VANESSA MENDES SILVA

DIGESTÃO DE AMOSTRAS DE ORIGEM ORGÂNICA E RESPIRAÇÃO MICROBIANA: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Fabrícia Queiroz Mendes

Coorientadores: André M. Xavier de Carvalho
Marlon Corrêa Pereira

RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba

T
S586d
2020

Silva, Vanessa Mendes, 1994-
Digestão de amostras de origem orgânica e respiração microbiana: validação de métodos alternativos / Vanessa Mendes Silva. – Rio Paranaíba, MG, 2020.
41f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Fabrícia Queiroz Mendes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Métodos de análise. 2. Análise foliar. 3. Armadilha de CO2. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de Ciências Agrárias. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal).
II. Título.

631

VANESSA MENDES SILVA

DIGESTÃO DE AMOSTRAS DE ORIGEM ORGÂNICA E RESPIRAÇÃO MICROBIANA: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de agosto de 2020.

Assentimento:

Vanessa Mendes Silva
Autora

Fabrícia Queiroz Mendes
Orientadora

A Deus e toda minha família,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela saúde e por guiar meus passos durante esses dois anos de mestrado.

À toda minha família, meu pai Valter, minha mãe Lucia, meus irmãos Lucas e Wilian por entenderem minha ausência em alguns momentos, pelo incentivo e apoio incondicionais. Ao meu namorado Fábio, por todo amor e carinho e por estar ao meu lado em todos os momentos. À tia Ilda e toda família pelo acolhimento e apoio em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba, seu corpo docente, direção, administração, técnicos de laboratório, à Secretaria de Pós-graduação por toda a atenção e ajuda em vários momentos do mestrado.

Á professora Fabrícia Queiroz Mendes pela orientação, pela paciência, apoio, confiança, conhecimento transmitido e pelas horas de ajuda no laboratório.

Aos professores Marlon Corrêa Pereira e André Mundstock Xavier de Carvalho pela coorientação, pelas horas de reuniões e no laboratório, por todo apoio, confiança e conhecimento transmitido.

À Anita por aceitar participar da banca e contribuir com o trabalho.

Ao Conselho Acadêmico e Administrativo (COAD), à comissão coordenadora do mestrado onde tive a oportunidade de ser representante discente e aprender muito com todos.

A todos os membros do Laboratório de Ecologia Microbiana (LabEM) por toda ajuda e pelos momentos de descontração, aos membros do Laboratório de Análise Químicas de Solos e Alimentos (LASA) e do grupo de pesquisa de Ciência e Tecnologia de Alimentos / CRP - UFV, em especial ao Davi e Fernando por toda a ajuda e paciência no decorrer dos experimentos.

Aos meus amigos, em especial à Layane, Keise, Ellen, Maria, Jaciara e Thyago pela amizade e apoio durante o mestrado. Á todos, por sempre estarem presentes em minha vida, muitos, mesmo a distância, agradeço pelo apoio em todas as escolhas, por sempre estarem comigo nos momentos bons e difíceis da vida, sei que sempre posso contar com vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão das bolsas de estudo e pelo apoio financeiro.

A todos, que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa, que torceram por mim e contribuíram de alguma forma para que fosse possível a conclusão de mais essa etapa, o meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Vanessa Mendes Silva, filha de Valter Mendes da Silva e Lucia Maria da Silva, nasceu em Rio Paranaíba-MG no dia 08 de julho de 1994. Em 2012 iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba. Nesta, foi bolsista de iniciação científica na área de Microbiologia. Foi membro dos grupos de pesquisa LabEM – Laboratório de Ecologia Microbiana e GPMIP – Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas. Em agosto de 2017 graduou-se Engenheira Agrônoma nesta instituição. Em agosto de 2018 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), na mesma instituição, sob orientação da Professora Fabrícia Queiroz Mendes e coorientação dos professores André Mundstock Xavier de Carvalho e Marlon Corrêa Pereira. Submeteu-se à defesa da dissertação em 28 de agosto de 2020.

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

RESUMO GERAL

SILVA, Vanessa Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, agosto de 2020. **Digestão de amostras de origem orgânica e respiração microbiana: validação de métodos alternativos.** Orientadora: Fabrícia Queiroz Mendes. Coorientadores: André Mundstock Xavier de Carvalho e Marlon Corrêa Pereira.

O desenvolvimento de métodos de análises laboratoriais menos trabalhosos, baratos ou que apresentem o mínimo risco para o operador são necessários. O presente trabalho buscou validar métodos alternativos para a preparação e extração de elementos de amostras vegetais e para a determinação da respiração microbiana em laboratório. Dessa forma, dois experimentos foram conduzidos em laboratório. No primeiro, buscou-se uma alternativa à digestão nitroperclórica, que leva o ácido perclórico, um ácido forte, que quando utilizado ocorre a formação de gases tóxicos e pode levar a corrosão de equipamentos e ainda apresenta risco de explosões. Dessa forma, foram comparados dois métodos de digestão de amostras, a nitroperclórica ($HNO_3/HClO_4$, na proporção de 3:1, aquecidos à 200 ºC) e a digestão nitroperoxídica (HNO_3 aquecido à 120º C, seguido da adição de H_2O_2, aquecendo à 200ºC), utilizando 20 amostras vegetais, com variações nos teores de P, K e Ca. Após a digestão das amostras pelos dois métodos, foram realizadas as análises de P, K e Ca. As correlações de Pearson entre as repetições analíticas de cada método, para os três elementos analisados foram superiores a 0,9, indicando uma boa repetitividade entre as duplicatas das amostras vegetais dentro de cada método. Também foram observados que as correlações de Pearson para a comparação entre os dois métodos foram superiores a 0,9. Portanto, a digestão nitroperoxídica pode ser utilizada em substituição a digestão nitroperclórica. No segundo experimento, buscou-se validar um método alternativo para a determinação da respiração microbiana em laboratório, uma vez que o método tradicionalmente utilizado com a titulação da solução armadilha de NaOH é trabalhosa. Primeiramente, foi realizado um pré-teste para determinar a quantidade de cal sodada (hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio) que levaria a uma máxima absorção de CO_2 em um frasco com 500 cm^3. Depois de definir que 2 g de cal sodada eram suficientes, foi realizado um estudo comparativo com quatro diferentes tipos de solo, acrescidos de amido e esterco, com a finalidade de se obter diferentes níveis de respiração microbiana. Neste estudo foi comparado o comportamento da cal sodada e do NaOH como armadilha. Observou-se que a variabilidade entre as repetições analíticas do método utilizando solução de NaOH e cal sodada foram baixas (R > 0,700) em praticamente todos os tempos avaliados. Para o método utilizando solução de NaOH, no período de 8 dias a

correlação foi relativamente baixa (R < 0.700). Já para o método com cal sodada foi observado uma correlação baixa (R < 0.700) na avaliação realizada aos 14 dias. As correlações entre as réplicas analíticas para as estimativas da taxa respiratória acumulada foram de 0.910 e 0.954 para os métodos com NaOH e cal sodada, respectivamente, indicando uma boa repetitividade dos métodos de captura de CO_2. Os métodos de avaliação das taxas de respiração microbiana do solo comparados apresentaram excelente correlação entre si (R Pearson: 0,96). Dessa forma, a cal sodada apresenta comportamento semelhante à solução de NaOH e pode ser usada como alternativa para sua substituição.

Palavras-chave: Métodos de análise. Análise foliar. Armadilha de CO_2.

ABSTRACT

SILVA, Vanessa Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba, August, 2020. **Digestion of samples from organic origin and microbial respiration: validation of alternative methods.** Advidor: Fabrícia Queiroz Mendes. Co-advisors: André Mundstock Xavier de Carvalho and Marlon Corrêa Pereira.

The development of less labor-intensive, inexpensive or low-risk laboratory analysis methods is necessary. The present work sought to validate alternative methods for the preparation and extraction of elements from plant samples and for the determination of microbial respiration, in the laboratory. Therefore, two experiments were conducted in the laboratory. In the first, an alternative to nitroperchloric digestion was sought, which takes perchloric acid, a strong acid, which when used occurs the formation of toxic gases and can lead to corrosion of equipment and still represents a risk of explosions. In this way, two methods of sample digestion were compared, the nitroperchloric (HNO_3 / $HClO_4$, in the proportion of 3:1, heated to 200 ºC) and the nitroperoxidic digestion (HNO_3 heated to 120 ºC, followed by the addition of H_2O_2, heating to the 200 ºC), using 20 plant samples, with variations in the levels of P, K and Ca. After the digestion of the samples by the two methods were performed the analysis of P, K and Ca. Pearson's correlations between the analytical repetitions of each method, for the three elements analyzed were greater than 0,9, indicating a good repeatability among the duplicates of the plant samples within each method. It was also observed that Pearson's correlations for the comparison between the two methods were greater than 0,9. Therefore, nitroperoxide digestion can be used to replace nitroperchloric digestion. In the second experiment, we sought to validate an alternative method for the determination of microbial respiration in the laboratory, once the method traditionally used with the titration of the NaOH trap solution is laborious. Firstly, a pre-test was performed to determine the amount of soda lime (calcium hydroxide and sodium hydroxide) that would lead to maximum CO_2 absorption in a 500 cm^3 bottle. After defining that 2 g of soda lime were sufficient, a comparative study was carried out with four different types of soil, plus starch and manure, in order to obtain different levels of microbial respiration. In this study was compared the behavoir of soda lime and NaOH as a trap. It was observed that the variability between the analytical repetitions of the method using NaOH solution and soda lime was low ($R > 0.700$) in practically all the evaluated times. For the method using NaOH solution, in the period of 8 days the correlation was relatively low ($R < 0.700$). However for the soda lime method, a low correlation ($R < 0.700$) was observed in the evaluation performed at 14 days. The correlations between the analytical replicates for the

estimates of the accumulated respiratory rate were 0.910 and 0.954 for the methods with NaOH and soda lime, respectively, indicating a good repeatability of the CO_2 capture methods. The methods for evaluating the soil microbial respiration rates compared showed excellent correlation (R Pearson: 0.96). Therefore, soda lime behaves similarly to the NaOH solution and can be used as an alternative for its replacement.

