

**DIOGO MENDES DE PAIVA**

**REDUÇÃO NA VOLATILIZAÇÃO DE AMÔNIA DERIVADA DA URÉIA POR  
ÁCIDOS HÚMICOS PRODUZIDOS DE CARVÃO DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Solos e Nutrição  
de Plantas, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**DIOGO MENDES DE PAIVA**

**REDUÇÃO NA VOLATILIZAÇÃO DE AMÔNIA DERIVADA DA URÉIA POR  
ÁCIDOS HÚMICOS PRODUZIDOS DE CARVÃO DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Solos e Nutrição  
de Plantas, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de abril de 2009.

---

Prof. Ivo Ribeiro da Silva  
(Co-orientador)

---

Prof. Sebastião Tavares de Resende  
(Co-orientador)

---

Prof. Júlio César Lima Neves

---

Prof. Jairo Tronto

---

Prof. Reinaldo Bertola Cantarutti  
(Orientador)

À vovó Iria (*in memoriam*) e ao vovô Alvarim,  
**Dedico.**

À minha mãe, Dulcinéa, ao meu pai, Darlizeti;  
Às minhas irmãs, Débora e Danusa;  
E à minha namorada, Thaís,  
**Ofereço.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha saúde.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Reinaldo Bertola Cantarutti, pela orientação, pelo desafio proposto e pela confiança.

Aos Professores Ivo Ribeiro da Silva e Sebastião Tavares de Resende, pela disposição e colaboração na realização dos trabalhos, e pelas sugestões nas correções da dissertação.

Aos Professores Júlio César Lima Neves e Jairo Tronto, pela participação na banca examinadora e pelas sugestões.

Ao estudante Gelton, pelo auxílio em todo o trabalho, pela confiança em que lhe pude creditar e pela amizade.

Ao técnico João Milagres e ao estudante de doutorado Fabrício, pela disposição em colaborar com meu trabalho e pelas amizades.

A todos os colegas do Laboratório de Isótopos Estáveis, pela convivência.

Ao Laboratório de Painéis e Energia da Madeira do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, pela disponibilidade para produção do carvão vegetal.

Ao Laboratório de Instrumentação e Quimiometria do Departamento de Química da UFV, pela colaboração nas análises de titulação.

Ao Laboratório de Análises Bioquímicas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV e ao estudante de doutorado Daniel, pelo auxílio e disponibilidade para realização das análises enzimáticas.

Aos amigos Cícero e Thiago, pela amizade iniciada na Rural e companheirismo nessa caminhada.

Aos colegas das “peladas sabadais”, pelas amizades e momentos de descontração.

## **BIOGRAFIA**

DIOGO MENDES DE PAIVA, filho de Dulcinéa Borges Mendes Paiva e Darlizeti de Paiva, natural de São João da Mata - MG, nasceu no dia 20 de agosto de 1983.

Entre 1999 e 2001 estudou na Escola Agrotécnica Federal de Machado - MG, onde cursou o ensino médio e o curso de Técnico em Agropecuária.

Em 2002 iniciou o curso de graduação em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, recebendo o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2007.

Em março de 2007 iniciou o curso de mestrado em Solos e Nutrição de Plantas na Universidade Federal de Viçosa - MG, concluindo em abril de 2009.

## CONTEÚDO

LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
Produção do carvão vegetal e produção de ácido húmico.....	5
Caracterização dos ácidos húmicos.....	6
Determinação da atividade da urease.....	7
Ensaio de volatilização de NH <sub>3</sub> .....	8
Uréia com proporções crescentes de ácido húmico.....	8
Uréia revestida com ácido húmico.....	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
Síntese e caracterização dos ácidos húmicos produzidos do carvão.....	12
Atividade da urease.....	16
Ensaio de volatilização de NH <sub>3</sub> .....	17
Uréia com proporções crescentes de ácido húmico.....	17
Uréia revestida com ácido húmico.....	22
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
APÊNDICE.....	36

## LISTA DE QUADROS

1. Características químicas dos ácidos húmicos obtidos de carvão de eucalipto nas temperaturas de carbonização de 350 (AH<sub>350</sub>) e 450 °C (AH<sub>450</sub>).....13
2. Atividade relativa da urease *in vitro* e erro padrão da média, sendo o controle dado como 100 % da atividade, com a adição de diferentes quantidades de ácidos húmicos (AH) extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (AH<sub>450</sub>)..... 16
3. Quantidade total de N-NH<sub>3</sub> volatilizada e erro padrão da média em relação ao N aplicado (g kg<sup>-1</sup>) por meio da uréia perolada e uréia solubilizada e liofilizada sem (controle) e com diferentes proporções de ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (AH<sub>450</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>.....18
4. Quantidade total de N-NH<sub>3</sub> volatilizada e erro padrão da média em relação ao N aplicado (g kg<sup>-1</sup>) por meio da uréia perolada, e uréia revestida com óleo vegetal (U-óleo) e com ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (U-AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (U-AH<sub>450</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>.....24

## LISTA DE FIGURAS

1. Uréia liofilizada pura (A), e misturada com 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) e 100 % (F) de ácidos húmicos sintetizados de carvão de *Eucalyptus grandis* produzido com a temperatura final de carbonização de 350 °C (AH<sub>350</sub>).....9
2. Uréia perolada (A), uréia perolada revestida com ácidos húmicos obtidos de carvão de *Eucalyptus grandis* produzido com temperatura final de carbonização de 350 °C U-AH<sub>350</sub> (B), e 450 °C U-AH<sub>450</sub> (C) e com óleo de soja (D).....10
3. Variação do pH das suspensões de AH obtidos de carvão de eucalipto nas temperaturas de carbonização de 350 (AH<sub>350</sub>) e 450 °C (AH<sub>450</sub>) de acordo com o volume de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, caracterizando as curvas de titulação (a) e as curvas de primeira (b) e segunda (c) derivadas das curvas de titulação.....15
4. Teor acumulado de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação ao N aplicado da uréia solubilizada e liofilizada sem (controle) e com diferentes proporções de ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (AH<sub>350</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. O “R<sup>2</sup>” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.....20
5. Teor acumulado de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação ao N aplicado da uréia solubilizada e liofilizada sem (controle) e com diferentes proporções de ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 450 °C (AH<sub>450</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. O “R<sup>2</sup>” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.....21
6. Teor acumulado de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação ao N aplicado da uréia perolada (tratamento adicional), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. O “R<sup>2</sup>” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.....22
7. Teores de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação à dose de N aplicada (g kg<sup>-1</sup>) ao solo por meio da uréia perolada (Up) e uréia revestida com óleo vegetal (U-óleo) e com ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (U-AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (U-AH<sub>450</sub>), em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. Dentro de cada tempo letras diferente indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5 %.....23



8. Percentagem acumulada de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação ao N aplicado como uréia perolada (Up) e uréia revestida com óleo vegetal (U-óleo), com ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (U-AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (U-AH<sub>450</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. O “R<sup>2</sup>” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.....25

## RESUMO

PAIVA, Diogo Mendes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2009.  
**Redução na volatilização de amônia derivada da uréia por ácidos húmicos produzidos de carvão de eucalipto.** Orientador: Reinaldo Bertola Cantarutti. Co-orientadores: Ivo Ribeiro da Silva e Sebastião Tavares de Resende.

