

SEÇÃO II - QUÍMICA DO SOLO

INTERFERÊNCIA DA FRAÇÃO MINERAL NA ESTIMATIVA DO GRAU DE HUMIFICAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA EM AGREGADOS ORGANOMINERAIS POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA⁽¹⁾

C. BAYER⁽²⁾, L. MARTIN-NETO⁽³⁾, S. C. SAAB⁽⁴⁾ & J. MIELNICZUK⁽⁵⁾

RESUMO

A concentração de radicais livres semiquinona (CRLS), determinada por ressonância paramagnética eletrônica (EPR), é considerada um índice do grau de humificação, sendo uma importante determinação em estudos qualitativos da matéria orgânica do solo. Neste trabalho, avaliou-se a interferência da fração mineral na quantificação da CRLS em agregados organominerais 20-53, 2-20 e < 2 µm de Podzólico Vermelho-Amarelo, Podzólico Vermelho-Escuro e Latossolo Roxo. A CRLS foi determinada pela área do sinal, estimada pela aproximação intensidade do sinal (I, em cm), multiplicada pela sua largura de linha ao quadrado (ΔH^2 , em Gauss). Os parâmetros espectrais I e ΔH foram obtidos em espectros de EPR com e sem interferência da fração mineral. No Podzólico Vermelho-Amarelo e no Podzólico Vermelho-Escuro, foram detectados dois sinais de radicais livres, um com um valor g 2,004 e largura de linha de 5-6 G, típico de radicais livres semiquinona, outro com um valor g 2,000 e largura de linha de 2-3 G, associado à fração mineral, especificamente ao quartzo (SiO₂), como confirmado posteriormente por análise de amostra purificada. Nestes solos, a interferência da fração mineral na obtenção dos parâmetros I e ΔH resultou num erro na estimativa da CRLS de -7 a +488%, comparativamente às quantificações realizadas a partir dos espectros sem interferência da fração mineral. No Latossolo Roxo, os altos teores de Fe³⁺ não permitiram detectar os sinais dos radicais livres semiquinona por causa da sobreposição dos sinais do metal. A eliminação da interferência da fração mineral demonstrou ser um pré-requisito fundamental no estudo da matéria orgânica por EPR em agregados organominerais, para a qual são sugeridos alguns procedimentos alternativos.

Termos de indexação: radical livre semiquinona, ferro, sílica.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em maio de 1999 e aprovado em outubro de 1999.

⁽²⁾ Professor do Departamento de Solos da Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC, Caixa Postal 281, CEP 88520-000 Lages (SC).

⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970 São Carlos (SP). Bolsista do CNPq.

⁽⁴⁾ Professor do Departamento de Física da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorando na USP-Instituto de Química de São Carlos. Bolsista PICD/CAPEs.

⁽⁵⁾ Professor Titular aposentado do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Caixa Postal 776, CEP 90001-970 Porto Alegre (RS). Bolsista do CNPq.

SUMMARY: MINERAL FRACTION INTERFERENCE ON THE DETERMINATION OF THE SOIL ORGANIC MATTER HUMIFICATION DEGREE IN ORGANO-MINERAL AGGREGATES BY ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE

The semiquinone free radical concentration (SFRC), determined by electron paramagnetic resonance (EPR), is an index of degree of humification of soil organic matter. The objective of this study was to evaluate the possible interference of mineral fraction in the quantification of SFRC in organo-mineral aggregates 20-53, 2-20 and < 2 μm of three soils from southern Brazil: Paleudalf, Paleudult and Haplorthox. The SFRC was calculated by the semiquinone signal intensity (I , in cm) multiplied by its square line width (ΔH^2 , in Gauss). The spectral parameters I and ΔH were obtained from EPR spectra with and without interference of mineral fraction. In Paleudalf and Paleudult soils, two signals of free radicals were detected; one had a value of g 2.004 and line width of 5-6 G, typical of semiquinone free radical, and another one had a value of g 2.000 and a line width of 2-3 G, associated to the mineral fraction, specifically quartz (SiO_2), as determined by the analysis of the purified sample. In these soils, interference of mineral fraction in obtaining spectral parameters I and ΔH resulted in an error of the estimative varying from -7 to +488%, comparatively with results obtained from the spectra without mineral fraction interference. In Haplorthox soil, the high concentrations of Fe^{3+} did not allow the detection of the semiquinone free radical signals, due to overlap of the metallic ion signals. The elimination of mineral fraction interference was a fundamental pre-requisit in the study of organic matter by EPR in organo-mineral aggregates. Some alternative procedures for this are presented.