Keywords: Analysis methods. Leaf analysis. CO2 trap.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 14
Capítulo 1 - Digestão nitroperoxídica: uma opção à digestão nitroperclórica 15
1. INTRODUÇÃO 15
2. MATERIAIS E MÉTODOS 17
3. RESULTADOS 20
3.1 Correlação entre as repetições analíticas de cada método 20
3.2 Correlação entre os métodos de abertura de amostra 20
4. DISCUSSÃO 22
5. CONCLUSÃO 24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 25
Capítulo 2 - Adaptação do método de determinação da respiração microbiana do solo com cal sodada 27
1. RESUMO 27
2. INTRODUÇÃO 28
3. MATERIAIS E MÉTODOS 30
3.1 Caracterização Geral 30
3.2 Pré-teste 30
3.3 Estudo comparativo entre respiração microbiana com armadilha de NaOH e com cal sodada 32
3.4 Análises estatísticas 34
4. RESULTADOS 34
4.1 Pré-teste 34
4.2 Variabilidade de cada método 35
4.3 Correlação entre os métodos 36
5. DISCUSSÃO 37
6. CONCLUSÃO 38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38
CONCLUSÕES GERAIS 41

INTRODUÇÃO GERAL

As análises laboratoriais muitas das vezes compreendem metodologias que demandam longos períodos para análises, reagentes com alto custo, alta periculosidade ao operador ou ao meio ambiente e potencial de desgaste nos equipamentos utilizados nas análises. Dessa forma, é necessário o estudo de metodologias igualmente eficientes e que possam minimizar esses problemas.

Nos métodos de análises de plantas é importante determinar a quantidade dos elementos essenciais e dos elementos considerados tóxicos no material vegetal. A determinação desses elementos indicará as condições das plantas e os tratos culturais que precisarão ser adotados em seguida. Dessa forma, são comuns as digestões úmidas abertas ou fechadas para a extração desses elementos do tecido vegetal para posterior quantificação dos mesmos. Nessas digestões é comum a utilização de combinações de ácidos e agentes oxidantes, como o ácido perclórico ($HClO_4$), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros (VACCARO et al., 2004; NEMATI et al., 2010).

A digestão nitroperclórica é amplamente utilizada na extração de elementos químicos para sua posterior determinação. No entanto, a combinação de ácido nítrico e ácido perclórico apresenta muitos riscos, como riscos de explosão e emissão de gases tóxicos, riscos de corrosão de equipamentos, além da dificuldade para aquisição deste ácido, cuja compra é controlada pelo Exército, Polícia Federal e Civil com diversas restrições para armazenamento (ZARCINAS et al., 1983; NOGUEIRA & SOUZA, 2005; CHANG, 2006).

Portanto, apesar da digestão nitroperclórica ser amplamente utilizada e apresentar bons resultados de extração de elementos em amostras vegetais, ela apresenta muitos riscos para o operador e desgastes de equipamentos, o que pode ser evitado através da utilização de outros ácidos e, consequentemente, de outras digestões.

Na microbiologia, o estudo da atividade dos microrganismos do solo é importante para um melhor conhecimento dos aspectos da ciclagem e armazenamento de nutrientes, estabilidade do solo, decomposição da matéria orgânica e fertilidade do solo. Algumas dessas características são muito utilizadas como indicadores da qualidade do solo com destaque à respiração, ao carbono orgânico e à biomassa microbiana do solo (MENDONÇA et al., 2017; NOVAK et al., 2017).

A respiração é um dos parâmetros mais importantes para se determinar a atividade microbiana no solo. Ela é realizada por fungos, bactérias, protozoários e algas que são capazes de oxidar a matéria orgânica, geralmente utilizando o O_2 como aceptor final de elétrons.

Existem várias metodologias para se determinar a respiração microbiana, como espectroscopia de infravermelho (IRGA), eletrorespirômetro, cromatografia gasosa, condutividade elétrica ou titulação quando for utilizadas as bases KOH e NaOH como armadilha de CO_2, além da utilização de cal sodada (hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio) como armadilha (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; DIONÍSIO et al., 2016). Todas as metodologias são amplamente utilizadas, porém, grande parte necessita de equipamentos que são relativamente caros. Contrastando com essas metodologias, os métodos que utilizam cal sodada ou soluções como armadilhas de CO_2 são baratos, práticos e tem aplicabilidade no campo, com a inserção de câmaras no solo ou sob temperatura e umidade controladas no laboratório (UMNOUYSIN et al., 2017; YILMAZ & BILGILI, 2018).

Em laboratório a principal metodologia utilizada consiste na captura do CO_2 produzido através de solução de NaOH com posterior titulação com HCl. Contudo, essa metodologia apresenta algumas dificuldades, como a prévia preparação e padronização de soluções. Após a incubação da solução juntamente com o solo há a necessidade da montagem de materiais para a titulação da solução de NaOH, o que demanda muito tempo (SILVA et al., 2007).

A metodologia utilizando cal sodada como armadilha para o CO_2 produzido é simples, pois há apenas a necessidade de secagem e pesagem da cal sodada antes e após a incubação da mesma. Tal método resulta em uma considerável economia de tempo do operador (KEITH & WONG, 2006; YILMAZ & BILGILI, 2018).

Portanto, o objetivo do presente estudo é apresentar e validar metodologias de análises que visem a redução do tempo gasto nas análises, redução de custos e redução da complexidade operacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANG R. **Química Geral - Conceitos Essenciais**. 4ª ed. São Paulo: Mcgraw Hill, 2006. 778 p. ISBN: 9788563308047.

DIONÍSIO, J.A., et al. **Guia Prático de Biologia do Solo**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016. 152 p. ISBN: 978-85-69146-00-1.

KEITH, H.; WONG, S.C. Measurement of soil CO_2 efflux using soda lima absorption: both quantitative and reliable. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 1121-1131, 2006.

MENDONÇA, E.S.; MATOS, E.S. **Matéria Orgânica do Solo**, 2ª Ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2017. 221 p. ISBN: 9788569193029.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª Ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p. ISBN: 85-87692-33-x.

NEMATI, K; BAKAR, N.K.A; ABAS, M.R.B; SOBHANZADEH, E.; LOW, K.H. Comparative study of open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, p. 453-459, 2010.

NOGUEIRA, A.R.A; SOUZA, G.B. **Manual de Laboratórios: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos.** Ed. Embrapa, São Carlos; 2005.

NOVAK, E.; CARVALHO, L.A.; SANTIAGO, E.F.; PORTILHO, I.I.R. Chemical and Microbiological Attributes Under Different Soil Cover. **Cerne**, v. 23, n. 1, p. 19-30, 2017.

SILVA, E.E.; AZEVEDO, P.H.S.; POLLI, H. **Determinação da Respiração Basal (RBS) e Quociente Metabólico do solo (qCO_2).** Seropédica: Embrapa, 2007. ISSN: 1517-8862.

UMNOUYSIN, S.; SANGTIEAN, T.; SATO, T.; POUNGPARN, S. Comparative carbon dioxide efflux rates from respiration of coarse woody debris among three mangrove species in Thailand. **TROPICS**, v. 26, n. 2, p. 49-57, 2017.

VACCARO, S.; BRUN, E.J.; SCHUMACHER, M.V; KÖNIG, F.G.; KLEINPAUL, I.S.; CECONI, D.E. Comparação Entre Três Diferentes Métodos de Análise de Tecido Vegetal. **Bol. Pesq. Fl.**, n. 48, p. 15-28, 2004.

YILMAZ, G.; BILGILI, A. V. Modeling seasonal variations of long-term soil CO2 emissions in an orchard plantation in a semiarid area, SE Turkey. **Environ Monit Assess**, v. 190, p. 486, 2018.

ZARCINAS, B.A.; CARTWRIGHT, B.; SPOUNCER, L.R. Analysis of soil and plant material by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Soil Sci. Plant Anal,** v. 18, n.1, p.131-146, 1987.

Capítulo 1 - Digestão nitroperoxídica: uma opção à digestão nitroperclórica

RESUMO

A determinação de nutrientes dos tecidos vegetais é importante para se verificar o estado nutricional das plantas e para o balanço nutricional. A digestão nitroperclórica é a técnica de abertura de amostras de origem orgânica mais utilizada nos laboratórios de rotina no Brasil. A velocidade e capacidade de induzir a oxidação da mistura nitroperclórica contrastam com maiores riscos de explosão e corrosão de equipamentos, produção de gases tóxicos, altos custos e restrições de comercialização e armazenamento em relação à outros métodos de digestão úmida. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi validar a digestão úmida nitroperoxídica (HNO_3 aquecido à 120 ºC, seguido da adição de H_2O_2 e aquecimento à 200 ºC) como alternativa de rotina à digestão nitroperclórica (mistura 3:1 de HNO_3 e $HClO_4$, aquecidos até 200 ºC). Os dois métodos foram comparados utilizando-se 20 amostras vegetais em duplicata. Foram determinados os teores dos elementos P, K e Ca por envolverem os três principais instrumentos de determinação dos laboratórios de rotina (espectrofotômetro comum, espectrofotômetro de emissão em chama e espectrofotômetro de absorção atômica). As correlações de Pearson entre as repetições analíticas foram superiores a 0,900 para ambos os métodos testados e para todos os elementos analisados, indicando uma boa repetitividade dos métodos. As correlações de Pearson entre os teores determinados a partir dos métodos comparados foram também superiores a 0,900. Portanto, a digestão nitroperoxídica pode ser utilizada em substituição a digestão nitroperclórica de acordo com o protocolo apresentado.

Palavras-chave: ácido perclórico, ácido nítrico, análise foliar, digestão úmida.

1. INTRODUÇÃO

Plantas bem nutridas apresentam uma melhor resposta fisiológica a fatores ambientais. Por esse motivo, o conhecimento das concentrações dos nutrientes nas plantas se torna importante para avaliar se estes se encontram em quantidades adequadas no tecido vegetal, de forma a impedir distúrbios fisiológicos (Hansen et al., 2009).

A concentração de nutrientes para o desenvolvimento da planta e de elementos considerados tóxicos são comumente analisados. A determinação desses nutrientes extraídos do tecido vegetal pode ser realizada de várias formas, mas, primeiramente, deve-se realizar a extração dos mesmos dos tecidos da planta e em seguida proceder à determinação dos elementos químicos de interesse. (Vaccaro et al., 2004).