A eficiência agronômica e econômica da uréia, fertilizante nitrogenado mais consumido no mundo, é comprometida pelas perdas por volatilização de  $\text{NH}_3$ , que podem chegar a 80 % do N aplicado. Tem-se buscado alternativas para reduzir a volatilização da  $\text{NH}_3$ , mas essas têm determinado a elevação no custo do fertilizante e os resultados obtidos têm sido incertos devido a inúmeros fatores. O revestimento da uréia com ácidos húmicos (AH) pode se constituir em uma alternativa eficiente, em razão da sua elevada capacidade de troca catiônica, do caráter ácido e do elevado poder tampão. Além disso, AH podem ser obtidos a partir de fonte renovável, como o carvão vegetal. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de AH obtidos a partir de carvão de eucalipto para minimizar a volatilização de  $\text{NH}_3$  derivada da uréia. Ácidos húmicos foram obtidos de carvão de *Eucalyptus grandis* produzidos nas temperaturas de carbonização de 350 e 450 °C (AH<sub>350</sub> e AH<sub>450</sub>). Quantificou-se o rendimento na produção dos AH, que foram caracterizados quanto a composição elementar, relação E4/E6 (absorvância 465 nm / absorvância 665 nm), pH e acidez total (CTC). Foi avaliada a influência dos AH na atividade da urease. Realizaram-se dois ensaios em que se mediu a volatilização de  $\text{NH}_3$ ; no primeiro avaliou-se a uréia misturada com proporções crescentes dos AH, obtidos a partir da liofilização de solução de uréia com os AH, e no segundo avaliou-se a uréia perolada comercial revestida com 25 % de AH. Ambos foram realizados em um sistema fechado dinâmico (fluxo contínuo de ar de 0,25 L min<sup>-1</sup>) constituído por câmaras de incubação (frasco de 0,34 dm<sup>3</sup>) e unidades coletoras de  $\text{NH}_3$  (Erlenmeyers com 60 mL de solução de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  20 %). Foram realizadas amostragens a cada 24 h após a aplicação da uréia durante dez dias, substituindo-se as unidades coletoras de  $\text{NH}_3$  por novas. A  $\text{NH}_3$  capturada foi quantificada por titulação potenciométrica. Caracterizou-se a cinética de volatilização da  $\text{NH}_3$  por meio de equações de regressão. O rendimento do AH foi de 257 g kg<sup>-1</sup> e 541 g kg<sup>-1</sup> para os carvões produzidos a 350 e 450 °C, respectivamente. O AH<sub>350</sub> apresentou maior acidez total e menor pH do que o AH<sub>450</sub>. Ambos os ácidos húmicos apresentaram elevada estabilidade, como evidenciaram as baixas relações E4/E6. A atividade da urease não foi influenciada pelos AH. A liofilização da solução de uréia resultou no material em

pó, e esse fato, por si só, ocasionou a redução de aproximadamente 50 % da volatilização de  $\text{NH}_3$ , mascarando possíveis efeitos das doses crescentes de AH. O recobrimento do grânulo de uréia com os AH retardou o início da volatilização. Além disto, o pico máximo de volatilização de  $\text{NH}_3$  ocorreu 72 h após a aplicação, enquanto que para a uréia sem revestimento ocorreu a 48 h. Os AH promoveram menor taxa de volatilização. No entanto, somente o  $\text{AH}_{350}$  foi capaz de diminuir significativamente a volatilização total de  $\text{NH}_3$ , o que pode ser atribuído à sua maior acidez total, que favoreceu a formação e adsorção do  $\text{NH}_4^+$ .

## ABSTRACT

PAIVA, Diogo Mendes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april 2009.  
**Reduction in volatilization of ammonia derived from the urea for humic like substances obtained of eucalyptus charcoal.** Adviser: Reinaldo Bertola Cantarutti.  
Co-advisers: Ivo Ribeiro da Silva and Sebastião Tavares de Resende.

The economic and agronomic efficiency of urea, more nitrogen fertilizer consumed in world, is compromised by loss by volatilization of  $\text{NH}_3$ , which can reach 80% of N applied. It has sought alternatives to reduce the volatilization of  $\text{NH}_3$ , but these have given the rise in the cost of fertilizer and the results are uncertain due to many factors. The coating of urea with humic acids (HA) can be an efficient alternative for their cation exchange capacity high, of acid character and the high power buffer. Also, HA can be obtained from renewable source such as charcoal. This study aimed to evaluate the potential of HA obtained from charcoal from eucalyptus to minimize volatilization of  $\text{NH}_3$  derived from urea. Humic acids were obtained from charcoal of *Eucalyptus grandis* produced in carbonization temperature of 350 and 450 °C (HA<sub>350</sub> and HA<sub>450</sub>). We quantified the performance in the production of HA, which were characterized as the elemental composition, E4/E6 ratio (absorbance 465 nm / absorbance 665 nm), pH and total acidity (CTC). The influence of HA was evaluated in activity of urease. There were two trials which measured the volatilization of  $\text{NH}_3$ , the first focuses on the urea mixed with increasing proportions of HA, obtained from the lyophilization of solution of urea with the HA, and the second focuses on the urea pearly commercial coated with 25 % HA. Both were conducted in a closed system dynamic (continuous flow of air of 0.25 L min<sup>-1</sup>) consisting of an incubation chamber (bottle of 0.34 dm<sup>3</sup>) and collecting units of  $\text{NH}_3$  (Erlenmeyer flasks with 60 mL of solution of  $\text{H}_3\text{BO}_3$  20 %). Samples were taken every 24 h after application of urea during ten days, is replacing the units with new collector of  $\text{NH}_3$ . The  $\text{NH}_3$  captured was quantified by potentiometric titration. Was characterized the kinetics of volatilization of  $\text{NH}_3$  through regression equations. The yield of HA was 257 g kg<sup>-1</sup> and 541 g kg<sup>-1</sup> for the coal produced at 350 and 450 °C, respectively. The HA<sub>350</sub> showed higher total acidity and lower pH than the HA<sub>450</sub>. Both humic acids showed high stability, as evidenced in low E4/E6 relations. The urease activity was not influenced by HA. The lyophilization of the solution of urea resulted in the material powder. This fact, alone, caused a reduction of approximately 50% of the volatilization of  $\text{NH}_3$ , masking effects of increasing doses of HA. The coating of urea granule with HA delayed the onset of volatilization. In addition, the

peak of volatilization of  $\text{NH}_3$  occurred 72 h after application, while for the uncoated urea occurred at 48 h. HA promoted the lower rate of volatilization. However, only the  $\text{HA}_{350}$  was capable of significantly reducing the total volatilization of  $\text{NH}_3$ , which can be attributed to its higher total acidity, which favors the formation and adsorption of  $\text{NH}_4^+$ .

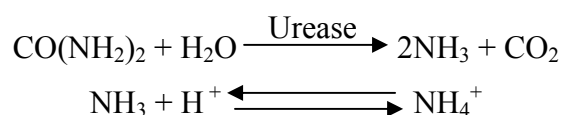
## INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o nutriente demandado em maior quantidade pelas plantas, o que o torna um dos principais determinantes da produção vegetal. A capacidade de suprimento pelos solos, especialmente no curto prazo, no entanto, é limitada, o que torna a fertilização nitrogenada imprescindível. Para satisfazer essa necessidade, grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados são aplicadas em sistemas de produção intensivos, o que, além de onerar o custo de produção, aumenta os riscos de impactos ambientais pela lixiviação de  $\text{NO}_3^-$ , desnitrificação, e volatilização de  $\text{NH}_3$ .