Index terms: soil organic matter, semiquinone free radical, organo-mineral aggregates, silica, iron.

INTRODUÇÃO

Os métodos espectroscópicos fornecem grandes avanços na identificação de estruturas moleculares da matéria orgânica do solo. Internacionalmente, os primeiros estudos em ciência do solo envolvendo ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foram desenvolvidos na década de 60 (Rex, 1960; Steelink & Tollin, 1962; Lagercrantz & Yhland, 1963; Steelink, 1964). No Brasil, o uso desta técnica na avaliação qualitativa da matéria orgânica é recente, sendo os primeiros resultados publicados na década de 90 (Martin-Neto et al., 1991, 1994ab, 1998; Bayer et al., 1997).

A técnica de EPR tem sido utilizada, dentre outros objetivos, para avaliar a concentração de radicais livres semiquinona em ácidos húmicos e fúlvicos, a qual é considerada um índice do grau de humificação (Riffaldi & Schnitzer, 1972; Senesi & Schnitzer, 1977; Martin-Neto et al., 1991, 1998). A estimativa da área do sinal de EPR, a qual é proporcional à concentração de radicais livres, no caso, grupo semiquinonas na matéria orgânica humificada, pode ser realizada pela dupla integração do sinal, ou pela aproximação: intensidade do sinal (I , em cm) multiplicada pelo quadrado da sua largura de linha (ΔH^2 , em Gauss), proposta por Poole Jr. & Farach (1972).

Mais recentemente, em alternativa ao fracionamento químico clássico da matéria orgânica, tem sido utilizado o fracionamento físico, o qual tem demonstrado grande potencial em estudos qualitativos da matéria orgânica do solo associados à caracterização espectroscópica (Oades et al., 1987; Martin-Neto et al., 1994b; Preston, 1996; Bayer, 1996). O principal objetivo da utilização do fracionamento físico tem sido a redução dos riscos de alteração da matéria orgânica que possam ocorrer durante o fracionamento químico (Stevenson et al., 1989).

Martin-Neto et al. (1994b) analisaram por EPR a matéria orgânica em agregados organominerais > 150, 50-150, 20-50, 2-20 e < 2 μm de um Mollisol da Estação Experimental do INTA, em Pergamino, Argentina. As amostras foram coletadas de uma área de vegetação nativa e de duas áreas adjacentes, uma cultivada somente com soja por dez anos e outra com as espécies milho, trigo e soja cultivadas em rotação durante oitenta anos. Os autores observaram a presença de dois sinais de EPR nos espectros dos agregados organominerais na fração 50-150 μm . O primeiro presente em todas as amostras, era típico de radical livre estável, com valor g 2,004 e largura de linha de 6 Gauss. Segundo os autores, estas características permitiram a identificação de radicais

livres semiquinona, normalmente presentes em substâncias húmicas (Riffaldi & Schnitzer, 1972; Senesi & Schnitzer, 1977; Martin-Neto et al., 1994a). O segundo sinal, de pequena intensidade, tipo "ombro" e presente somente nas frações 50-150 μm , segundo os autores, permitiu identificar outro centro paramagnético, conforme evidenciado por experimentos de saturação de potência, não sendo, entretanto, identificada a sua origem. Com esse trabalho, Martin-Neto et al. (1994b) demonstraram, pioneiramente, que com a técnica de EPR é possível monitorar modificações qualitativas na matéria orgânica do solo em amostras sólidas de agregados organominerais, sem que seja necessária a realização do fracionamento químico da matéria orgânica.