Este processo de extração de elementos consiste em uma prévia preparação das amostras, denominada digestão. Este procedimento pode ser feito em sistemas abertos ou fechados e utilizando a combinação de diversos ácidos e agentes oxidantes, como o ácido perclórico ($HClO_4$), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros (Nemati et al., 2010).

A digestão feita em sistemas abertos possui a vantagem de ter rápida evaporação dos ácidos, o que reduz possíveis problemas após a digestão, além da possibilidade de se fazer a análise de um maior número de amostras (Sastre et al., 2002). No entanto, a maioria dos métodos de digestão aberta são considerados demorados, além de haver a possibilidade de contaminação entre as amostras e perda de elementos químicos devido à volatilização (Melo et al., 2008).

Dentre os diferentes tipos de digestão úmida, as mais utilizadas são aquelas apenas com ácido sulfúrico ou com misturas de ácidos, como a digestão nitroperclórica ($HNO_3/HClO_4$), a mistura de ácido clorídrico e ácido nítrico, mistura dos ácidos sulfúrico e perclórico, mistura dos ácidos nítrico, sulfúrico e perclórico, mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico, mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio e a mistura dos ácidos nítrico e sulfúrico (Zheljazkov & Warman, 2002; Shaibur et al., 2010).

A mistura de ácidos na digestão nitroperclórica apresenta a vantagem da decomposição quase completa dos compostos orgânicos (Nogueira & Souza, 2005). No entanto, o ácido perclórico é considerado o ácido mais forte na escala de força ácida (Chang, 2006). Por essa razão, e ainda por ser usado a quente, esse ácido apresenta riscos, como riscos de explosão e emissão de gases tóxicos, o que apresenta riscos para o operador, além da corrosão de equipamentos como capelas de exaustão, chapas aquecedoras e blocos digestores, reduzindo a vida útil destes equipamentos. Outros fatores que dificultam a utilização do $HClO_4$ são o maior custo e as restrições de comercialização deste ácido, cuja venda é controlada (Zarcinas et al., 1987; Nogueira & Souza, 2005; Benabdellah et al. 2010).

Existem várias metodologias de digestão úmida que podem ser utilizadas para decomposição e solubilização de amostras vegetais, como a digestão sulfúrica e nitroclorídrica, porém, essas metodologias são realizadas a temperaturas muito elevadas, são mais lentas e há a possibilidade de ocorrer contaminação nas amostras.

O ácido nítrico normalmente é utilizado como agente oxidante em digestões úmidas, podendo ser usado separadamente ou em mistura com o peróxido de hidrogênio e outros ácidos. A utilização do ácido nítrico é viável devido a sua boa capacidade de oxidar amostras e ser de fácil acesso (Sastre et al., 2002). Embora a digestão nitroperoxídica seja relativamente

bem conhecida, há poucos estudos que validaram esta técnica para amostras vegetais, em comparação as digestões comumente utilizadas. Além disso, este método de digestão não é listado entre os procedimentos recomendados em algumas redes de certificação de laboratórios de rotina.

Portanto, faz-se necessário o estudo de métodos de digestão que sejam eficientes na preparação de amostras previamente a determinação de nutrientes e que sejam equivalentes ao método tradicionalmente utilizado, levando em conta a diferença da matriz orgânica, ou seja, se utilizando diferentes tipos de amostras e ainda testando diferentes nutrientes.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi validar um protocolo ajustado de digestão úmida nitroperoxídica de amostras vegetais visando evidenciar alternativas à digestão nitroperclórica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a comparação entre a digestão nitroperclórica e a digestão nitroperoxídica, utilizaram-se 20 amostras vegetais, sendo elas: folhas de café, milho, feijão, soja, cana-de-açúcar, *Brachiaria* sp., cenoura, erva mate, mandioca, banana, sorgo, espinafre, algodão e citros, grãos de café, milho, feijão e soja, raízes de cenoura e farinha de mandioca. A escolha das amostras foi realizada após busca em literatura para que as amostras apresentassem variação em relação aos teores dos elementos que serão analisados, de forma a ter pontos com altas e baixas concentrações.

Após a obtenção dos materiais vegetais, estes foram secos em estufa com circulação forçada de ar à 70 ºC durante 72 horas. Após a secagem do material, as amostras contendo folhas foram trituradas em moinho de facas tipo Willey e as amostras contendo grãos foram trituradas no moinho de bolas. Todas as amostras foram tamisadas em peneira com 0,85 mm de abertura. Em seguida, foram pesados 0,4 g de cada material e transferidos para erlenmeyers onde foram realizados os diferentes tipos de digestão. As análises foram realizadas sempre em duplicatas.

A digestão nitroperclórica foi realizada segundo procedimento descrito em Silva (2009). Em erlenmeyers, adicionou-se as amostras e 10 mL da mistura nitroperclórica (3:1, ou seja, 750 mL de ácido nítrico e 250 mL de ácido perclórico) previamente preparada. Foram preparados ainda os brancos, em erlenmeyers sem amostra vegetal, onde se adicionou 5 mL da mistura digestora.

Depois de preparados, os frascos foram cobertos com filme PVC e permaneceram em pré-digestão à frio, em repouso por 12 horas, facilitando o processo de digestão.

Posteriormente, os recipientes foram transferidos para a chapa aquecedora à 200 ºC (sem marcha de aquecimento) em capela de exaustão. Observou-se o extrato até verificar o clareamento do extrato e aparente encerramento da evaporação do ácido nítrico. Após o resfriamento dos extratos, as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e seus volumes foram completados com água ultrapura. Os extratos foram então transferidos para frascos com fechamento hermético, identificados e armazenados á temperatura de 5º C até o momento de sua análise.

A digestão nitroperoxídica foi realizada segundo protocolo adaptado de Rodushkin et al. (1999). Em capela de exaustão, com o auxílio de um dispenser, adicionou-se 10 mL de ácido nítrico às amostras secas, trituradas e pesadas. Os erlenmeyers com as amostras e o ácido foram cobertos com filme PVC e deixados em repouso por 12 horas para pré-digestão. Posteriormente, o material foi levado para chapa aquecedora à temperatura de 120 ºC por 45 minutos.

Em seguida, os erlenmeyers foram então retirados da chapa e ainda dentro da capela, adicionou-se a cada um deles 1 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), agitando suavemente os frascos. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, os erlenmeyers foram levados à chapa aquecedora novamente, porém agora em uma temperatura de 200 ºC por aproximadamente uma hora. Após este período, apenas nas amostras em que não se observou o clareamento dos extratos, adicionou-se mais 1 mL de H_2O_2 aos recipientes e aumentou-se a temperatura da chapa para 210 ºC. Feito isso, os frascos foram mantidos na chapa até se observar uma coloração clara nas amostras, quando ocorreu digestão completa das mesmas.

Após a digestão, os erlenmeyers foram retirados da chapa, e a cada um foi adicionado lentamente 10 mL de água ultrapura. Após o resfriamento completo dos extratos, o conteúdo de cada frasco foi transferido para balões volumétricos de 50 mL e o volume foi completado com água ultrapura. Em seguida, o extrato foi transferido para frascos com fechamento hermético, identificados e armazenados no escuro à 5 ºC. Para cada bateria de erlenmeyers foram preparados dois brancos, estes passaram por todos os procedimentos descritos anteriormente, porém, não receberam 0,400 gramas de amostra.

Ao final das duas digestões foram feitas a determinação dos nutrientes P, K e Ca. As determinações foram realizadas em espectrofotômetro comum, espectrofotômetro de emissão em chama e em espectrofotômetro de absorção atômica, respectivamente, de acordo com Silva (2009).

Todas as análises foram realizadas em duas repetições analíticas, em todas as etapas. Em uma primeira bateria de análises, foram realizadas as digestões da primeira réplica analítica de cada método para cada material analisado, em seguida, foi realizada uma segunda bateria de digestões com a segunda réplica.

Para cada elemento determinado, os dados foram submetidos à análise de correlação de Pearson entre os métodos e entre as repetições analíticas de cada método. Após o ajuste dos modelos, calculou-se o desvio padrão das regressões e os resíduos foram submetidos ao teste de normalidade de Jarque-Bera (Jarque & Bera, 1980). As análises estatísticas foram realizadas pelo software Speed Stat.

3. RESULTADOS

3.1 Correlação entre as repetições analíticas de cada método

A repetibilidade de cada método foi avaliada pela correlação entre os valores obtidos nas duas repetições analíticas. As correlações de Pearson entre as repetições analíticas, para os dois métodos estudados e para todos os elementos analisados, foram superiores a 0,900, com valores variando entre 0,917 para os teores de Ca em amostras digeridas por digestão nitroperoxídica e 0,991 para os teores de K em amostras digeridas por digestão nitroperoxídica (Figura 1). As variações encontradas entre as repetições analíticas representam variações inerentes ao próprio método de análise.

3.2 Correlação entre os métodos de abertura de amostra

A Figura 2 apresenta a correlação entre os dois métodos de abertura de amostra estudados. Observou-se uma boa equivalência entre os métodos de digestão para os três elementos analisados, uma vez que se obtiveram valores altos de correlação. Para os teores de cálcio, observou-se que o método de digestão nitroperoxídica se aproxima do método de digestão nitroperclórica em 84,4 % das vezes. A correlação de Pearson entre os teores de Ca foi de 0,919, isso indica uma boa equivalência dos métodos de abertura de amostra, uma vez que o valor de correlação encontrado está muito próximo aos valores de correlação de Pearson encontrados para as réplicas analíticas entre os métodos (Figura 1).

A correlação entre os teores de K obtidos entre os métodos foi de 0,990, indicando uma boa equivalência entre os métodos de digestão. Tanto as correlações entre os métodos (Figura 2) como as correlações entre as repetições analíticas (Figura 1) para potássio apresentaram as melhores correlações, demonstrando que o método de determinação de potássio, entre os três métodos estudados, é o que apresenta melhor repetibilidade entre amostras.

Levando em conta os dois métodos de digestão para a análise das taxas de fósforo (Figura 2), observa-se que os métodos se aproximam em 96,7% das vezes. Para os teores de P, a correlação foi de 0,983, indicando uma boa repetitividade do método de extração de nutrientes por digestão nitroperoxídica em relação à digestão nitroperclórica.

