preparo de solo (preparo convencional-PC, preparo reduzido-PR, e plantio direto-PD), e adicionalmente, em Dourados, no experimento de menor duração, foram utilizados diferentes sistemas de produção (pastagem permanente-PAST, integração lavoura-pecuária-INT, PC e PD). Em ambos locais, como referência da condição original do solo, amostrou-se uma área sob cerrado nativo. Salienta-se que a avaliação dos diferentes sistemas de uso e manejo e profundidades de solo objetivaram uma ampla variação nos teores de carbono orgânico e de qualidade da matéria orgânica do solo (grau de humificação).

Fluorescência Induzida por Laser (FIL)

As amostras de solo foram moídas, peneiradas e prensadas em forma de pastilhas de solo, para simplificar o manuseio no laboratório. Cada pastilha tinha em torno de 1 cm de diâmetro, 2 mm de espessura e 0,5 g de peso.

O aparato experimental utilizado foi descrito anteriormente no boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n° 3 (Milori et al., 2002b).

Para a técnica de FIL, o grau de humificação da MO do solo foi obtido através do cálculo da área sob a curva de emissão dividida pelo teor de carbono (H_{FIL}).

Espectroscopia de fluorescência convencional das amostras de AH em solução

As amostras de solo foram secas ao ar, moídas e peneiradas (<0,105 mm). As substâncias húmicas solúveis foram extraídas com uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ (razão 1:5 solo:extrator; 3 horas com agitador horizontal). Em seguida esta solução foi acidificada com HCl para o pH 2,0 e mantida em repouso por 24 h visando a precipitação do ácido húmico. A solução foi, então, centrifugada (5000 rpm por 30 min.) e o precipitado foi tratado com uma solução HCl/HF 1:1 mantida a agitação por 2 h, processo que foi repetido três vezes visando reduzir o teor de cinzas. O precipitado foi lavado com água destilada até teste negativo de cloreto.

As amostras de ácido húmico foram dissolvidas em uma solução de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹. Para determinar a concentração ideal para este tipo de experimento, foi analisado, previamente, o comportamento da intensidade de fluorescência com excitação em 240 nm como função da concentração. Começando de baixas concentrações (0,5 mg L⁻¹) o crescimento da curva foi quase linear, porém a partir de 20 mg L⁻¹ a intensidade de fluorescência começou a reduzir exponencialmente até praticamente se extinguir em altas concentrações (acima de 1000 mg L⁻¹). Este comportamento é originado por um efeito de filtro interno, causado pela absorção da luz emitida realizada pelo próprio ácido húmico. Baseados nesta observação optou-se trabalhar com a concentração de 20 mg L⁻¹ para minimizar este efeito e reduzir interações entre as moléculas (Mobed et al., 1996). Entre os pHs 7 e 9 não foi observado

variações significativas no espectro, portanto foi adotado para trabalho a faixa de pH em torno de 8.

Os espectros de fluorescência das amostras foram medidos em três modos: emissão, excitação, e varredura síncrona, utilizando-se um espectrômetro de luminescência da Perkin Elmer modelo LS-50B. Em todos os experimentos as fendas de excitação e emissão foram mantidas em 7 nm e a velocidade de varredura utilizada foi 200 nm min⁻¹ para ambos os monocromadores.

Com o intuito de utilizar o método de Zsolnay et al. (1999), os espectros de emissão das amostras de ácido húmico foram obtidos com excitação em 240 nm. A faixa de varredura destes espectros foi de 350 - 650 nm. O espectro de emissão total foi dividido em quatro partes e o grau de humificação foi calculado através da razão entre as áreas do último quarto (570 - 641 nm) e primeiro quarto (356 - 432 nm), denominado A₄/A₁. A idéia básica de Zsolnay e colaboradores é que a humificação da M.O. leva à condensação de anéis aromáticos e este processo faz com que a fluorescência deste grupo se desloque para o vermelho (Haken e Wolf, 1995, Kumke et al., 1995). Portanto, a área do último quarto corresponde a fluorescência de estruturas mais humificadas e a área do primeiro quarto seriam oriundas de estruturas mais simples.

Para utilizar a proposta de Kalbitz et al. (1999), medimos o espectro de varredura síncrona na região entre 300 - 520 nm com $\lambda_{em} - \lambda_{exc} = 55$ nm. De acordo com Kalbitz et al. (1999), o espectro de varredura síncrona das SH apresenta dois picos em torno de 360 and 400 nm, e um ombro em torno de 470 nm. A intensidade destes picos mudam dependendo do grau de humificação da amostra. A região do espectro com comprimentos de onda mais para o vermelho (maior comprimento de onda) é associada a núcleos aromáticos substituídos e/ou conjugados, ou sistemas insaturados conjugados com elétron bastante delocalizado. A região mais para o azul (menor comprimento de onda) é associada a compostos mais simples. Assim, a razão entre a intensidade de fluorescência em 400 e 360 nm, ou 470 e 360 nm pode ser utilizada para medir o grau de humificação das SH dissolvidas.