Bayer et al. (1997) determinaram a concentração de radicais livres semiquinona por EPR em amostras de ácidos húmicos e de agregados organominerais de um Podzólico Vermelho-Escuro do sul do Brasil. Segundo os autores, os resultados apresentaram a mesma tendência; entretanto, a associação do fracionamento físico e da técnica de EPR mostrou-se aproximadamente três vezes mais sensível em detectar diferenças, comparativamente ao fracionamento químico e EPR. Saab et al. (1997) também obtiveram bons resultados, aplicando a EPR diretamente em amostras de solos orgânicos do Rio de Janeiro. Os espectros obtidos foram semelhantes aos espectros de ácidos húmicos apresentados na literatura.

Em amostras de solo inteiro ou fracionadas fisicamente, a aplicação da técnica de EPR pode apresentar algumas limitações. Um exemplo disto é a interferência do Fe^{3+} na análise por EPR. Por ser o Fe^{3+} um metal paramagnético, o sinal de EPR do metal se sobrepõe aos sinais dos radicais livres semiquinona da matéria orgânica, não permitindo a sua detecção. Metais como Cu^{2+} , V^{4+} e Mn^{2+} , entre outros, também são metais paramagnéticos, entretanto, por ocorrerem normalmente em baixos teores em solos brasileiros, comparativamente ao Fe^{3+} , não devem apresentar grande interferência na análise dos radicais livres semiquinona por EPR.

O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da fração mineral na quantificação da concentração de radicais livres semiquinona em agregados organominerais de três solos do sul do Brasil, com textura e mineralogia distintas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os solos utilizados nesta avaliação foram um Podzólico Vermelho-Amarelo (Paleudalf), um Podzólico Vermelho-Escuro (Paleudult) e um Latossolo Roxo (Haplorthox). A amostragem foi manual, restrita à camada de 0-2,5 cm do solo, e foi realizada em campo, em experimentos no Rio Grande

do Sul. Foram avaliadas três amostras do Podzólico Vermelho-Amarelo, quatro do Podzólico Vermelho-Escuro e três do Latossolo Roxo, sendo todas elas compostas de três subamostras e oriundas de áreas submetidas a diferentes sistemas de uso e manejo. O solo foi peneirado a 2 mm e realizado o fracionamento físico granulométrico da matéria orgânica, adicionando-se 70 mL de água destilada para 20 g de solo em frasco de 100 mL, submetendo a tratamento com ultra-som (marca Sonics & Materials, modelo 300 W) à potência de 240 W, durante seis min. As frações 53-150 μm e > 150 μm foram separadas por peneiramento e as 20-53, 2-20 e < 2 μm por sedimentação em tubos de polietileno, assumindo-se uma densidade de partícula de 2,65 g cm^{-3} .

As frações foram secas em estufa a $\pm 60^\circ\text{C}$ e moídas em gral de porcelana. Em virtude da baixa concentração de matéria orgânica nas frações 53-150 μm e > 150 μm (Bayer, 1996), estas não foram caracterizadas quanto à mineralogia e concentração de radicais livres semiquinona. Nas frações 20-53, 2-20 e < 2 μm , os teores de quartzo foram quantificados, utilizando-se Si metálico, como padrão interno, e os teores de óxido de ferro, por dissolução seletiva (EMBRAPA, 1997).

Os experimentos de EPR foram realizados em triplicatas. Utilizou-se um espectrômetro de EPR Varian E-109 linha Century na Banda X (9 GHz) e frequência de modulação de 100 kHz com cavidade retangular E-231, da Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, Laboratório de Biofísica, em São Carlos (SP). As quantidades de amostras utilizadas foram 20-50 mg, as quais foram analisadas com uma amplitude de modulação pico a pico de 1 Gauss; potência de microondas de 0,2 mW e temperatura ambiente.