A uréia é, atualmente, o principal fertilizante nitrogenado, sendo que no ano de 2006 representou 52 % dos fertilizantes nitrogenados consumidos no Brasil (Brasil, 2007), e projeta-se que até 2020 haja um consumo três vezes maior (Lopes et al., 2007). A uréia tem um menor custo por unidade de N do que os demais fertilizantes nitrogenados, devido ao seu processo de produção e por apresentar maior teor de N (44 – 46 %), o que resulta, também, em um menor custo de transporte e de aplicação.

A indústria brasileira utiliza apenas 50 % da sua capacidade instalada para produção de uréia (Lopes, et al., 2007), portanto, o crescimento desta produção é estratégico para reduzir a dependência de fertilizantes importados.

Apesar dessas vantagens, a eficiência agronômica e econômica do uso da uréia é comprometida pela perda por volatilização da  $\text{NH}_3$  (Sengik & Kiehl, 1995a, b; Silva et al., 1995; Mattila, 1998). A uréia é hidrolisada pela urease, que é uma enzima amplamente encontrada nos solos (Bremner & Mulvaney, 1978) originada da atividade dos microrganismos e de resíduos vegetal e animal (Freney & Black, 1988). Os principais produtos da hidrólise da uréia são  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ , sendo que a  $\text{NH}_3$  reage com  $\text{H}^+$  formando o  $\text{NH}_4^+$ :



A proporção entre  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$  depende do pH, e com constante de equilíbrio igual a  $5,85 \times 10^{-10}$  (Lindsay, 1979), determina a seguinte equação:

$$\log \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_4^+]} = \text{pH} - 9,2.$$

Assim, a hidrólise da uréia e a formação do íon  $\text{NH}_4^+$  determina a elevação do pH, principalmente ao redor das partículas do fertilizante (Kissel et al., 1988; Rodrigues & Kiehl, 1986; Ouyang et al., 1998), favorecendo a volatilização de  $\text{NH}_3$ .

Existem relatos de perdas por volatilização de  $\text{NH}_3$  a partir da uréia de 27 a 44 % do N aplicado na fertilização de gramíneas forrageiras (Lightner et al., 1990), de 78 % na cultura do milho em sistema plantio direto (Lara Cabezas et al., 1997), de 16 a 44 % na cultura do citrus (Cantarella et al., 2003), e de 21 a 29 % do N na cultura do cafeeiro (Fenilli, 2006). Essa grande variação nas perdas de  $\text{NH}_3$  deve-se aos inúmeros fatores que influenciam na volatilização. Além das condições climáticas, o teor de argila, a matéria orgânica, a CTC, o pH, o tipo e quantidade da cobertura morta, o modo de aplicação e a dose de uréia, também, determinam o potencial de volatilização (Corsi, 1994; Al-Kanani et al., 1991; Silva et al., 1995; Sangoi et al., 2003; Cantarella, 2007).

A incorporação da uréia no solo diminui a volatilização de  $\text{NH}_3$  (Silva et al., 1995; Lara Cabezas et al., 2000) porque ao se difundir a  $\text{NH}_3$  encontra sítios com menor pH, favorecendo a formação e adsorção do  $\text{NH}_4^+$ . No entanto, essa incorporação aumenta o custo da produção agrícola, e é dificultado quando há acúmulo de palha na superfície do solo. Há relatos de que no sistema plantio direto e no cultivo da cana-de-açúcar colhida sem queima a volatilização é mais intensa (Lara-Cabezas et al., 1997). Os resíduos culturais na superfície do solo além de reduzirem o contato da uréia com o solo (Mengel, 1996; Sangoi et al., 2003), favorecem a atividade da urease, tanto pela mineralização dos resíduos, como pelo favorecimento da atividade microbiana (Sangoi et al., 2003).

A indústria de fertilizantes vem desenvolvendo alternativas para diminuir as elevadas perdas de N da uréia pela volatilização de  $\text{NH}_3$ . Entre elas destaca-se a adição de compostos acidificantes como o ácido fosfórico, ácido bórico, cloreto de amônio e nitrato de amônio. Outra alternativa é a uréia de liberação lenta ou controlada, que é obtida pela condensação de uréia e formaldeídos, ou pelo recobrimento ou encapsulamento da uréia com polímeros orgânicos termoplásticos, resinas, S elementar, borracha ou poliolefinas (Cantarella 2007). A adição desses compostos, além de diminuir o teor de N na uréia eleva o seu custo (Cantarella, 2007).

A uréia estabilizada com inibidores da urease é o produto que vem despertando mais interesse. Dentre os inibidores, o NBPT (tiofosfato de N-n-butiltriamida ou N-n-butiltriamida do ácido tiofosfórico) é o mais promissor, sendo utilizado em concentrações que variam de 500 a 1.000 mg  $\text{kg}^{-1}$  de NBPT. No entanto, depois de adicionado à uréia o NBPT tende a perder eficiência com o tempo de armazenamento. A

eficiência do NBPT, também, é influenciada pelas condições ambientais e pelas características físico-químicas do solo, limitando o controle nas perdas de  $\text{NH}_3$  (Cantarella, 2007).

A adição de zeolitas a uréia também tem sido avaliada (Ferguson & Pepper, 1987; He et al., 2002; Ahmed et al., 2006). Zeolitas são alumino silicatos com estrutura cristalina, caracterizadas por tetraedros interligados, contendo cavidades na forma de canais e por apresentar elevada CTC (Monte & Resende, 2005). Como exemplo, uma rocha da Eslováquia, rica em zeolita, apresentou CTC em torno de  $120 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$  (Monte & Resende, 2005). A elevada CTC possibilitaria a retenção do  $\text{NH}_4^+$  e redução nas perdas de  $\text{NH}_3$  na mistura uréia-zeolita (Ferguson & Pepper, 1987; He et al., 2002). A extração de zeolitas naturais é, no entanto, uma atividade com grande impacto para o meio ambiente e a produção industrial é de alto custo (Monte & Resende, 2005). No Brasil, as jazidas são raras e pouco conhecidas e a exploração deste mineral é, ainda, incipiente (Monte & Resende, 2005), ficando dependente da importação.

Potencialmente, substâncias húmicas podem ser utilizadas com este mesmo enfoque, devido à elevada CTC, além do caráter ácido e o elevado poder tampão (Weil & Magdoff, 2004; Silva & Mendonça, 2007). Apesar disso, são escassos trabalhos que avaliem a combinação de uréia com substâncias húmicas.

Garcia-Serna et al. (1996), na busca de novos produtos para produção de fertilizantes de liberação lenta, observaram que a adição de ácidos húmicos foi capaz de diminuir a taxa de liberação de N ( $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ). Siva et al. (1999) relataram redução na volatilização de  $\text{NH}_3$  quando turfa foi adicionada á uréia, o que foi associado à natureza ácida e alta CTC dos ácidos húmicos.

Ahmed et al. (2006) variando a quantidade de ácido húmico e zeolitas, em proporções iguais, misturada com a uréia e superfosfato triplo, verificaram redução de 48 para 18 % na perda de  $\text{NH}_3$  e aumento do  $\text{NH}_4^+$  no solo. Os ácidos húmicos e as zeolitas apresentaram pH (água) 3,51 e 6,12 e CTC de 733 e  $106 \text{ cmol kg}^{-1}$ , respectivamente. O menor pH e a maior CTC dos ácidos húmicos lhe confeririam maior potencial de redução da volatilização de  $\text{NH}_3$ .