O método proposto por Milori et al. (2002a, b) consiste em excitar as SH com luz azul e medir a emissão de fluorescência. Esta absorção é mais ressonante com estruturas cuja concentração aumenta com o avanço do processo de humificação da MO. Portanto, nesta proposta a área total sob o espectro de emissão de fluorescência com excitação em 467 nm (em condições experimentais idênticas: concentração = 20 mgL⁻¹, pH = 8 e mesma força iônica), deve ser proporcional ao grau de humificação.

Resultados e Discussão

De acordo com Zech et al. (1997) NMR, medidas realizadas durante a decomposição e humificação de liteira mostraram um aumento do carbono aromático, principalmente de grupos fenólicos. Os grupos fenólicos durante o processo de humificação são oxidados produzindo grupos do tipo quinonas. Estas estruturas são precursores dos radicais livres tipo semiquinonas. Experiências utilizando a espectroscopia de RPE para medir a concentração de radicais livres tipo semiquinonas mostraram uma correlação elevada entre este parâmetro e o grau de humificação (Martin-Neto et al., 1998). Desta maneira, o processo de humificação conduziria ou produziria a um aumento de estruturas fluorescentes.

Zsolnay et al. (1999) observaram um deslocamento para o vermelho do espectro de emissão da Matéria Orgânica Dissolvida (MOD) com excitação no ultravioleta (240 nm) conforme o processo de humificação evoluiu. A explicação para este comportamento foi dada baseada no fato de que conforme o processo de humificação avançava as moléculas fluorescentes tornavam-se mais condensadas (Haken e Wolf, 1995, Kumke et al., 1995). Kalbitz et al. (1999) usou o mesmo princípio para definir um índice de grau de humificação através da espectroscopia de excitação sincronizada. Milori et al. (2002a) observaram que estruturas moleculares, cuja concentração aumenta durante o processo de humificação, são mais ressonantes com a excitação no azul (~465 nm), e sua emissão de fluorescência é proporcional ao grau de humificação.

Estes postulados podem ser aplicados à fluorescência de solo intacto. No caso de fluoróforos orgânicos, a estrutura individual de cada molécula é responsável pela fluorescência. Portanto, quando uma substância passa do estado sólido cristalino para o estado fundido ou vapor, ou é dissolvida, sua fluorescência persiste (Krasovitski e Bolotin, 1988).

Quando uma amostra de solo é excitada com um laser no azul-ultravioleta próximo, o espectro de emissão é uma banda larga sem estruturas significativas. De forma similar ao AH em solução, esta excitação é mais ressonante com estruturas mais complexas. Entretanto, para comparar a intensidade de fluorescência de diferentes amostras de solo intacto é necessário normalizar esse valor pelo conteúdo de carbono do solo. Esta normalização é similar a trabalhar com soluções de mesma concentração, da mesma forma que foi feito para se aplicar o índice A_{465} (Milori et al., 2002a). Assim, variações na intensidade de emissão do espectro normalizado pode ser associada a variações estruturais dos fluoróforos. Como a excitação é na região do azul-ultravioleta próximo, a área sob a emissão de fluorescência normalizada deve ser proporcional ao grau de humificação. Definimos portanto um novo índice de humificação H_{FIL} .

$$H_{FIL} = \frac{AFIL}{C} \quad (1)$$

Onde AFIL é a área sob a curva de emissão de fluorescência e C o conteúdo de carbono orgânico total.

Nas figuras 1, 2 e 3 temos uma comparação entre o grau de humificação avaliado por FIL utilizando solo intacto e por fluorescência convencional utilizando AH em solução e índices de humificação já estabelecidos na literatura. Na figura 1 temos os resultados obtidos utilizando-se o índice de Zsolnay et al (1999) para AH em solução, na figura 2 o índice de Kalbitz et al. (1999) e na figura 3 o índice de Milori et al. (2002a). Em todos os casos a correlação foi alta e significativa mostrando que a metodologia proposta tem um grande potencial de aplicação para análises de solos tropicais. A principal vantagem é uma análise rápida sem a necessidade de fracionamento químico e permitindo estudar a MO do solo o mais próximo possível de suas condições naturais.