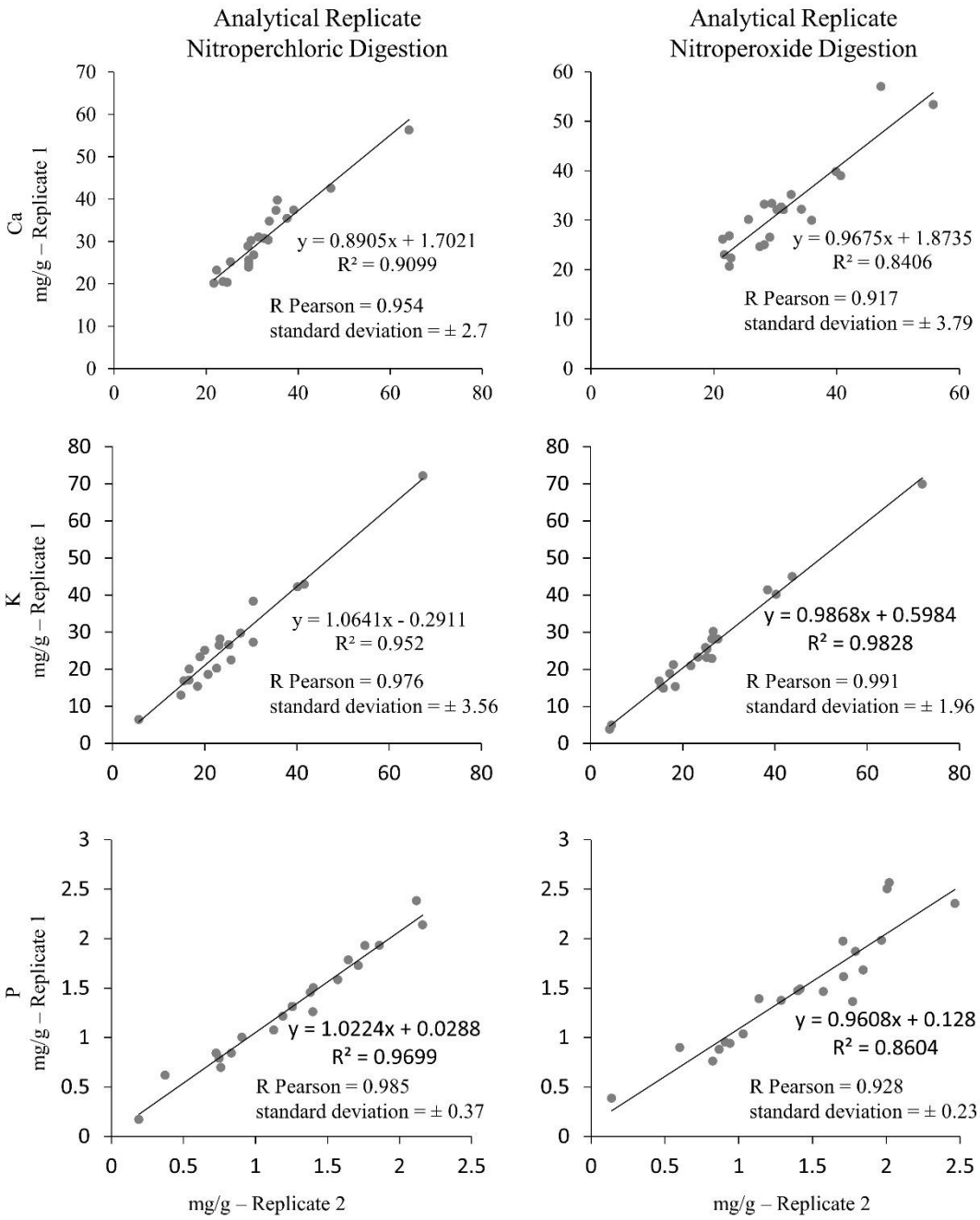

Figura 1. Correlação dos teores obtidos entre as repetições analíticas para os elementos Ca, K e P de amostras vegetais digeridas por digestão nitroperclórica e digestão nitroperoxídica.

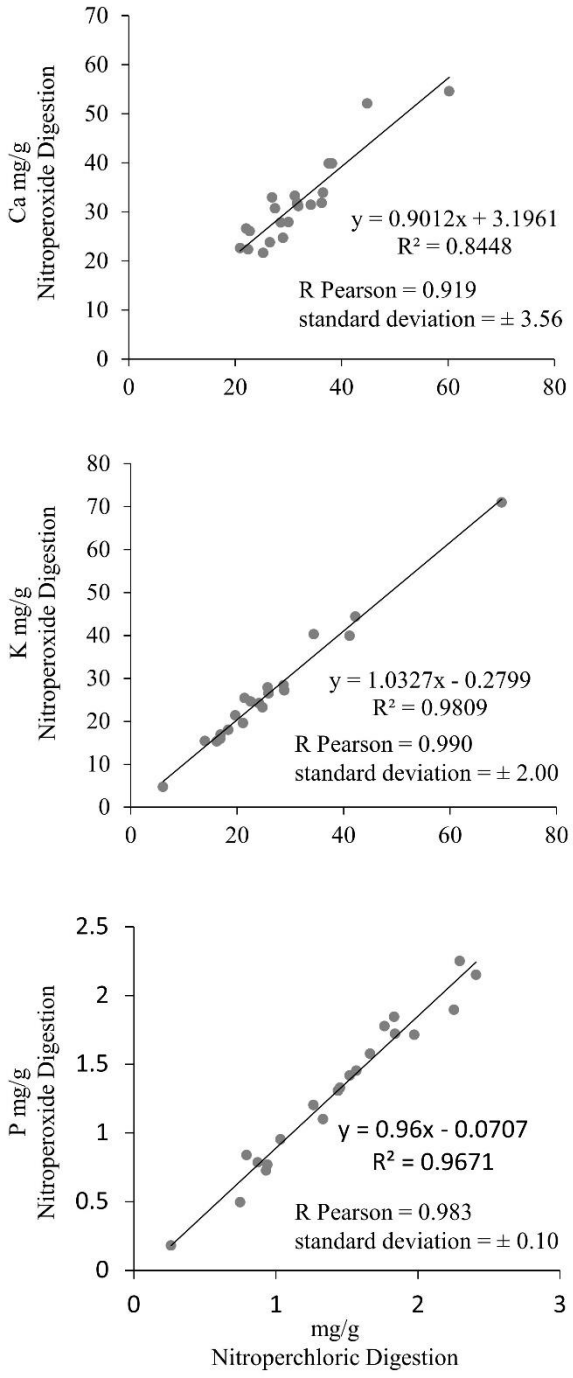

Figura 2. Correlação dos teores entre os métodos de abertura de amostra (digestão nitroperclórica x digestão nitroperoxídica) para os elementos Ca, K e P em amostras vegetais.

4. DISCUSSÃO

Comparando-se os métodos de abertura de amostra e observando as equações encontradas para a relação entre a digestão nitroperclórica e nitroperóxidica, observa-se que o valor encontrado para os coeficientes de inclinação da reta estão todos próximos a um,

evidenciando a equivalência entre os métodos. Somado a isto, observa-se os coeficientes de correlação de Pearson semelhantes encontrados entre os métodos de abertura de amostra (Figura 2) e entre as repetições analíticas para cada método (Figura 1). Desta forma, o método de abertura de amostra por digestão nitroperóxidica pode ser utilizado em substituição ao método de digestão nitroperclórica sem utilização de equações para correção.

O ácido nítrico e ácido perclórico são comumente utilizados na digestão de amostras vegetais, o ácido perclórico utilizado em digestões juntamente com HNO_3 ou H_2SO_4 atua evitando a formação de espumas que são formadas quando esses ácidos são utilizados separadamente. Já o ácido nítrico fornece grande parte de oxigênio para a oxidação do material vegetal, para que isso ocorra e também para evitar a perda de elementos por evaporação, as digestões com a presença de HNO_3 devem ser realizadas a temperaturas mais baixas (Shaibur, et al. 2010). Esse fator é uma vantagem, se comparado com digestões que utilizam ácidos concentrados, como por exemplo, a digestão sulfúrica e nitroclorídrica que são realizadas a temperaturas elevadas, são lentas e apresentam risco de volatilização dos elementos.

A utilização de ácido nítrico na abertura de amostras vegetais tem se mostrado eficiente, quando aplicado de forma isolada ou em combinação com outros ácidos. Uddin, et al. (2016), observou que a mistura de ácido nítrico e ácido clorídrico na proporção de 1:3 foi eficiente na recuperação de As, Cd, Pb, Ni, Zn e Fe em amostras de fitoterápicos. Shaibur, et al. (2010) analisaram a concentração de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu em mudas de cevada e observaram que não houve diferença nos níveis destes nutrientes quando as amostras foram digeridas apenas com ácido nítrico ou com a mistura de ácido nítrico e ácido perclórico, resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo, na qual a variação entre as análises de Ca, P e K entre os métodos estudados se assemelham às variações encontradas entre as repetições analíticas de cada método.

Esses resultados indicam que o ácido nítrico é um reagente oxidante eficiente na mineralização de matrizes complexas, porém, em alguns casos, se utilizado de forma isolada, ele pode não ser suficiente na digestão do material vegetal, por esse motivo, algumas vezes são adicionados outros reagentes oxidantes, como o ácido perclórico, o peróxido de hidrogênio e o ácido sulfúrico (Adamczyk-szabela et al., 2017).

O ácido perclórico ainda é amplamente utilizado em métodos de digestão de amostras vegetais, porém, este ácido apresenta algumas desvantagens, como o risco de explosão, riscos para o operador, corrosão de equipamentos utilizados nos procedimentos de extração, entre outras. Em contrapartida o peróxido de hidrogênio é considerado um dos agentes oxidantes

mais eficientes existentes (Mattos, et al., 2003), é barato e, de acordo com os resultados apresentados, juntamente com o ácido nítrico, possui a mesma capacidade de oxidação da matriz orgânica, podendo ser utilizado em substituição a digestões que utilizam o ácido perclórico.