Apesar de não se ter encontrado relatos na literatura, há possibilidade das substâncias húmicas reduzirem a atividade da urease, considerando que o fenol é um inibidor da urease (Bremner & Ahmad, 1995) e que os grupamentos fenólicos são abundantes nas substâncias húmicas. Esta inibição pode se dar pela imobilização da urease, já que foi observada a sua adsorção em superfícies inorgânicas (Kibarer, et al., 1996; Barhoumi, et al., 2006), em membranas poliméricas (Akgol, et al., 2002) e em



colóides (Liang, et al., 2005). Houssain, et al. (2008) demonstrou a adsorção da urease em composto de sílica e a conseqüente diminuição na hidrólise da uréia.

Assim, substâncias húmicas podem tornar-se um produto com grande potencial para controlar a volatilização da  $\text{NH}_3$  da uréia, sobretudo, considerando-se que elas podem ser produzidas a partir de fontes renováveis, como carvão vegetal, pela oxidação com  $\text{KClO}_3$  e  $\text{HNO}_3$  ou com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kumada, 1983; Haumaier & Zech, 1995).

Trompowsky et al. (2005) verificaram que substâncias húmicas produzidas de carvão de *Eucalyptus* spp. pela oxidação com ácido nítrico apresentaram alto grau de aromaticidade e, também, de grupos carboxílicos, responsáveis pela reatividade dessas moléculas. Nesse trabalho, foram avaliadas duas espécies de eucalipto (*Eucalyptus saligna* e *E. grandis*) e seis temperaturas de carbonização (300 °C, 350 °C, 400 °C, 450 °C, 500 °C e 550 °C) para a produção do carvão. As espécies não apresentaram diferenças significativas quanto ao rendimento de ácido húmico; no entanto, as temperaturas de 350 °C e 450 °C causaram os maiores rendimentos de ácido fúlvico (300 mg g<sup>-1</sup> carvão) e ácido húmico (450 mg g<sup>-1</sup> carvão), respectivamente.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de ácido húmico, obtido de carvão de eucalipto produzido sob temperaturas de carbonização de 350 e 450 °C, na hidrólise da uréia e na volatilização de  $\text{NH}_3$ .

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção do carvão vegetal e obtenção de ácidos húmicos

Para produção do carvão foram utilizados blocos de madeira de *E. grandis*. A carbonização foi em forno de laboratório por 8 h, com temperaturas finais de carbonização de 350 e 450 °C, conforme Trompowsky et al. (2005). Foi determinado o peso do carvão e estimado o rendimento em relação à massa de madeira. Os carvões foram pulverizados em moinho ultracentrífugo, passados por peneira de 0,074 mm e secados em estufa a 105 °C por 12 h.

Para obter os ácidos húmicos (AH) foi utilizado o procedimento descrito por Trompowsky et al. (2005). Para tanto, adicionaram-se 112 g de HNO<sub>3</sub> 6,10 mol L<sup>-1</sup> a 4,5 g do carvão, e a mistura foi aquecida até a ebulição e mantida sob refluxo por 4 h. Logo após a mistura foi mantida em repouso na temperatura ambiente por 12 h. Para cada um dos carvões, este procedimento foi realizado em duas baterias de seis recipientes. Após o repouso os conteúdos dos seis recipientes foram combinados. A mistura foi filtrada a vácuo passando por membrana de nylon de 0,45 µm (Millipore HAWP04700). O filtrado (material solúvel) foi a primeira fração de ácido fúlvico (Trompowsky et al., 2005), que foi descartado.

O material retido no filtro foi dissolvido em 800 mL de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> e deixado em repouso por 12 h em tubos de centrífuga. A partir daí a obtenção do AH e da segunda fração de ácido fúlvico (AF 2) se deu de acordo com o método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas, descrito por Swift (1996). Para tanto, o material foi centrifugado a 3.345 g por 30 min. O sobrenadante foi filtrado a vácuo em membranas de nylon com poros de 0,45 µm, o pH do filtrado foi imediatamente ajustado para próximo de 2,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,71 mol L<sup>-1</sup> e passado para tubos de centrífuga. O extrato acidificado foi mantido na temperatura ambiente por 12 h e, em seguida, foi centrifugado a 3.345 g por 30 min e o sobrenadante (segunda fração de ácido fúlvico) foi filtrado a vácuo em membranas de nylon com poros de 0,45 µm e descartado. O material decantado nos tubos de centrífuga foram ressolubilizados em 500 mL de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> e repousados por 4 h. Após o repouso os AH obtidos foram acidificados novamente para pH 2 e repousados por mais 12 h.

Após o repouso, o extrato foi centrifugado a 3345 g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado e o material decantado no fundo do tubo (AH) foi reunido e transferido para sacolas de papel celofane de aproximadamente 100 mL e submetidas à diálise com água ultrapura em recipiente coletivo de 20 L. A água foi trocada duas

vezes ao dia, até que não ocorresse aumento na condutividade maior que 1  $\mu\text{S}$  na água de diálise uma hora após a troca desta (Benites et al., 2005). Após a diálise os AH foram transferidos para frasco de vidro, secados em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C, triturados em moinho de bola por 5 minutos para obter granulometria menor que 0,149 mm, e conservadas em dessecador. Esses AH obtidos do carvão de eucalipto nas temperaturas de carbonização de 350 e 450 °C foram identificados como AH<sub>350</sub> e AH<sub>450</sub>, respectivamente.

### **Caracterização dos ácidos húmicos**

Os teores de C, H e N foram determinados por combustão a seco em um analisador elementar (Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Analyser) e expressos em relação à massa seca livre de cinzas. O oxigênio foi determinado pela diferença entre a massa inicial e os teores de C, H e N. Foram calculadas as razões atômicas C/N, H/C e O/C.

O pH do AH foi determinado nas suspensões com água deionizada e com  $\text{CaCl}_2$  0,005 mol L<sup>-1</sup>, na proporção 1:10.

Foi realizada a análise espectroscópica, determinando-se a absorvância a 465 (E4) e 665 nm (E6). Calculou-se a razão E4/E6 para caracterizar a aromaticidade dos AH (Chen et al., 1977).

A acidez total, que caracteriza a capacidade de troca catiônica (CTC) dos AH, foi determinada de acordo com Inbar et al. (1990), diferenciando-se radicais carboxílicos e fenólicos por meio da titulação potenciométrica. Utilizou-se um sistema de titulação potenciométrica desenvolvido no Laboratório de Instrumentação e Quimiometria do Departamento de Química da UFV. Uma amostra de 100 mg do AH foi solubilizada em 5 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> preparada em NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Elevou-se o volume para 24 mL com a solução de NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e, mantendo-se a mistura sob agitação, foi adicionado HCl 1 mol L<sup>-1</sup> até obter pH próximo a 2,0. Titulou-se a mistura com alíquotas de 0,1 mL até atingir 15 mL da solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> obtendo-se, assim, curvas de titulação com 151 pares de pontos.

Como nas curvas de titulação de AH os pontos de inflexão não são bem definidos, por apresentarem valores de pK<sub>a</sub> muito próximos (Masini et al., 1998), foram utilizadas derivadas dessas curvas para facilitar a visualização dos volumes de base aproximados para neutralizar os grupos carboxílicos e fenólicos (Manunza et al., 1992).