Com o objetivo de eliminar a interferência da fração mineral na obtenção dos parâmetros espectrais I e ΔH e, portanto, na quantificação da concentração de radicais livres semiquinona, foram realizados experimentos de EPR em amostras nas quais a matéria orgânica foi oxidada com peróxido de hidrogênio, obtendo-se o espectro somente da fração mineral. Os espectros obtidos nas amostras tratadas com peróxido de hidrogênio foram subtraídos dos espectros de EPR dos agregados organominerais sem tratamento (espectros com interferência), gerando-se, assim, um terceiro grupo de espectros, estes sem interferência da fração mineral (espectros s/interferência).

A área relativa dos sinais de EPR foi obtida dos espectros com e sem interferência da fração mineral, pela aproximação $I \times \Delta H^2$ (Poole Jr. & Farach, 1972), e a concentração absoluta de radicais livres semiquinona foi estimada usando um rubi sintético, como padrão secundário calibrado com Strong Pitch de acordo com o método de Singer's (Martin-Neto et al., 1994b).

A interferência da fração mineral na quantificação dos radicais semiquinona por EPR foi avaliada de forma comparativa pelos resultados obtidos nos espectros com e sem interferência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No quadro 1, são apresentados os teores de argila dos três solos, bem como os teores de quartzo e ferro nas frações 20-53, 2-20 e < 2 μm .

Nos espectros de EPR dos agregados organominerais do Podzólico Vermelho-Amarelo e Podzólico Vermelho-Escuro, foram detectados dois sinais de radicais livres (Figura 1a). Um sinal tem valor g 2,004 e largura da linha de 5 a 6 G (Figura 1c e Quadro 2), típico de radicais livres semiquinona, como detectado em substâncias húmicas (Senesi, 1990; Martin-Neto et al., 1991) e em agregados organominerais (Martin-Neto et al., 1994b). O segundo sinal tem valor g 2,000 e largura de linha de 2 a 3 G (Figura 1b). Martin-Neto et al. (1994b) observaram um sinal semelhante em agregados organominerais de um Mollisol da Argentina, entretanto, o sinal apresentou menor intensidade e apenas esteve presente na fração de 50-150 μm , não sendo identificada a origem.

Pelas suas características espectroscópicas, como valor g 2,000 e saturação em baixa potência de microonda, em torno de 2 mW, conforme determinado em experimento variando a potência de 0,05 a 200 mW (dados não apresentados), este sinal pode ser associado a um radical livre estável com pouca interação com o meio onde está localizado. Estudos realizados por Bersohn & Baird (1966) demonstraram que amostras de quartzo (SiO_2) submetidas à radiação ultravioleta ou solar podem apresentar sinal semelhante.

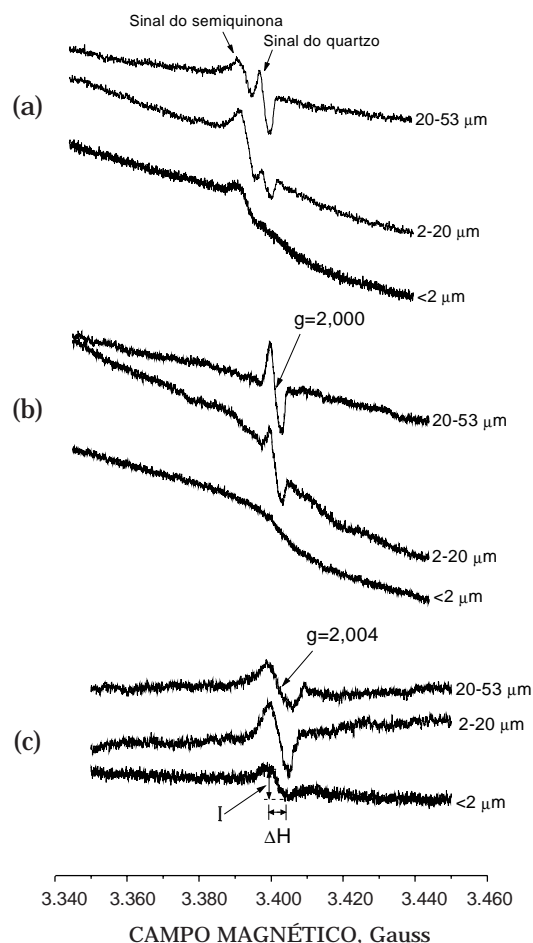


Figura 1. Espectros de EPR dos agregados organominerais do Podzólico Vermelho-Escuro: (a) espectros das amostras sem tratamento; (b) espectros das amostras tratadas com peróxido de hidrogênio; (c) espectro resultante da subtração dos espectros de (a) e de (b). I é a intensidade do sinal e ΔH é a sua largura de linha.