Ao utilizar o desvio padrão encontrado para cada regressão calculada na correlação entre as repetições analíticas de cada método de abertura de amostra e para três métodos de detecção utilizados (Figura 1), observa-se uma variação percentual maior entre as repetições analíticas para concentrações mais baixas do que para concentrações mais altas (Tabela 1).

Tabela 1. Percentagem de erro, utilizando o desvio padrão encontrado, para os valores mais altos e mais baixos (médios) de cada elemento analisado em cada método de digestão

Método de digestão		Ca	K	P
Nitroperclórica	Menor concentração	12,90 %	58,70 %	83,55 %
	Maior concentração	4,49 %	5,11 %	16,44 %
Nitroperoxídica	Menor concentração	17,55 %	48,88 %	87,75 %
	Maior concentração	7,28 %	2,76 %	10,03 %

Os protocolos de rotina de análise geralmente sugerem refazer o procedimento quando as concentrações encontradas estão em valores que extrapolam o último ponto da curva padrão. Acima deste ponto pode ocorrer interação entre as moléculas, afetando a distribuição de carga e alterando o coeficiente de absortividade molar, alterando a relação entre absortividade e concentração, que deixa de ser linear (Gomes and Oliveira, 2011). Mas pelos valores observados de percentagem de erro, também não se deve realizar análises espectrofotométricas em concentrações muito baixas, pois, devido ao erro analítico inerente aos métodos, poderá ocorrer uma variação relativamente alta. No presente estudo, esta variação chega a 80 % para valores muito baixos de concentração de fósforo, mesmo no método de digestão nitroperclórica (Tabela 1).

5. CONCLUSÃO

Os métodos testados e as repetições analíticas de para os dois métodos nas analises de P, K e Ca apresentam uma boa correlação e repetitividade. Portanto, a digestão nitroperoxídica pode ser usada em substituição à digestão nitroperclórica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamczyk-Szabela D, Anielak P, Wolf MW. Influence of Digestion Procedure and Residual Carbon on Manganese, Copper, and Zinc Determination in Herbal Matrices by Atomic Absorption Spectrometry. J Anal Methods Chem. 2017; 2017:1-10. https://doi.org/10.1155/2017/6947376

Benabdellaha, M; Khaledb, KF, Hammouti, B. Kinetic investigation of C38 steel corrosion in concentrated perchloric acid solutions. Mater Chem Phys. 2010; 61-64. https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2009.10.021.

Chang R. Química Geral - Conceitos Essenciais. 4. ed. São Paulo: Mcgraw Hill; 2006.

Gomes JC, Oliveira GF. Análises físico-químicas de alimentos. Viçosa: Editora UFV; 2011.

Hansen TH, Laursen KH, Persson DP. Pedas P, Husted S, Schjoerring K. Micro-scaled high-throughput digestion of plant tissue samples for multi-elemental analysis. Plant Methods. 2009; 5:12. 10.1186/1746-4811-5-12

Mattos IL, Shiraishi KA, Braz AD, Fernandes J R. Peróxido de Hidrogênio: importância e determinação. Quim. Nova. 2003; 26:373-380. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300015

Melo LCA, Silva CA. Influence of digestion method and sample mass on the recovery of nutrients in organic residues. Quim. Nova. 2008; 31:556-561. https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300018

Nemati K, Bakar NKA, Abas MRB, Sobhanzadeh E. Low KH. Comparative study of open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. J Hazard Mater. 2010; 182:453-459. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.053

Nogueira ARA, Souza GB. Manual de Laboratórios: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. Ed. Embrapa, São Carlos; 2005.

Rodushkin, I; Ruth, T; Huhtasaari, A. Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques. Analytica Chimica Acta, 1999, 378:191-200.

Sastre J, Sahuquillo A, Vidal M, Rauret G. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: Microwave assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. Anal. Chim. Acta. 2002; 462:59-72. 10.1016/S0003-2670(02)00307-0

Shaibur MR, Shamim AHM, Huq SMI, Kawai S. Comparison of digesting capacity of nitric acid and nitric acid-perchloric acid mixture and the effect of lanthanum chloride on potassium measurement. Nat Sci. 2010; 8:157–162.

Uddin ABMH, Khalid RS, Alaama M, Abdualkader AM, Kasmuri A, Abbas AS. Comparative study of three digestion methods for elemental analysis in traditional medicine products using atomic absorption spectrometry. Journal of Analytical Science and Technology. 2016; 7:6. 10.1186/s40543-016-0085-6

Vaccaro S, Brun EJ, Schumacher MV, König FG, Kleinpaul IS, Ceconi DE. Comparação Entre Três Diferentes Métodos de Análise de Tecido Vegetal. Bol. Pesq. Fl. 2004; 15-28.

Zarcinas BA, Cartwright B, Spouncer LR. Analysis of soil and plant material by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. Soil Sci. Plant Anal. 1987; 18:131-146. https://doi.org/10.1080/00103628709367806

Zheljazkov VD, Warman PR. Comparison of Three Digestion Methods For the Recovery of 17 Plant Essential Nutrients And Trace Elements from Six Composts. Compost Sci Util. 2002; 10:197–203. https://doi.org/10.1080/1065657X.2002.10702081

Capítulo 2 - Adaptação do método de determinação da respiração microbiana do solo com cal sodada

1. RESUMO

A avaliação da respiração microbiana é importante por ser um dos atributos microbiológicos utilizados como indicadores de qualidade do solo. Para sua determinação podem ser utilizados métodos de cromatografia gasosa, eletrorespirômetro, espectroscopia de infravermelho (IRGA), condutividade elétrica ou titulação, tendo as bases KOH, NaOH e cal sodada (hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio) como armadilha de CO_2. Muitas dessas metodologias são consideradas de alto custo, devido ao alto custo dos equipamentos, ou requerem muito tempo para execução da metodologia. Dessa forma, é necessário o estudo e validação de metodologias precisas, acessíveis e mais rápidas. Uma alternativa é a utilização da cal sodada como armadilha, este método gravimétrico para determinação do CO_2 é uma estratégia muito utilizada no campo. Dessa forma, o objetivo do estudo foi adaptar e validar a utilização de cal sodada na avaliação da respiração microbiana em laboratório, tendo o método tradicionalmente da armadilha de NaOH como referência. Para isso, foi realizado um pré-teste para determinar a quantidade de cal sodada que permitiria máxima absorção de CO_2 em um frasco com 500 cm^3. Depois de definir que 2 g de cal sodada eram suficientes, foi realizado um estudo comparativo com quatro diferentes tipos de solo, acrescidos de duas fontes de carbono orgânico (amido e esterco), com a finalidade de se obter diferentes níveis de respiração. Observou-se baixa variabilidade entre as repetições analíticas do método utilizando solução de NaOH e cal sodada ($R > 0,700$) em quase todos os tempos avaliados. Para o método utilizando solução de NaOH, a correlação de Pearson foi relativamente baixa ($R < 0,700$) no período de 8 dias. O método com cal sodada apresentou uma correlação baixa ($R < 0,700$) no período de 14 dias. As correlações de Pearson entre as réplicas analíticas para as estimativas da taxa respiratória acumulada foram de 0,910 e 0,954 para os métodos com NaOH e cal sodada, respectivamente, indicando uma boa repetibilidade dos métodos de captura de CO_2. Os métodos de avaliação das taxas de respiração microbiana do solo comparados apresentaram excelente correlação entre si ($R = 0,96$). Dessa forma, a cal sodada apresenta comportamento semelhante à solução de NaOH e pode ser usado em substituição ao mesmo.

Palavras-chave: Hidróxido de sódio. Armadilha de CO_2. Microrganismos do solo.

2. INTRODUÇÃO

No solo há o desenvolvimento de um grande número de organismos que são essenciais para a manutenção da qualidade deste ambiente, uma vez que estes organismos estão envolvidos em processos como ciclagem de nutrientes, humificação da matéria orgânica, fixação de nitrogênio, alterações na estrutura do solo, simbioses diversas com plantas, entre outros fatores. A fração viva e ativa dos solos é composta por seres procarióticos, como bactérias e arquéias, e seres eucarióticos, como os fungos. Há também o desenvolvimento de actinobactérias, protozoários, algas, vírus, e invertebrados (Cardoso and Andreote, 2016; Mendonça et al., 2017). Estudar estes organismos é necessário para se conhecer melhor os aspectos da ciclagem e armazenamento de nutrientes, estabilidade do solo, decomposição da matéria orgânica, qualidade e fertilidade do solo.

Algumas características do solo estão diretamente ligadas a microbiota e sua atividade, sendo denominados atributos microbiológicos do solo (Valdez-Nuñez et al., 2019). Alguns atributos microbiológicos são amplamente utilizados como indicadores de qualidade do solo, com destaque à respiração, ao carbono orgânico e à biomassa microbiana do solo, com base nos quais é possível calcular o quociente microbiano e o quociente metabólico (Novak et al., 2017; Mendonça et al., 2017). Além destes, é crescente a avaliação de parâmetros relacionados à diversidade microbiana, diversidade de invertebrados, abundância de fungos micorrízicos e atividades de enzimas no solo (Cardoso & Andreote, 2016).

A respiração é um dos parâmetros mais precisos para se determinar a atividade da microbiota do solo. A respiração do solo é resultante da atividade de todos os organismos presentes no solo, sejam eles microrganismos, macrorganismos e raízes de plantas. Já a respiração microbiana é aquela realizada apenas pelos microrganismos do solo como fungos, bactérias, protozoários e algas que são capazes de oxidar a matéria orgânica, geralmente utilizando o O_2 como aceptor final de elétrons (Moreira and Siqueira, 2006; Dionísio et al., 2016; Madigan et al., 2016).

Existem diversos métodos para se estimar a respiração microbiana ou a respiração do solo como um todo. A respiração pode ser mensurada, por exemplo, através da estimativa de O_2 consumido através de cromatografia gasosa ou eletrorespirômetro. Outra alternativa é a quantificação do CO_2 produzido, que pode ser realizada por espectroscopia de infravermelho (IRGA), ^{14}C, cromatografia gasosa, condutividade elétrica ou titulação quando for utilizadas as bases KOH e NaOH como armadilha de CO_2, além da utilização de cal sodada como substância capaz de capturar o CO_2 (Moreira e Siqueira, 2006; Dionísio et al., 2016). Esses

diferentes métodos podem ser implementados no campo ou em laboratório. Contudo, a avaliação dos atributos microbiológicos do solo em laboratório tem ganhado importância com a inclusão desses dados nas rotinas de análise do solo para tomada de decisão durante o manejo dos solos agrícolas (Moreira e Siqueira, 2006; Silva et al., 2018; Aragão et al., 2020).