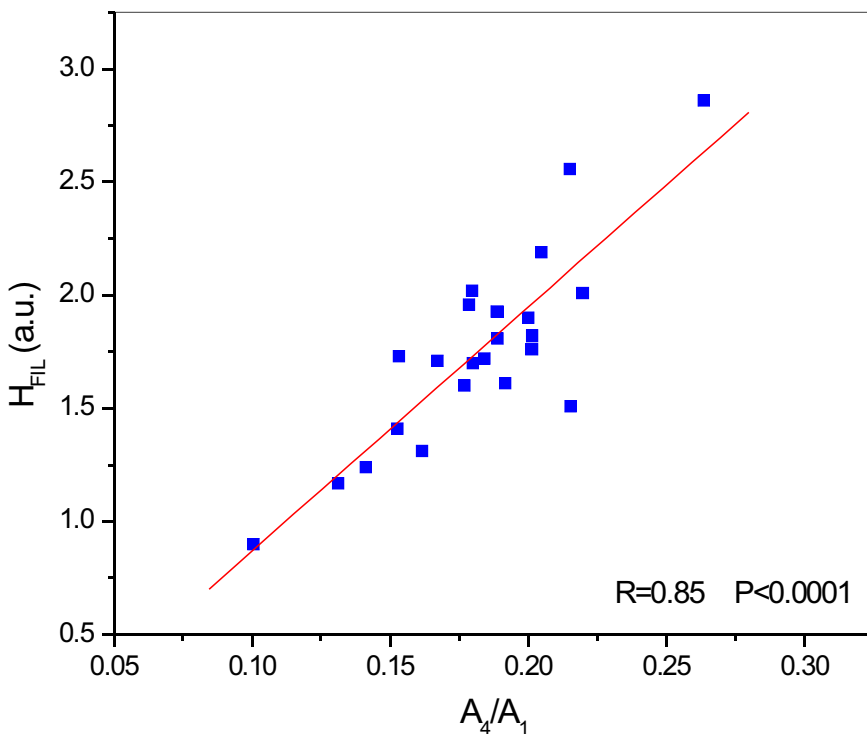


Figure 1 Correlação entre os índices de humificação obtidos por FIL usando solo intacto e Zsolnay et al. (1999) (A_4/A_1) utilizando AH em solução.

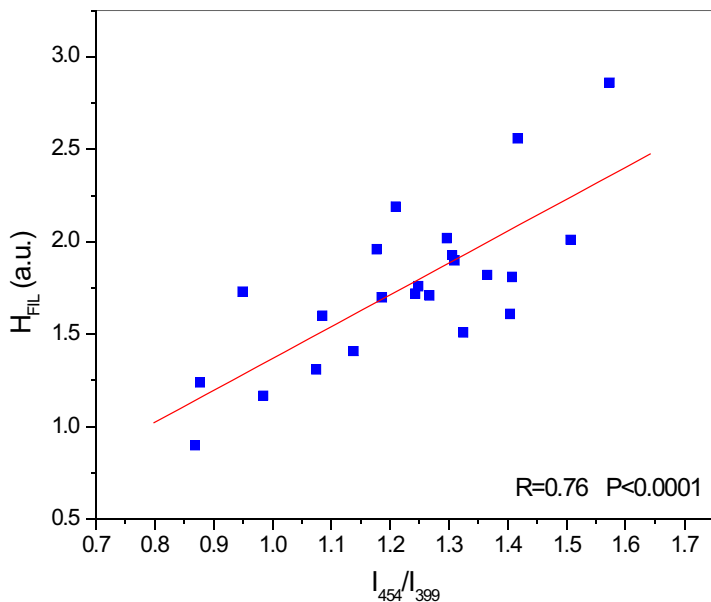


Figure 2 Correlação entre os índices de humificação obtidos por FIL usando solo intacto e Kalbitz et al. (1999) (I_{465}/I_{399}) utilizando AH em solução.