Quadro 1. Classificação e teores de argila dos solos avaliados, e teores de quartzo e óxidos de ferro nas frações 20-53, 2-20 e < 2 μm

Solo		Teor de argila ⁽¹⁾	Fração	Quartzo	Fe
Classificação brasileira	Classificação americana				
		%	μm	g kg^{-1}	
PV	Paleudalf	8	20-53	**	3,90
			2-20	**	13,73
			< 2	**	45,40
PE	Paleudult	31	20-53	920	9,20
			2-20	650	21,53
			< 2	130	56,52
LRd	Haplorthox	62	20-53	600	69,3
			2-20	270	106,13
			< 2	20	142,48

⁽¹⁾ Brasil (1973). ** Não determinado.

Comparando as porcentagens de quartzo nos agregados organominerais (Quadro 1) e a intensidade do sinal em g 2,000 (Figura 1b), observa-se que o comportamento de ambos é semelhante, com exceção da fração $< 2 \mu\text{m}$, na qual não foi detectado o sinal em g 2,000, a qual, entretanto, apresenta em torno de 13% de quartzo. A origem sugerida de o sinal em g 2,000 ser referente ao quartzo foi confirmada por análise por EPR de amostra purificada de quartzo (Figura 2). A não-observância do sinal do quartzo na fração $< 2 \mu\text{m}$ pode ser devida à maior concentração de Fe^{3+} nesta fração (Quadro 1), cujo sinal sobrepõe ao sinal do quartzo, como pode ser visto nos espectros do Latossolo Roxo (Figura 3).

A obtenção dos parâmetros espectrais I e ΔH^2 a partir dos espectros com interferência da fração mineral resultou num erro na estimativa da concentração dos radicais livres semiquinona de

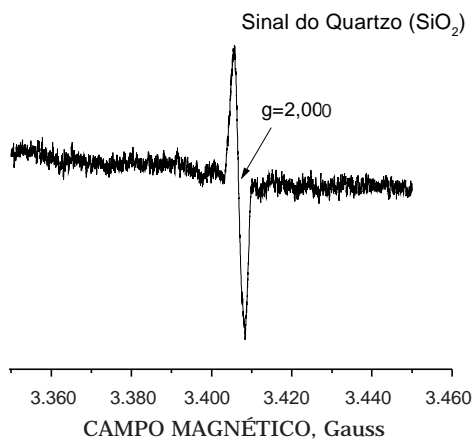


Figura 2. Espectro de EPR de uma amostra pura de quartzo (SiO_2) extraído do Podzólico Vermelho-Escuro.

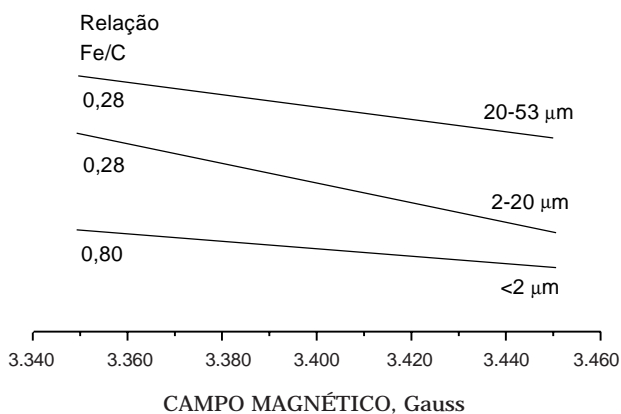


Figura 3. Espectros de EPR dos agregados organominerais do Latossolo Roxo.