Apesar de essas metodologias serem amplamente utilizadas (Umnouysin et al., 2017; Ouimette et al., 2018; Bolat & Sensoy, 2019; Reis et al., 2019), grande parte requer equipamentos de alto custo. As análises com cromatografia gasosa e IRGA fornecem dados precisos e de forma rápida, no entanto, os equipamentos são relativamente caros. Contrastando com essas metodologias, os métodos que utilizam cal sodada ou soluções como armadilhas de CO_2 são baratos, práticos e tem aplicabilidade no campo, com a inserção de câmaras no solo, ou sob temperatura e umidade controladas no laboratório (Umnouysin et al., 2017; Yilmaz and Bilgili, 2018).

Em laboratório, a principal metodologia utilizada consiste na captura de CO_2 com solução de NaOH e posterior titulação com HCl. Apesar de ser o método mais utilizado, existem algumas limitações como a possível saturação da solução de NaOH, o que levaria a uma subestimação da taxa respiratória do solo. Outro ponto desfavorável seria a umidade do solo, que, uma vez alta dificulta o processo de liberação do CO_2. Além disso, a determinação da respiração microbiana através da titulação da solução de NaOH é um método trabalhoso e demorado (Silva et al., 2007).

O método com cal sodada é muito utilizada no campo (Monteith et al., 1964; Edwards, 1982; Keith and Wong, 2006; Näthe et al., 2018; Tarus et al., 2018; Yılmaz and Bilgili, 2018; Joshi and Garkoti, 2020). Por ser um método gravimétrico, não dependente de titulação e é mais simples e rápido (Yilmaz and Bilgili, 2018). Contudo, é necessária a realização de estudos para uma possível adaptação do método para aplicação em laboratório em sistemas fechados. Uma vez que na literatura não há trabalhos que validam o uso de cal sodada em laboratório, estudos que comparem esse método com o tradicionalmente utilizado em laboratório confirmariam se o método da cal sodada pode ser de fato utilizado em substituição aos demais.

Com isso, o objetivo deste estudo foi adaptar o método de captura de CO_2 utilizando cal sodada para avaliar a respiração basal e induzida da microbiota do solo em laboratório. Desta forma, especificamente buscou-se (i) adequar a quantidade de cal sodada para o volume do frasco utilizado e (ii) estabelecer o nível de correlação entre o método tradicionalmente utilizando a armadilha de NaOH e o método da cal sodada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização Geral

Inicialmente, um pré-teste foi realizado para determinar a quantidade de cal sodada (hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio) a ser utilizada como armadilha de CO_2. Posteriormente, os tratamentos foram construídos para realização do estudo comparativo. O pré-teste e o estudo comparativo foram conduzidos em um sistema constituído de um frasco de vidro com volume de 500 cm^3 contendo 100 gramas de solo e um recipiente contendo a armadilha de CO_2 (cal sodada ou solução de NaOH).

Para o pré-teste foi coletado solo sob cultivo de eucalipto (0-20 cm), enquanto para o estudo comparativo foram coletados quatro solos diferentes: solo sob mata (0-20 cm), solo sob cultivo intensivo com irrigação (0-20 cm), solo não cultivado e sem irrigação (0-20 cm) e solo subsuperficial (horizonte B_W3, 80-100 cm) sob pousio. Todos os solos pertenciam ao grupo dos Latossolos Vermelho-Amarelos.

No campo, foram coletadas cinco amostras simples de cada solo. As amostras simples foram misturadas e homogeneizadas compondo amostras compostas para cada solo. Em seguida, os solos foram transportados até o laboratório Laboratório de Análise Químicas de Solos e Alimentos (LASA), da Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba (UFV/CRP), onde foram tamisados em uma peneira com malha de 2 mm e transferidos para bandejas.

Amostras de 100 g dos solos foram transferidas para os frascos de vidro devidamente identificados. A umidade dos solos foi ajustada adicionando 5 ml de água, e em seguida foram adicionadas as quantidades de amido e estercos previamente definidas (Tab. 1). Parte das amostras foi autoclavada uma vez durante duas horas a uma temperatura de 120 ºC. Estas combinações de condições permitiram obter amostras com diferentes condições de labilidade da matéria orgânica e biomassa microbiana.

3.2 Pré-teste

Para o pré-teste, o solo coletado sob cultivo de eucalipto foi submetido a duas condições: com adição de esterco (50 t ha^{-1}) e sem a adição de esterco, com três repetições cada.

Segundo Keith and Wong (2006), a quantidade de cal sodada necessária para uma máxima absorção de CO_2 é de 50 g em uma câmara com área superficial de 824,6 cm^2 aplicada em condições de campo. Considerando que o frasco de vidro utilizado para avaliar a

respiração tem área de 28,26 cm^2, foram testadas as quantidades de 2, 5 e 10 g. As análises laboratoriais com cal sodada foram baseadas nas técnicas descritas por Monteith et al. (1964), Edwards (1982) e Zibilske (1994). Os grânulos de cal sodada (Dinâmica) foram secos em estufa de circulação forçada de ar por 48 horas a 70 ºC. Em seguida, 2, 5 ou 10 g de cal sodada foram pesadas em recipientes de 50 mL de capacidade, umedecidas (160 µL de água para cada 1 g de cal) e incubadas nos frascos contendo 100 g de solo. Os frascos foram fechados hermeticamente e incubados a temperatura ambiente (média de 27 ºC). Foram montadas três repetições para cada quantidade de cal sodada e dois brancos sem adição de solo, apenas com os recipientes de cal.

Concomitantemente, recipientes contento 20 mL de solução de NaOH 0,5 mol/L foram incubados em frascos contendo 100 g de solos, e sob as mesmas condições acima, para análise laboratorial da respiração, como proposto por Mendonça et al. (2017). Dois frascos sem adição de solo, contendo apenas o recipiente com NaOH, também foram montados como branco. Estes frascos foram fechados hermeticamente e incubados a temperatura ambiente. A captura de CO_2 pelas armadilhas foi avaliada a cada 48 h de incubação por 14 dias.

A cada avaliação, os frascos com cal sodada ou solução de NaOH. Os recipientes com cal sodada foram retirados e imediatamente transferidos para uma estufa e secos por 48 h à 70 ºC, para posterior pesagem. Os recipientes contendo a solução de NaOH foram retirados dos frascos no momento da titulação, e 5 mL de NaOH, acrescida de 1 mL de $BaCl_2$ saturado e duas gotas de fenolftaleína 1%, foram titulados com HCl 0,25 mol/L. Passados 15 minutos da abertura do frasco, um novo recipiente contendo a armadilha de CO_2 era adicionado para dar continuidade ao processo até completar 14 dias da montagem do pré-teste.

Posteriormente, foram feitos os cálculos da quantidade de CO_2 capturado. A quantidade de CO_2 absorvido pela cal sodada foi calculado pela Formula 1:

Fórmula 1:

C-CO_2 (µg CO_2 h^{-1}g de solo $seco^{-1}$) =

$$\frac{\left[\left(\text{ganho de peso da amostra(g)} - \text{ganho de peso do branco(g)}\right) \times 1{,}691\right]}{\left[\text{peso do solo seco (g) x tempo (h)}\right]} \text{x} 1000000$$

Onde:

1000000: Conversão de unidades, gramas para micrograma.

O CO_2 capturado pela armadilha com solução de NaOH é calculado utilizando a Fórmula 2:

Fórmula 2:

C-CO_2 (µg CO_2 h^{-1}g de solo $seco^{-1}$) =

$$\frac{(Vb - Va)x\ C\ x\ f\ x\ 22\ x\ Fa}{[\text{peso do solo seco (g) x tempo (h)}]}\ x\ 1000$$

Onde:

Va: Volume de HCl gasto na titulação da amostra;

Vb: Volume de HCl gasto na titulação do branco;

C: Concentração da solução de HCl utilizado na titulação;

f: Fator de correção na concentração do ácido;

22: Equivalente-grama de CO_2;

Fa: Fator de correção da alíquota usada na titulação (volume de NaOH usado como armadilha de CO_2 dividido pelo volume da alíquota de NaOH utilizado na titulação).

1000: Conversão de unidades, miligramas para microgramas.

A quantidade de cal sodada que apresentou a máxima absorção de CO_2 e um comportamento semelhante ao apresentado pela solução de NaOH foi utilizada no ensaio.

3.3 Estudo comparativo entre respiração microbiana com armadilha de NaOH e com cal sodada

No estudo comparativo as amostras dos solos de mata, sob cultivo intensivo com irrigação, solo não cultivado e sem irrigação e solo subsuperficial (horizonte B_W3) foram transferidas para frascos e diferentes concentrações de amido ou esterco foram adicionadas (Tab. 1). Frascos com os mesmos solos, com e sem adição de amido e esterco, foram preparados e submetidos ao processo de autoclavagem (Tab. 1). A taxa respiratória foi determinada para cada combinação (tipo de solo, autoclavagem ou não, adição ou não de amido e/ ou esterco) utilizando as duas armadilhas de CO_2. Frascos controle sem solo, contendo apenas as armadilhas de CO_2, também foram montados.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos aplicados às amostras de solo para obtenção das situações contrastantes de labilidade da matéria orgânica e de biomassa microbiana inicial.