O teor de grupamentos carboxílicos foi calculado por meio do volume do titulante necessário para elevar o pH de 3,0 até 8,0. O teor de grupamentos fenólicos foi

calculado por meio do volume do titulante necessário para elevar o pH 8,0 até 10, assumindo que nesta faixa de pH dissocia-se 50 % dos radicais fenólicos (Bowles et al., 1989). A CTC foi calculada pela soma dos teores de radicais carboxílicos e fenólicos.

### **Determinação da atividade da urease**

Propôs-se neste ensaio estudar o efeito do AH<sub>350</sub> e do AH<sub>450</sub> na atividade da urease. A enzima (Urease-U1500 Tipo III, extraída de *Canavalia ensiformis*) com atividade específica de 40 U mg<sup>-1</sup>, foi adquirida da Sigma Chemical Company. Uma unidade de enzima (U) é a quantidade da enzima que libera 1 μmol de NH<sub>3</sub> da uréia por minuto, a pH 7 e a 25 °C. Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentavam procedência e grau de pureza analítico.

Inicialmente foi realizado testes para definir o ensaio padrão, variando a concentração de enzima e o tempo de reação. Três misturas de reações foram preparadas; primeiro foi adicionado, para todas as reações, 1,48 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, após, 20 μL de solução enzimática, 0,5 g L<sup>-1</sup>, 1,0 g L<sup>-1</sup> ou 2,0 g L<sup>-1</sup> preparadas em tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>, foi adicionado para cada reação e, por fim, 0,5 mL de solução de uréia 40 mmol L<sup>-1</sup> preparada em tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado a todas misturas de reações. As reações foram realizadas em triplicata e conduzidas em banho-maria a 25 °C por 3, 6, 9, 12, 15, 18 ou 21 minutos. A quantificação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> formado em cada reação foi determinada pelo método do hipoclorito-fenol (Witte & Medina-Escobar, 2000), realizando a leitura da absorvância em 636 nm. A atividade enzimática foi expressa em μmol L<sup>-1</sup> utilizando uma curva analítica preparada com concentrações entre 0 a 10 μmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl.

Para os ensaios da atividade da urease com os ácidos húmicos, foram preparadas misturas de reação contendo doses crescentes dos AH<sub>350</sub> ou do AH<sub>450</sub>, sendo essas doses 0 (controle), 50, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup>. O ensaio para cada AH foi feito separadamente. Para isto, a mistura de reação foi preparada, em triplicata, contendo 0, 5, 50, 250 ou 500 μL de solução estoque do AH<sub>350</sub> ou AH<sub>450</sub> (2 g L<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>), correspondentes às concentrações descritas acima. Em seguida, foi adicionado, respectivamente, em cada mistura de reação, 1,480, 1,475, 1,430, 1,230 e 0,980 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, e após foi adicionado 20 μL de solução estoque da enzima (1,0 g L<sup>-1</sup> em tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>), resultando para cada mistura de reação o volume de 1,5 mL. As misturas de reação foram pré-incubadas a 25 °C por 5 minutos. Após a pré-incubação, a reação foi iniciada com a adição de 0,5 mL de solução de uréia 40 mmol L<sup>-1</sup> preparada em tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>

e conduzidos por 12 minutos a 25 °C. A determinação do  $\text{NH}_4^+$  produzido na hidrólise da uréia foi feita como descrito anteriormente, porém, cada mistura de reação, com as diferentes doses de  $\text{AH}_{350}$  ou  $\text{AH}_{450}$ , teve o  $\text{NH}_4^+$  estimado referente a uma curva padrão de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que continha a sua respectiva dose de AH para efeito de controle. A atividade para reação controle foi considerada como 100 % da atividade e as demais calculadas em relação a essa.

O ensaio foi organizado no delineamento experimental inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos a análise de variância.

### **Ensaio de volatilização de $\text{NH}_3$**

Foram realizados dois ensaios em laboratório, utilizando terra fina seca ao ar da camada de 0 a 10 cm de profundidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo, continuamente cultivado sob plantio direto. Este solo apresentou pH- $\text{H}_2\text{O}$  5,58 (1:10), 46  $\text{mg dm}^{-3}$  de P e 240  $\text{mg dm}^{-3}$  de K, ambos em Mehlich 1, 3,7 e 0,8  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ ), respectivamente, 6,8  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  de H+Al (acetato de cálcio 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  pH 7,0), 50  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria orgânica (Walkley-Black), 36,5  $\text{mg L}^{-1}$  de P remanescente, e V de 43 %.

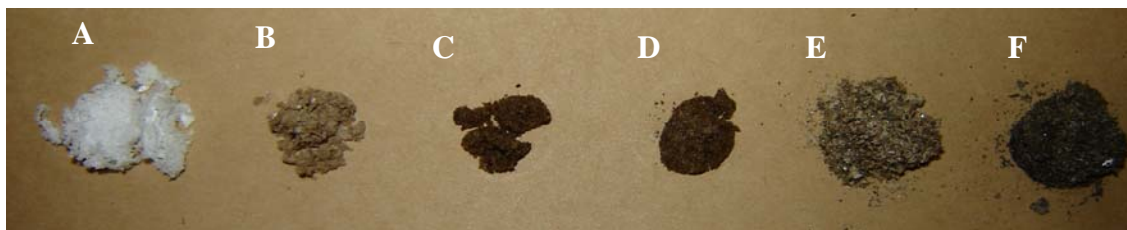
Para quantificar a volatilização da  $\text{NH}_3$  os ensaios foram realizados em um sistema coletor fechado dinâmico, constituído de câmaras de incubação (recipientes de vidro de 0,34  $\text{dm}^3$ ), conectadas a unidades coletoras da  $\text{NH}_3$  (erlenmeyers com 60 mL de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  200  $\text{g L}^{-1}$ ). O sistema recebeu um fluxo contínuo de aproximadamente 0,25  $\text{L min}^{-1}$  de ar, isento de  $\text{NH}_3$  e umedecido para promover a renovação da atmosfera nas câmaras e o arraste da  $\text{NH}_3$ .

Três dias antes de iniciar os ensaios o solo foi umedecido até a capacidade de campo com água deionizada e mantido nas condições do laboratório ( $25 \pm 2$  °C) para reativação da atividade microbiana. Adicionaram-se às câmaras de incubação 0,1  $\text{dm}^3$  do solo. Durante os ensaios a umidade do solo foi monitorada por meio da variação de peso das câmaras e, quando necessário injetou-se água através de um orifício lateral, vedado com septo de borracha.

### **Uréia com proporções crescentes de AH**

Avaliou-se neste ensaio a influência de proporções crescente dos AH misturados com a uréia. A uréia foi misturada com 5, 10, 25, 50 ou 100 % (p/p) de sua massa com o  $\text{AH}_{350}$  ou  $\text{AH}_{450}$ , além do tratamento controle com a uréia sem os AH. Para obter as misturas, alíquotas de 1,0 mL de uma solução de 22,2  $\text{g L}^{-1}$  de uréia (10  $\text{g L}^{-1}$  de N)

preparada em água ultrapura foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0, 1,1, 2,2, 5,5, 11,1 e 22,2 mg dos respectivos AH. Assim, cada tubo continha 10 mg de N. Os tubos foram agitados para homogeneizar as misturas e imediatamente congelados a -80 °C em ultra-freezer. As misturas congeladas foram então liofilizadas (Figura 1).