-7 a +488%, em comparação com os resultados obtidos a partir dos espectros sem interferência da fração mineral (Quadro 2). Os resultados revelam que tanto a concentração de Fe^{3+} como a presença do sinal do quartzo interferem na obtenção dos parâmetros espectrais.

A oxidação da matéria orgânica com peróxido de hidrogênio e a posterior subtração de espectros foram alternativas para eliminar ou reduzir a interferência da fração mineral na análise por EPR em solos com baixos e médios teores de óxidos de ferro. O uso de uma potência de microonda maior, em torno de 2 mW, na qual o sinal do quartzo está saturado, é outra alternativa para reduzir a sua interferência na quantificação da concentração de radicais livres semiquinona por EPR. Entretanto, aumentando a potência de microondas, aumenta a intensidade do sinal associado ao Fe^{3+} e, conseqüentemente, a sua interferência na análise por EPR, limitando tal procedimento a solos com baixos teores desse elemento. Outra alternativa é simular espectros de EPR da fração mineral por Gaussianas e Lorentzianas, a fim de subtraí-los dos espectros originais; entretanto, pela complexidade do processo, talvez este seja um procedimento menos adequado que os anteriores.

No Latossolo Roxo, não foi possível detectar os sinais de radicais livres semiquinona por causa dos altos teores de óxido de ferro (Quadro 1). Neste solo, os sinais de EPR do Fe^{3+} são intensos e sobrepuseram-se aos sinais dos radicais livres semiquinona da matéria orgânica e do quartzo (Figura 3).

Nas amostras do Podzólico Vermelho-Amarelo e do Podzólico Vermelho-Escuro, a relação Fe/C variou de 0,05 a 0,87 (Quadro 2), sendo possível quantificar a concentração de semiquinonas em todas elas. Entretanto, no Latossolo Roxo, a relação Fe/C variou de 0,28 a 0,80, não sendo possível a detecção do sinal de EPR dos radicais semiquinona em nenhuma das três frações (Figura 3). Estes resultados permitem afirmar que, na análise por EPR, o que determina o grau de interferência do Fe^{3+} são os teores do metal, e não a relação Fe/C , como acontece na Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C (Baldock et al., 1992). A razão para esta diferença é que por EPR o Fe^{3+} é detectado diretamente, enquanto por RMN de ^{13}C o sinal detectado é do núcleo de ^{13}C e a interferência do ferro ocorre na redução do tempo de relaxação do sinal, impedindo sua detecção. Portanto, se há íons de Fe^{3+} ou outros metais paramagnéticos na amostra, mas estão diluídos pela elevada quantidade de material orgânico (carbono), eventualmente é possível realizar o experimento de RMN.

A utilização de técnicas para remoção do Fe^{3+} , como ditionito, HF, HF + HCl, separação magnética e separação por densidade após o tratamento com ditionito ou ácido (Oades et al., 1987; Arshad et al., 1988; Baldock et al., 1992; Preston & Newman, 1992;

Quadro 2. Relação Fe/C (%/%), largura do sinal (ΔH , Gauss) e quantificação da concentração de radicais livres semiquinona por grama de C em agregados organominerais 20-53, 2-20 e < 2 μm em Podzólico Vermelho-Amarelo e Podzólico Vermelho-Escuro por ressonância paramagnética eletrônica a partir de espectros com interferência e sem interferência da fração mineral