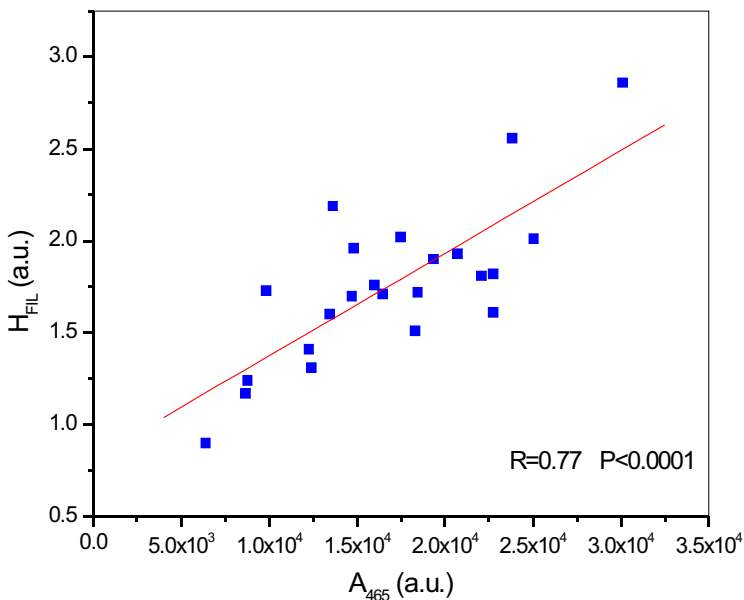


Figure 3 Correlação entre os índices de humificação obtidos por FIL usando solo intacto e Milori et al. (2002) (A_{465}) utilizando AH em solução.

Conclusão

A metodologia proposta pode ser utilizado para avaliar o grau de humificação de matéria orgânica de solos intactos de forma rápida e sem a necessidade de fracionamento químico. Os resultados apontam para um grande potencial desta metodologia para a análise da MO do solo em condições muito próximas das naturais.

Referências Bibliográficas

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

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C. A. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 95-104, 2000.

FASSBENDER, H. W. **Química de suelos**. 2. ed. San José: IICA, 1980. p 66-104.

FELLER, C.; BEARE, M. H. Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, nos. 1-4, p. 69-116, sep. 1997.

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

HAKEN, H.; WOLF, H. C. **Molecular Physics and Elements of Quantum Chemistry**. Springer-Verlag: Heidelberg, 1995.

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

KALBITZ, K.; SCHMERWITZ, J.; SCHWESIG, D.; MATZNER, E. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. **Geoderma**, Amsterdam, v.113, p. 273 291, 2003.

KRASOVITSKII, B. M.; BOLOTIN, B. M. **Organic Luminescent Materials**. [S. l.]: VCH Publishers, 1988.

KRØSSHAVN, M.; SOUTHON, T. E.; STEINNES, E. The influence of vegetational origin and degree of humification of organic soils on their chemical composition, determined by solid-state ¹³C NMR. **Journal of Soil Science**, Oxford, v.43, p. 485-493, 1992.

KUMKE, M. U.; LÖHMANNSTRÖBEN, H. G.; ROCH, T. H. Fluorescence spectroscopy of polyaromatic compounds in environmental monitoring. **Journal of Fluor.**, [S. l.], v. 5, p. 139-153, 1995.

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

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

MARTIN-NETO, L.; ROSELL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. **Geoderma**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 305-311, jan. 1998.

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

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

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C. Nova metodologia utilizando fluorescência induzida por laser para análise de solos inteiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto, SP: UNESP, 2003a. 2 f. CD-ROM.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J. **Determinação do Grau de Humificação de Ácido Húmico de Solo através de Espectroscopia de Fluorescência**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2003b. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Comunicado Técnico, 56).

MILORI, D. M. B. P.; GALETI, H. V. A.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; SALTON, J.; GONZALES-PEREZ, M. Humification degree of organic matter in whole soil determined by laser-induced fluorescence. In: MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; SILVA, W.T.L. da. (Eds.). **Humic Substances and Soil and Water Environment: International Meeting of IHSS**, 12. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2004. p. 609-611.

MOBED, J. J. et al. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 30, n. 10, p. 3061-3065, oct, 1996.

MURPHY, E. M.; ZACHARA, J. M. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. **Geoderma**, Amsterdam, v. 67, p. 103-124, 1995.

PRESTON, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, n. 3, p. 144-166, 1996.

SALINAS-GARCIA, J. R.; HONS, F. M.; MATOCHA, J. E. Long- term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, p. 152- 159,1997.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Soil Organic Matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978.

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

SENESI, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 123, p. 63-76, aug. 1992.

SPOSITO, G.; MARTIN-NETO, L.; YANG, A. Atrazine complexation by soil humic acids. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 25, n. 6, p. 1203-1209, 1996.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: J. Wiley, 1994.

VAZ, C. M. P. et al. Electroanalytical determination of the herbicide atrazine in natural waters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, New York, v. 62, n. 1, p. 65-76, 1996.

VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Adsorption isotherms for atrazine on soils measured by differential pulse polarography. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 9, n.12, p. 956-958, 1997.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, nos. 1-4, p. 117-161, 1997.

ZHANG, H.; HARTGE, K. H.; RINGE, H. Effectiveness of organic matter incorporation in reducing soil compactibility. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, p. 239245, 1997.

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