**Figura 1.** Uréia liofilizada pura (A), e misturada com 5 (B), 10 (C), 25 (D), 50 (E) e 100 % (F) de ácidos húmicos sintetizados de carvão de *Eucalyptus grandis* produzido com a temperatura final de carbonização de 350 °C (AH<sub>350</sub>).

As misturas liofilizadas foram aplicadas sobre a superfície do solo nas câmaras de incubação, correspondendo, portanto, à dose de 100 mg dm<sup>-3</sup> de N. Incluíram-se, ainda, um tratamento extra com a uréia perolada aplicada na dose de 100 mg dm<sup>-3</sup> de N, e câmaras com solo sem a aplicação de uréia que corresponderam ao branco. As câmaras foram fechadas, conectadas às unidades coletoras de NH<sub>3</sub> e se estabeleceu o fluxo de ar. A partir de então, foram realizadas amostragens a cada 24 h até 144 h acumuladas, e a cada 48 h até 240 h acumuladas.

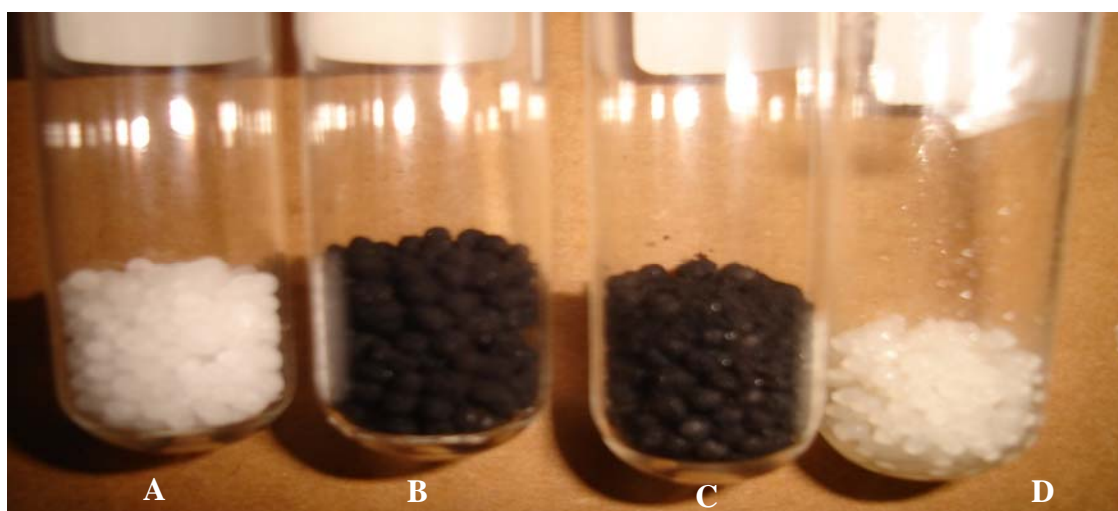
Em cada amostragem as unidades coletoras foram removidas e substituídas por outras. A NH<sub>3</sub> capturada foi quantificada por titulação potenciométrica, para pH 4,5 com solução de HCl 0,001 mol L<sup>-1</sup>, usando titulador automático (Mettler Toledo DL 15). A volatilização líquida, ou seja, advinda das uréias, foi obtida subtraindo-se a volatilização observada para o solo sem a adição de uréia.

As avaliações diárias de cada tratamento foram somadas resultando na volatilização total, assim, os tratamentos corresponderam a combinação fatorial (2 x 6) + 1, correspondendo a dois AH e seis proporções de AH (0, 5, 10, 25, 50 e 100 %), além da uréia perolada. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Além disso, os dados foram comparados pelos contrastes entre as misturas de uréia com AH<sub>350</sub> e AH<sub>450</sub>, entre as misturas de uréia com AH<sub>350</sub> e a uréia perolada e entre as misturas de uréia com AH<sub>450</sub> e a uréia perolada. Foram, também, ajustadas equações de regressão para a volatilização de NH<sub>3</sub> acumulada de acordo com o tempo, para caracterizar a cinética da volatilização.

## Uréia revestida com AH

Neste ensaio avaliou-se o revestimento da uréia perolada (Up) com o AH<sub>350</sub> (U-AH<sub>350</sub>) e AH<sub>450</sub> (U-AH<sub>450</sub>). A uréia perolada é a forma mais empregada na agricultura.

Para favorecer a aderência do AH aos grânulos da uréia aplicou-se óleo de soja, o mesmo utilizado na indústria de fertilizante, na proporção de 0,004 g g<sup>-1</sup> de uréia. A mistura foi realizada em tubos de ensaio que foram agitados por 15 min, suavemente para não ocorrer quebra dos grânulos. Logo após, a uréia untada foi transferida para novos tubos e adicionaram-se 0,25 g de AH, que correspondeu à máxima quantidade de AH capaz de se aderir à uréia (previamente determinada). Os tubos foram novamente agitados com cuidado por 15 min para possibilitar um revestimento homogêneo dos grãos de uréia. Produziu-se, também, a uréia revestida somente com o óleo de soja (U-óleo). As uréias peroladas sem e com revestimento (Figura 2) foram armazenadas em dessecador até o uso.



**Figura 2.** Uréia perolada (A), uréia perolada revestida com ácidos húmicos obtidos de carvão de *Eucalyptus grandis* produzido com temperatura final de carbonização de 350 °C U-AH<sub>350</sub> (B), e 450 °C U-AH<sub>450</sub> (C) e com óleo de soja (D).

Quantidades das uréias (Up, U-AH<sub>350</sub>, U-AH<sub>450</sub> e U-óleo) que proporcionaram 10 mg de N (dose de 100 mg dm<sup>-3</sup>) foram aplicadas na superfície do solo na câmara de incubação. Acrescentaram-se, ainda, câmaras contendo o solo sem a aplicação de uréia como controle. As câmaras foram imediatamente fechadas e conectadas às unidades coletoras de NH<sub>3</sub> e se estabeleceu o fluxo de ar.

O ensaio teve estrutura de parcela subdividida, em que as parcelas corresponderam às quatro uréias e as subparcelas corresponderam às oito amostragens no tempo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições.

O número e procedimento de amostragem, a dosagem da NH<sub>3</sub> capturada e o cálculo da volatilização líquida foram de acordo com a descrição anterior.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 %. Foram ajustadas equações de regressão para a volatilização de  $\text{NH}_3$  acumulada de acordo com o tempo, para caracterizar a cinética da volatilização.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Síntese e caracterização do ácido húmico produzido do carvão

O rendimento do carvão obtido na temperatura de carbonização de 350 °C foi de 495 g kg<sup>-1</sup>, enquanto que para a temperatura de 450 °C foi de 411 g kg<sup>-1</sup>. A maior temperatura proporcionou a volatilização mais intensa dos componentes da madeira, resultando no menor rendimento de carvão.