Solo/amostra	Fração μm	Relação Fe/C	Com interferência		Sem interferência		Δ do sinal ⁽¹⁾
			Spins/g C (x 10 ¹⁷)	ΔH	Spins/g C (x 10 ¹⁷)	ΔH	
Podzólico Vermelho-Amarelo							
Amostra 1	20-53	0,21	3,52 (\pm 0,18)	3,08	5,13 (\pm 0,27)	4,70	-31
	2-20	0,13	10,65 (\pm 0,30)	4,59	8,07 (\pm 0,25)	5,33	+32
	< 2	0,26	14,80 (\pm 1,33)	6,50	5,44 (\pm 0,61)	5,59	+172
Amostra 2	20-53	0,14	3,31 (\pm 0,13)	3,29	5,76 (\pm 0,20)	4,98	-42
	2-20	0,08	9,22 (\pm 0,48)	5,36	5,75 (\pm 0,13)	5,43	+60
	< 2	0,22	9,80 (\pm 0,32)	6,83	3,86 (\pm 0,28)	6,16	+153
Amostra 3	20-53	0,16	2,50 (\pm 0,19)	3,25	3,66 (\pm 0,50)	4,27	+32
	2-20	0,08	5,59 (\pm 0,84)	5,15	6,15 (\pm 0,30)	6,62	-9
	< 2	0,17	16,37 (\pm 1,86)	7,33	4,30 (\pm 0,38)	6,41	+281
Podzólico Vermelho-Escuro							
Amostra 1	20-53	0,05	5,17 (\pm 0,61) ⁽²⁾	4,98	2,12 (\pm 0,07)	5,95	+144
	2-20	0,07	6,61 (\pm 0,61)	5,71	1,75 (\pm 0,14)	5,62	+278
	< 2	0,23	11,09 (\pm 0,35)	6,68	2,43 (\pm 0,23)	6,18	+356
Amostra 2	20-53	0,08	6,76 (\pm 0,53)	4,54	4,34 (\pm 0,16)	5,37	+56
	2-20	0,10	8,03 (\pm 0,35)	5,33	4,78 (\pm 0,31)	5,78	+68
	< 2	0,26	13,3 (\pm 0,90)	6,02	2,26 (\pm 0,18)	5,01	+488
Amostra 3	20-53	0,13	3,17 (\pm 0,21)	4,21	3,39 (\pm 0,32)	5,22	-7
	2-20	0,12	5,37 (\pm 0,16)	5,33	4,40 (\pm 0,15)	5,84	+22
	< 2	0,31	6,79 (\pm 0,86)	5,83	3,47 (\pm 0,48)	6,47	+96
Amostra 4	20-53	0,76	6,83 (\pm 0,18)	2,73	6,72 (\pm 0,17)	5,47	+17
	2-20	0,87	11,11 (\pm 0,30)	4,63	7,39 (\pm 0,62)	6,34	+50
	< 2	0,84	14,03 (\pm 1,33)	4,70	3,60 (\pm 0,07)	6,19	+290

⁽¹⁾ Δ do sinal = [(Spins s/interferência - Spins c/interferência)/Spins s/interferência] x 100. ⁽²⁾ Valores entre parênteses correspondem ao desvio-padrão da média.

Preston et al., 1994; Skjemstad et al., 1994) deve ser estudada, buscando ampliar as possibilidades de utilização das técnicas espectroscópicas, de EPR e RMN, em estudos da dinâmica e reatividade da matéria orgânica, especialmente em solos tropicais e subtropicais.

CONCLUSÕES

1. Espectros de EPR de agregados organominerais apresentam dois sinais, sendo um proveniente dos radicais livres semiquinona da matéria orgânica e o outro do quartzo.

2. A fração mineral interfere na quantificação de radicais livres semiquinona por EPR.

3. A técnica de subtração de espectros de amostras tratadas com peróxido de hidrogênio é indicada para a eliminação da interferência da fração mineral.

4. Em solos com altos teores de Fe³⁺, como o Latossolo Roxo, não é possível detectar sinais de EPR da matéria orgânica em agregados organominerais. Nestas situações, sugerem-se tratamentos adicionais para remoção do Fe³⁺.

LITERATURA CITADA

- ARSHAD, M.; RIPMEESTER, J.A. & SCHNITZER, M. Attempts to improve solid state ¹³C NMR spectra of whole mineral soils. *Can. J. Soil Sci.*, 68:593-602, 1988.
- BALDOCK, J.A.; OADES, J.M.; WATERS, A.G.; PENG, X.; VASSALO, A.M. & WILSON, M.A. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry*, 16:1-42, 1992.
- BAYER, C. Dinâmica da matéria orgânica em sistemas conservacionistas de manejo de solos. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996. 241p. (Tese de Doutorado)

- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J. & CERETTA, C.A. Fracionamento da matéria orgânica e sua avaliação qualitativa por EPR num solo submetido dez anos a diferentes sistemas de cultura em plantio direto. In: SIMPOSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, 1., São Carlos, 1996. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Instrumentação. São Carlos, 1997. p.115-121.
- BERSOHN, M. & BAIRD, J.C. An Introduction to electron paramagnetic resonance. New York, W.A. Benjamin, 1966. 272p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Serviço Nacional de Pesquisa Agropecuária. Divisão de Pesquisa Pedológica. Levantamento de Reconhecimento dos Solos do estado do Rio Grande do Sul. Recife, 1973. 431 p. (Boletim Técnico, 30)
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 212p.
- LAGERCRANTZ, C. & YHLAND, M. Photo-induced free radical reactions in the solutions of some tars and humic acids. *Acta. Chem. Scand.*, 17:1299-1306, 1963.
- MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J. & POPPI, N.R. EPR of micronutrients-humic substance complexes extracted from a brazilian soil. *Soil Sci.*, 151:369-376, 1991.
- MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, M.E. & SPOSITO, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopy study. *Environ. Sci. Tech.*, 28:1867-1873, 1994a.
- MARTIN-NETO, L.; ANDRIULLO, A.E. & TRAGHETA, D.G. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol. *Soil Sci.*, 157:365-372, 1994b.
- MARTIN-NETO, L.; ROSSEL, R. & SPOSITO, G. Correlation of spectroscopy indicators of humication with mean annual rainfall along a grassland climosequence. *Geoderma*, 81:305-311, 1998.
- OADES, J.M.; VASSALO, A.M.; WATERS, A.G. & WILSON, M.A. Characterization of organic matter in particle size and density fractions from a red-brown earth by solid-state ^{13}C N. M. R. *Aust. J. Soil Res.*, 25:71-82, 1987.
- POOLE Jr., C.P. & FARACH, H.A. The theory of magnetic resonance. Somerset, John Wiley & Sons, 1972. 430p.
- PRESTON, C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects. *Soil Sci.*, 161:144-166, 1996.
- PRESTON, C.M. & NEWMAN, R.H. Demonstration of spatial heterogeneity in the organic matter of de-ashed humin samples by solid-state ^{13}C CP/MAS NMR. *Can. J. Soil Sci.*, 72:13-19, 1992.
- PRESTON, C.M.; NEWMAN, R.H. & ROTHER, P. Using ^{13}C CP/MAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. *Soil Sci.*, 157:26-35, 1994.
- REX, R.W. Electron paramagnetic resonance studies of stable free radicals in lignins and humic acids. *Nature*, 188:1185-1186, 1960.
- RIFFALDI, R. & SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36:301-305, 1972.
- SAAB, S.C.; CONCEIÇÃO, M. & MARTIN-NETO, L. Espectroscopia de EPR em solo de várzea. In: SIMPOSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, 1., São Carlos, 1996. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Instrumentação. São Carlos, 1997. p.450-454.
- SENESI, N. & SCHNITZER, M. Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acid. *Soil Sci.*, 123:224-234, 1977.
- 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. *Anal. Chim. Acta*, 232:51-75, 1990.
- SKJEMSTAD, J.O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J.A. & OADES, J.M. The removal of magnetic materials from surface soils. A solid state ^{13}C CP/MAS NMR study. *Aust. J. Soil Res.*, 32:1215-1229, 1994.
- STEELINK, C. Free radical studies of lignin, lignin degradation products and soil humic acids. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 28:1615-1622, 1964.
- STEELINK, C. & TOLLIN, G. Stable free radicals in soil humic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 59:25-34, 1962.
- STEVENSON, F.J.; ELLIOT, E.T.; COLE, C.V.; INGRAM, J.; OADES, J.M.; PRESTON, C.; SOLLINS, P.J. Methodologies for assessing the quantity and quality of soil organic matter. In: COLEMAN, D.C., OADES, J.M. & UEHARA, G., eds. Honolulu, University of Hawaii-NifTAL Project, 1989. p.173-199.