Solos amostrados	Autoclavado	Concentração de amido (%)	Quantidade de esterco (t ha^{-1})	Tratamento
Sem cultivo e sem irrigação	Não	1,8	18	1
		0,4	12	2
		0,2	4	3
		0	0	4
	Sim	0	0	5
		1,8	18	6
Cultivo intensivo com irrigação	Não	0,6	16	7
		0,3	8	8
		0,1	2	9
		0	0	10
	Sim	0	0	11
		0,6	16	12
Mata	Não	1	20	13
		0,5	10	14
		0,2	5	15
		0	0	16
	Sim	0	0	17
		1	20	18
Solo subsuperficial (Horizonte B_W3)	Não	0	0	19
	Sim	0	0	20

Para captura do CO_2 com cal sodada ou NaOH, os tratamentos da Tabela 1 foram separados em frascos de 500 cm^3, em duplicata. Os tratamentos com solução de NaOH receberam um recipiente com 20 mL da solução com concentração de 0,5 mol L^{-1}. A cal sodada foi seca por 48 horas à temperatura de 70ºC previamente à montagem dos frascos. Os tratamentos com cal sodada foram montados utilizando a massa de cal sodada definida no pré-teste, que foi de 2 g de cal sodada (Fig. 1). Os frascos com 100 g do solo e a solução de NaOH ou cal sodada foram fechados hermeticamente e incubados a temperatura ambiente (média de 27 ºC). Quatro frascos com solução de NaOH ou cal sodada, sem solo, também foram preparados e utilizados como branco.

A quantificação do CO_2 foi realizada nos períodos de 2, 4, 8, 14, 22 e 30 dias após o fechamento dos frascos, quando se espera a estabilização da produção de CO_2. Ao final de cada período os frascos (contendo solo e o branco sem solo) foram abertos e o recipiente com NaOH foi retirado e titulado com solução de HCl 0,15 mol L^{-1}, conforme descrito na metodologia do pré-teste. Outro recipiente contendo NaOH na mesma quantidade e concentração foi adicionado aos frascos, que foram fechados hermeticamente e incubados até o próximo período de avaliação. O cálculo da quantidade de C-CO_2 evoluído foi apresentado em µg CO_2 h^{-1}g de solo seco^{-1} (Fórmula 2).

A análise da respiração utilizando cal sodada foi também realizada nos períodos de 2, 4, 8, 14, 22 e 30 dias após a montagem do sistema, conforme metodologia adotada no pré-teste. Nesses períodos, cada frasco foi aberto para retirada do recipiente contendo a cal sodada, que foi levado para estufa e mantido à 70º C por 48 horas para secagem da cal sodada. Um novo recipiente contendo cal sodada foi colocado nos frascos, que foram novamente fechado e incubados. A quantidade de CO_2 produzido foi calculada pela Fórmula 1 e apresentada em µg CO_2 h^{-1}g de solo seco^{-1}.

3.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de correlação entre os métodos e entre as repetições analíticas. A significância do coeficiente de correlação de Pearson foi testada pelo teste t a 5 % de probabilidade de erro. Para o pré-teste foi feito o teste de média SNK a 5 % de probabilidade de erro

4. RESULTADOS

4.1 Pré-teste

As quantidades de 2 e 5 gramas de cal sodada apresentaram valores de captura de CO_2 total semelhantes a solução de NaOH (Fig. 1). A quantidade de 10 g de cal sodada demonstrou baixo potencial de captura de CO_2, com a média de captura aproximadamente 40% menor que a média observada em 2 gramas.

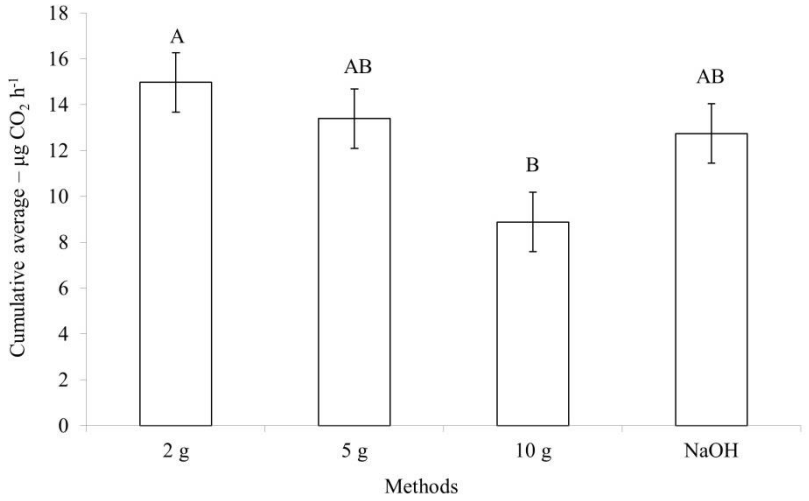

Figura 1. Média ± erro padrão da respiração microbiana do solo acumulada pelos métodos da cal sodada (2, 5 e 10 gramas) e o método tradicional (NaOH) no pré-teste. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de SNK a 5 % de probabilidade de erro.

4.2 Variabilidade de cada método

A variabilidade entre as repetições analíticas do método NaOH (Tab. 2) foi baixa em todos os períodos avaliados, exceto para o período de 8 dias, cuja correlação foi relativamente baixa (R < 0,700), embora significativa. Para a estimativa da taxa respiratória acumulada ao longo de todo o período avaliado, a correlação foi de 0,910, indicando uma boa repetitividade do método.

A variabilidade entre as repetições analíticas do método cal sodada (Tab. 3) foi baixa em todos os períodos avaliados, exceto para o período de 14 dias, cuja correlação foi relativamente baixa (R < 0,700), embora significativa. Para a estimativa da taxa respiratória acumulada ao longo de todo o período avaliado, a correlação foi de 0,954, indicando uma boa repetitividade do método de captura de CO_2 com a cal sodada. Este valor é apenas 4,8 % superior ao observado para o método tradicional (Tab. 2). Considerando os seis períodos avaliados, ambos os métodos tiveram correlações que sugerem excelente repetitividade (R > 0,900) em três períodos avaliados (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Matriz de correlação de Pearson (n = 20) das taxas de respiração microbiana do solo (µg CO_2 h^{-1}) entre as repetições analíticas do método de captura com solução de NaOH ao longo do período de incubação

		NaOH (replicate 1)													
		2 dias		4 dias		8 dias		14 dias		22 dias		30 dias		cumulate	
NaOH (replicate 2)	2 dias	**0.968**	**												
	4 dias	0.974	**	**0.956**	**										
	8 dias	0.684	**	0.665	**	**0.605**	**								
	14 dias	0.812	**	0.806	**	0.661	**	**0.787**	**						

22 dias	0.748	**	0.796	**	0.690	**	0.846	**	**0.866**	**							
30 dias	0.823	**	0.870	**	0.774	**	0.892	**	0.909	**	**0.928**	**					
Cumulate	0.912	**	0.913	**	0.799	**	0.889	**	0.893	**	0.863	**	**0.910**	**			

Coeficientes seguidos por ** e * indicam correlações significativas ao nível de 1 e 5 % pelo teste t. Valores destacados correspondem às correlações de maior interesse (mesmo período de incubação).

Tabela 3. Matriz de correlação de Pearson (n = 20) das taxas de respiração microbiana do solo (μg CO_2 h^{-1}) entre as repetições analíticas do método de captura com cal sodada ao longo do período de incubação

		..... soda lime (replicate 1)															
		2 dias		4 dias		8 dias		14 dias		22 dias		30 dias		cumulate			
soda lime (replicate 2)	2 dias	**0.934**	**														
	4 dias	0.847	**	**0.894**	**												
	8 dias	0.609	**	0.458	*	**0.758**	**										
	14 dias	0.687	**	0.631	**	0.722	**	**0.681**	**								
	22 dias	0.791	**	0.733	**	0.879	**	0.763	**	**0.915**	**						
	30 dias	0.754	**	0.618	**	0.858	**	0.850	**	0.806	**	**0.943**	**				
	Cumulate	0.860	**	0.763	**	0.904	**	0.742	**	0.909	**	0.850	**	**0.954**	**		

Coeficientes seguidos por ** e * indicam correlações significativas ao nível de 1 e 5 % pelo teste t. Valores destacados correspondem às correlações de maior interesse (mesmo período de incubação).

4.3 Correlação entre os métodos

Os dois métodos de avaliação das taxas de respiração microbiana do solo apresentaram excelente correlação entre si (Fig. 2). O desvio padrão médio entre os dados e o modelo foi de apenas 1,21. No entanto, embora a correlação tenha sido muito forte e significativa, a equação de correlação ajustada evidencia que as taxas estimadas pelo método da cal sodada são, em geral, superiores às taxas estimadas pelo método tradicional. De acordo com a equação ajustada, e considerando um intervalo estudado de aproximadamente 2 a 20 μg CO_2 h^{-1}, a cal sodada resulta em taxas aproximadas de 10 a 50 % superiores às obtidas pelo método tradicional. O número de estimativas iguais à zero, não raras neste tipo de análise, foi maior no método da cal sodada em relação ao método tradicional (dados não mostrados).

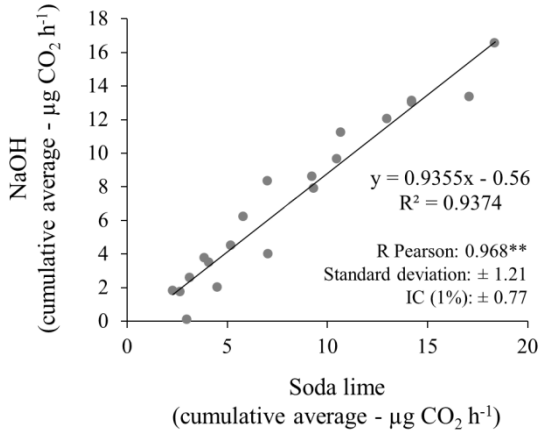

Figura 2. Correlação entre as taxas de respiração microbiana do solo (n = 20) obtidas pelos métodos da cal sodada e tradicional (NaOH). Taxas médias relativas a todo o período de incubação.

5. DISCUSSÃO

As taxas de respiração microbianas obtidas pela metodologia com cal sodada foram ligeiramente superiores às taxas obtidas pelo método tradicional (Figura 2). Isso corrobora com os resultados obtidos por Umnouysin et al. (2017), que avaliaram a respiração microbiana em detritos de três espécies de árvores de uma floresta de mangue através de cromatografia gasosa e cal sodada. Estes autores obtiveram taxas médias de CO_2 ligeiramente superiores quando se utilizou cal sodada e ao realizarem a análise de regressão para se verificar a precisão do método com cal sodada em comparação a cromatografia gasosa, observaram um alto coeficiente de correlação, indicando que as taxas de respiração microbianas obtidas pelos dois métodos não foram significativamente diferentes, assim como no nosso estudo.