Na síntese de AH foi obtido rendimento de 257 g kg<sup>-1</sup> e 541 g kg<sup>-1</sup> para os carvões produzidos a 350 e 450 °C, respectivamente. Trompowsky et al. (2005) também obtiveram maiores quantidades de AH a partir de carvão produzido a 450 °C em comparação com o carvão produzido a 350 °C. A carbonização a 350 °C resultou, possivelmente, em um material com baixo grau de condensação policíclica, o que facilita sua degradação em pequenas moléculas pela oxidação ácida (Trompowsky et al. 2005), e que corresponderiam aos ácidos fúlvicos. Possivelmente essas moléculas foram extraídas na solubilização com o HNO<sub>3</sub>, uma vez que foi observado o filtrado mais escuro (dados não apresentados), e também menor quantidade de resíduo de carvão. Este resíduo de carvão, obtido em maior quantidade para o carvão produzido na temperatura de 450 °C, é o que resultaria no AH após a solubilização em NaOH. A maior temperatura de carbonização possivelmente proporcionou um material com maior grau de condensação policíclica, que resiste à oxidação nítrica (Trompowsky et al. 2005). Isso resultou na quebra da estrutura do carvão em moléculas grandes, explicando o maior rendimento de AH<sub>450</sub>.

Altos teores de C foram observados para os AH extraídos do carvão (Quadro 1), considerando que os AH extraído do solo apresentam entre 530 e 587 g kg<sup>-1</sup> de C (Canellas et al., 2008). No entanto, AH extraídos de solos ricos em C pirogênico, apresentaram de 570 a 630 g kg<sup>-1</sup> de C (Benites et al., 2005), que é típico de material vegetal alterado termicamente.

Os teores de H e N observados (Quadro 1) são comparáveis à média dos teores nos AH extraídos de solo (Canellas et al., 2008), enquanto o teor de O foi menor. O N observado na composição do AH é devido à sua incorporação na estrutura dos AH pelo ácido nítrico (Trompowsky et al. 2005).

As menores relações atômica H:C e O:C observadas para o AH<sub>450</sub>, indicam aumento de estruturas aromáticas ou de insaturação, o que está de acordo com o mecanismo de formação dos AH discutido anteriormente.

**Quadro 1:** Características químicas dos ácidos húmicos obtidos de carvão de eucalipto nas temperaturas de carbonização de 350 (AH<sub>350</sub>) e 450 °C (AH<sub>450</sub>)

Características	AH <sub>350</sub>	AH <sub>450</sub>
C (g kg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	629	672
H (g kg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	36,9	35,0
N (g kg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	31,4	32,2
O (g kg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	302	260
C:N	23,40	24,33
H:C	0,70	0,62
O:C	0,36	0,29
pH (água)	1,82	2,02
pH (CaCl <sub>2</sub> 0,005 mol L <sup>-1</sup> )	1,80	2,00
Abs 465 nm	1,075	0,989
Abs 665 nm	0,474	0,316
E4/E6 (465 nm/665 nm)	2,27	3,13
Grupos Carboxílicos (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	320	250
Grupos Fenólicos (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	120	80
CTC total <sup>2</sup> (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	440	330

<sup>1</sup>base seca sem cinzas, <sup>2</sup>acidez total.

Os valores da E4/E6 de 2,27 e 3,13 para o AH<sub>350</sub> e AH<sub>450</sub>, respectivamente, são inferiores aos apresentados na literatura para AH extraídos de solo, que geralmente variam entre 4,7 a 7,0 (Chen et al., 1977; Benites, 2002; Cereta et al., 2008). Pode-se inferir que quanto menor for a razão E4/E6 maior é o grau de humificação, ou seja, mais estável é o AH (Kononova, 1966). Deste modo, os AH extraídos de carvão apresentaram estabilidade maior, o que interessa para o presente propósito, pois uma decomposição acelerada diminuiria o tempo de sua esperada interação com os produtos da hidrólise da uréia.

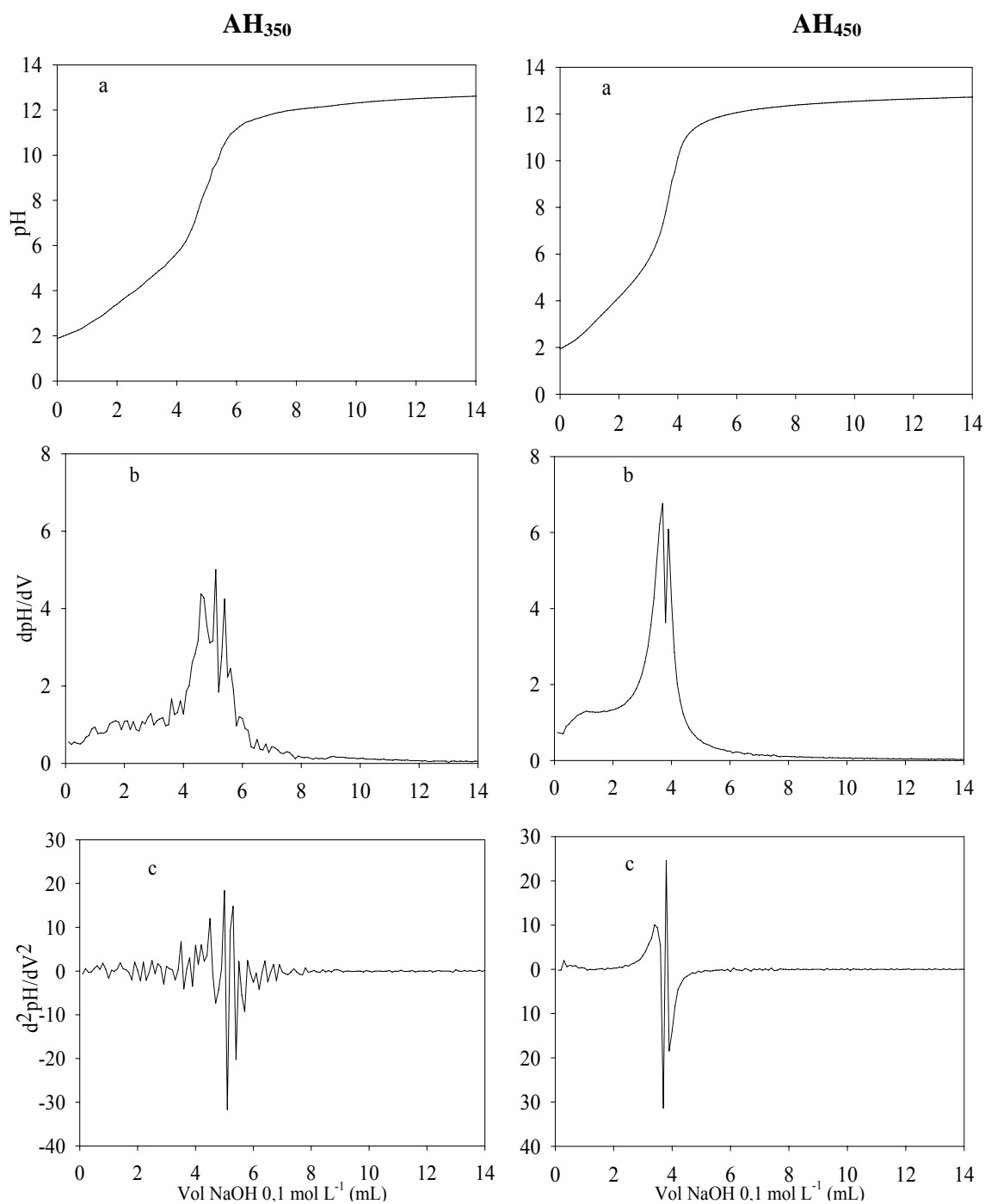
Os valores de pH (Quadro 1) evidenciam o caráter ácido dos AH. A acidez total (CTC) foi superior para o AH<sub>350</sub>, tanto pela maior presença de grupamentos carboxílicos, quanto de grupamentos fenólicos (quadro 1). Esta característica confere maior reatividade ao AH<sub>350</sub>. A CTC observada para os AH extraídos dos carvões é compatível com a CTC da matéria orgânica do solo (150 – 400 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>) (Novais & Mello, 2007), e, também, com a CTC de ácidos húmicos extraídos de 72 amostras de solo, que variou de 403,5 a 846,7 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>, (Fonseca, 2005). Esse mesmo autor

observou que, em média, 75 % da CTC dos ácidos húmicos eram atribuídas aos grupamentos carboxílicos. O mesmo foi observado para os AH extraídos do carvão, sendo que 72 e 75 % da CTC corresponderam aos grupos carboxílicos para o AH<sub>350</sub> e para o AH<sub>450</sub>, respectivamente.