Raich et al., (1990) também compararam as taxas de fluxo de CO_2 em solos de florestas utilizando as metodologias de cromatografia gasosa e cal sodada. Os autores não observaram diferenças nas taxas médias diárias de fluxo de CO_2 quando utilizando os dois métodos. Janssens and Ceulemans (1998) compararam a respiração de solos de floresta utilizando as técnicas com gás infravermelho (IRGA) e cal sodada e observaram uma boa corrrelação entre os métodos ($R^2 = 0.92$). Porém, o método com cal sodada subestimou a quantidade de CO_2 liberado quando as taxas de respiração microbiana do solo eram maiores. Herrmann and Bauhus (2008) determinaram a produção de CO_2 em detritos lenhosos de faia-europeia (*Fagus sylvatica* L.) e abeto-falso (*Picea abies* (L.) Karst) através do IRGA e da cal sodada, nesse caso, a metodologia utilizando cal sodada também subestimou os valores de CO_2 liberados.

A escolha da metodologia a ser utilizada para mensurar a respiração microbiana deve ser realizada levando em conta a precisão e facilidade do método. A utilização da cal sodada é promissora devido ao seu baixo custo, pois não há a necessidade de utilizar equipamentos caros, a metodologia é considerada simples, possibilitando a análise de um maior número de amostras (Janssens and Ceulemans, 1998; Raich et al., 1990; Herrmann and Bauhus, 2008; Umnouysin et al., 2017). A utilização da cal sodada pode ser considerada simples por requerer apenas a secagem e pesagem da cal antes e depois da incubação com o solo. Por outro lado, o método tradicional demanada um longo processo de preparação e padronização de soluções antes da montagem do experimento. Além disso, após o período de incubação é realizada a quantificação do CO_2 produzido, este processo demanda a montagem de equipamentos e a

titulação da solução de NaOH, que são procedimentos demorados se comparado com a utilização da cal sodada.

No entanto, o método utilizando cal sodada possui algumas limitações. O número de estimativas iguais à zero foi maior se comparado ao método tradicional. Isso pode ser devido ao período de secagem da cal sodada ou baixa captura de CO_2 em consequência de um baixo tempo de incubação da cal sodada ou pequena quantidade de solo no recipiente. Tais problemas podem ser evitados aumentando o tempo ou temperatura de secagem, e assim garantir a total secagem da cal sodada. Maior tempo de incubação da cal sodada no sistema, ou o aumento da quantidade de solo incubado, poderia aumentar a massa de CO_2 capturado pela cal sodada. Com isso, diminuiria as chances de estimativas iguais a zero.

Apesar das limitações, a metodologia com cal sodada apresentou valores de CO_2 produzido semelhantes à metodologia tradicionalmente. Por esse motivo, e por ser uma metodologia de aplicação simples, o uso de cal sodada é promissora em ambientes de laboratório.

6. CONCLUSÃO

O uso da cal sodada como armadilha de CO_2 em substituição do NaOH se mostrou promissora. Uma vez determinado que a massa de 2 g de cal sodada seria adequada para o recipiente utilizado no ensaio de respiração, os métodos de captura de CO_2 comparados apresentaram repetitividade satisfatória e boa correlação entre si. Com as alterações propostas, a adaptação do método da cal sodada para sistemas fechados aqui proposta pode ser adotada em substituição ao método tradicionalmente de solução de NaOH.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, O. O. S.; LONGATTI, S. M. O.; CAPUTO, P. S. C.; RUFINI, M.; CARVALHO, G. R.; CARVALHO, T. S.; MOREIRA, F. T. M. Microbiological indicators of soil quality are related to greater coffee yield in the Brazilian Cerrado region. Ecological Indicators. 2020, vol 113, doi: https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106205.

BOLAT, I.; SENSOY, H. Microbial Biomass Soil Content and Activity Under Black Alder and Sessile Oak in the Western Black Sea Region of Turkey. International Journal of Environmental Research. 2019, vol. 13, p. 781–791. https://doi.org/10.1007/s41742-019-00216-6.

CARDOSO, E.J.B.N. and ANDREOTE, F.D. Microbiologia do Solo. 2ª ed. Piracicaba, 2016. ISBN: 978-85-86481-56-7.

DIONÍSIO, J.A., et al. Guia Prático de Biologia do Solo. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016. ISBN: 978-85-69146-00-1.

EDUARDS, N.T. The flux of soda-lima for measuring respiration rates in terrestrial systems. Pedobiologia, p. 21-37, 1982.

HERRMANN, S.; BAUHUS, J. Comparison of methods to quantify respirational carbon loss of coarse woody debris. Canadian Journal of Forest Research. 2008, vol. 38, p. 2738–2745. doi:10.1139/X08-115.

JANSSESS, I. A.; CEULEMANS, R. Spatial variability in forest soil CO2 efflux assessed with a calibrated soda lime technique. Ecology Letters. 1998, vol. 1, p. 95–98.

JOSHI, R. K.; GARKOTI, S. C. Litter dynamics, leaf area index and forest floor respiration as indicators for understanding the role of Nepalese alder in white oak forests in central Himalaya, India. Ecological Indicators. 2020, vol. 111. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106065.

KEITH, H.; WONG, S.C. Measurement of soil CO_2 efflux using soda lima absorption: both quantitative and reliable. Soil Biology & Biochemistry. 2006, vol. 38, p. 1121-1131. doi:10.1016/j.soilbio.2005.09.012.

MADIGAN, M.T., et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. ISBN 978-85-8271-298-6.

MENDONÇA, E.S. and MATOS, E.S. Matéria Orgânica do Solo, 2ª Ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2017. ISBN: 9788569193029.

MONTEITH, J.L.; SZEIEZ, G.; YABUKI,K. Crop photosynthesis ans the flux of carbon dioxide below the canopy. Journal Applied Ecology. 1964, vol. 1, nº 2, p. 321-337. Doi: 10.2307/2401316.

MOREIRA, F.M.S. and SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª Ed. Lavras: UFLA, 2006. ISBN: 85-87692-33-x.

NÄTHE, K.; LEVIA, D. F.; TISCHER, A.; MICHALZIK, B. Low-intensity surface fire effects on carbon and nitrogen cycling in soil and soil solution of a Scots pine forest in central Germany. Catena. 2018, vol. 162, p. 360–375. https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.10.026.

NOVAK, E.; CARVALHO, L.A.; SANTIAGO, E.F.; PORTILHO, I.I.R. Chemical and Microbiological Attributes Under Different Soil Cover. Cerne. 2017, vol. 23, nº 1, p. 19-30. Doi: 10.1590/01047760201723012228.

OUIMETTE, A.P.; OLLINGER, S.V.; RICHARDSON, A.D.; HOLLINGER, D.Y.; KEENAN, T.F.; LEPINE, L.C.; VADEBONCOEUR, M.A. Carbon fluxes and interannual drivers in a temperate forest ecosystem assessed through comparison of top-down and bottom-up approaches. Agricultural and Forest Meteorology. 2018, vol. 256-257, p. 420-430. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.03.017.

RAICH, J.W., BOWDEN R.D., STEUDLER,P.A. Comparison of two static chamber techniques for determining carbon dioxide efflux from forest soils. Soil Science Society of America Journal. 1990, vol. 54, p. 1754–1757.

REIS, F.C.; TORNISIELO, V.L.; MARTINS, B. A.B.; SOUZA, A.J.; ANDRADE, P.A.M.; ANDREOTE, F.D.; SILVEIRA, R.F.; FILHO, R.V. Respiration induced by substrate and

bacteria diversity after application of diuron, hexazinone, and sulfometuron-methyl alone and in mixture. Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2019, Vol. 54, Nº 7, p. 560–568. https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1620043.

SAVIOZZI, A.; BUFALINO, P.; LEVI-MINZI, R.; RIFFALDI, R. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. Biol Fertil Soils. 2002, vol. 35, p. 96–101. Doi: 10.1007/s00374-002-0445-9.

SILVA, A.O; COSTA, A. M.; TEIXEIRA, A. F. S.; GUIMARÃES, A. A.; SANTOS, J. V.; MOREIRA, F. M. S. Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysiognomies. Ecological Indicators 2018, Vol. 93, p. 142-151. Doi: https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.073.

SILVA, E.E.; AZEVEDO, P.H.S.; POLLI, H. Determinação da Respiração Basal (RBS) e Quociente Metabólico do solo (qCO_2). Seropédica: Embrapa, 2007. ISSN: 1517-8862.

TARUS, G.K.; KIRUI, B.K.; OBWOYERE, G. Impacts of forest management type and season on soil carbon fluxes in Eastern Mau Forest, Kenya. African Journal Ecology. 2018, vol. 57, p. 113-121. Doi: 10.1111/aje.12571.

UMNOUYSIN, S.; SANGTIEAN, T.; SATO, T.; POUNGPARN, S. Comparative carbon dioxide efflux rates from respiration of coarse woody debris among three mangrove species in Thailand. TROPICS. 2017, Vol. 26, Nº 2, p. 49-57. DOI:10.3759/tropics.MS16-16.

VALDEZ-NUÑEZ, R. A.; ROJAS-GARCÍA, J. C.; RÍOS-RUIZ, W.F. Microbiological indicators of tropical soils quality in ecosystems of the north-east area of Peru. Scientia Agropecuaria. 2019, Vol. 10, Nº 2, p. 217-227. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2019.02.07.

YILMAZ, G.; BILGILI, A. V. Modeling seasonal variations of long-term soil CO2 emissions in an orchard plantation in a semiarid area, SE Turkey. Environ Monit Assess. 2018, Vol. 190, p. 486. https://doi.org/10.1007/s10661-018-6861-6.

ZIBILSKE, L.M. Carbon mineralization. In: MICKELSON, S.H Methods of soil analysis part 2 – Microbiological and Biochemical Properties. Publ. Soil Science Society of America. 1994, pag. 836.

CONCLUSÕES GERAIS

Os métodos testados nos dois capítulos apresentaram boa repetitividade e boa correlação entre si. Portanto, a digestão nitroperoxídica pode ser usada em substituição à digestão nitroperclórica e o método da cal sodada pode ser adotado em sistemas fechados em substituição ao método tradicionalmente utilizando solução de NaOH.