Grupamentos carboxílicos e fenólicos são os sítios ionizáveis mais abundantes dos ácidos húmicos (Masini et al., 1998) e são eles que determinam o caráter ácido, a CTC e a capacidade tampão da acidez.

Na figura 3 observa-se a curva de titulação para os AH extraídos dos carvões e a respectiva primeira e segunda derivada. Os pontos em que a linha da segunda derivada atinge valor igual a zero caracterizam a ocorrência de grupos ácidos. A maior frequência desses pontos para o AH<sub>350</sub> evidencia sua maior acidez, e, conseqüentemente, maior CTC.

Trompowsky et al. (2005), com base na análise do espectro no infravermelho e da ressonância magnética nuclear do <sup>13</sup>C, observaram a presença de grupos carboxílicos e fenólicos, além de grupamentos funcionais contendo N, introduzidos pela reação com ácido nítrico.



**Figura 3:** Variação do pH das suspensões de AH obtidos de carvão de eucalipto nas temperaturas de carbonização de 350 (AH<sub>350</sub>) e 450 °C (AH<sub>450</sub>) de acordo com o volume de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, caracterizando as curvas de titulação (a) e as curvas de primeira (b) e segunda (c) derivadas das curvas de titulação.

### Atividade da Urease

O ensaio padrão foi definido com a concentração da enzima em 1,0 g L<sup>-1</sup> e o tempo para a reação de 12 minutos. As demais concentrações e o tempo superior a 15 minutos não apresentaram reação ou extrapolaram os limites da linearidade, uma vez que este limite, de estabelecer a concentração máxima de produto que pode ser acumulado antes que as respostas [produto] vs tempo e velocidade de hidrólise vs

[enzima] se tornem não lineares é essencial para os estudos de cinética enzimática (Segel, 1979).

A atividade obtida para a urease nos meios de reação contendo 5, 50, 250 e 500 mg L<sup>-1</sup> de AH<sub>350</sub> ou de AH<sub>450</sub> foram semelhantes a atividade obtida para o meio de reação controle (Quadro 2), ou seja, sem a presença do AH<sub>350</sub> ou do AH<sub>450</sub>. Deste modo, não foi observado efeito inibitório dos AH sob a urease. O ligeiro aumento da atividade para as doses crescente de AH provavelmente se deu durante o procedimento das análises, onde a determinação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para os meios de reação com AH se dava pouco após da determinação do meio controle (0 mg L<sup>-1</sup> de AH), resultando em alguns segundos a mais de atividade para a urease nos meios de reação com as doses de AH.

**Quadro 2.** Atividade relativa da urease *in vitro* e erro padrão da média, sendo o controle dado como 100 % da atividade, com a adição de diferentes quantidades de ácidos húmicos (AH) extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (AH<sub>450</sub>).

AH na reação enzimática mg L <sup>-1</sup>		Atividade relativa (%)
	<b>AH<sub>350</sub></b>	
0		100 ± 2,03
5		101 ± 1,81
50		109 ± 4,64
250		110 ± 4,27
500		110 ± 4,27
	<b>AH<sub>450</sub></b>	
0		100 ± 6,44
5		103 ± 8,69
50		104 ± 3,90
250		113 ± 3,91
500		115 ± 1,81

A inibição enzimática competitiva por um composto é determinada pela semelhança na sua estrutura química com o substrato, o que lhe possibilita interação com o centro ativo da enzima provocando alteração na atividade enzimática. Os AH não apresentam estrutura semelhante a da uréia, e são muito complexos estruturalmente, por isso, provavelmente, não promoveram inibição na atividade da urease. Esperar-se-ia, no entanto, que um ambiente mais ácido propiciado pelo AH afetaria a atividade da enzima, uma vez que a urease tem o pH ótimo para a máxima atividade entre 7 e 8. Isto não ocorreu porque a atividade enzimática *in vitro* foi avaliada em um meio tamponado em pH 7,4. Assim, espera-se que no solo poderá haver alteração na atividade da urease, principalmente nas primeiras horas. O tempo de 5 min de pré-incubação do AH com a enzima também pode ter influenciado para a não inibição. You & Zhou (2008)

avaliaram a capacidade de inibição de complexos de Cu, empregando pré-incubação de 1 h. Diante dessas considerações a ação inibidora dos AH obtidos de carvão vegetal sobre a urease deverá ser avaliada em outras condições, especialmente em períodos mais longos de tempo e no solo.

### **Ensaio de Volatilização de NH<sub>3</sub>**

#### **Uréia com proporções crescentes de AH**

As proporções crescentes de AH não diferenciaram significativamente a volatilização total de N-NH<sub>3</sub> da uréia (Quadro 3). No entanto, a uréia perolada obteve maior perda de N-NH<sub>3</sub> por volatilização do que os demais tratamentos, como pode ser observado nos contraste apresentados no Quadro 3, possivelmente porque os tratamentos com a uréia mistura com AH se apresentavam em pó, proporcionado pelo processo de liofilização. Isso não permitiu a aplicação concentrada desses tratamentos em um ponto do solo, como aconteceu para a uréia perolada, que concentrada em uma porção do solo, obteve perdas de NH<sub>3</sub> duas vezes maior que o tratamento controle (0 g kg<sup>-1</sup> de AH).

**Quadro 3** Quantidade total de N-NH<sub>3</sub> volatilizada e erro padrão da média em relação ao N aplicado (g kg<sup>-1</sup>) por meio da uréia perolada e uréia solubilizada e liofilizada sem (controle) e com diferentes proporções de ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (AH<sub>450</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>

Proporção de AH	N-NH <sub>3</sub> volatilizado
g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>
<b>AH<sub>350</sub></b>	
0	15,95 ± 0,88 a
50	18,41 ± 5,84 a
100	12,54 ± 1,92 a
250	9,55 ± 3,01 a
500	13,27 ± 7,13 a
1000	4,12 ± 1,36 a
Média	12,31 ± 4,38
<b>AH<sub>450</sub></b>	
0	17,12 ± 3,88 a
50	6,57 ± 2,41 a
100	8,42 ± 3,84 a
250	14,61 ± 7,33 a
500	11,16 ± 6,07 a
1000	8,75 ± 2,48 a
Média	11,11 ± 4,51
Uréia perolada <sup>1</sup>	31,73 ± 4,32
Contraste 1 = AH350 vs AH450	ns
Contraste 2 = AH350 vs Uréia perolada	***
Contraste 3 = AH450 vs Uréia perolada	***

Médias seguidas com mesma letra, dentro de cada tratamento com AH, não diferem significativamente a 5 % pelo teste de Tukey. <sup>1</sup>Tratamento extra com a aplicação dos grânulos de uréia sobre o solo. \*\*\* Significativo a 0,1 %.

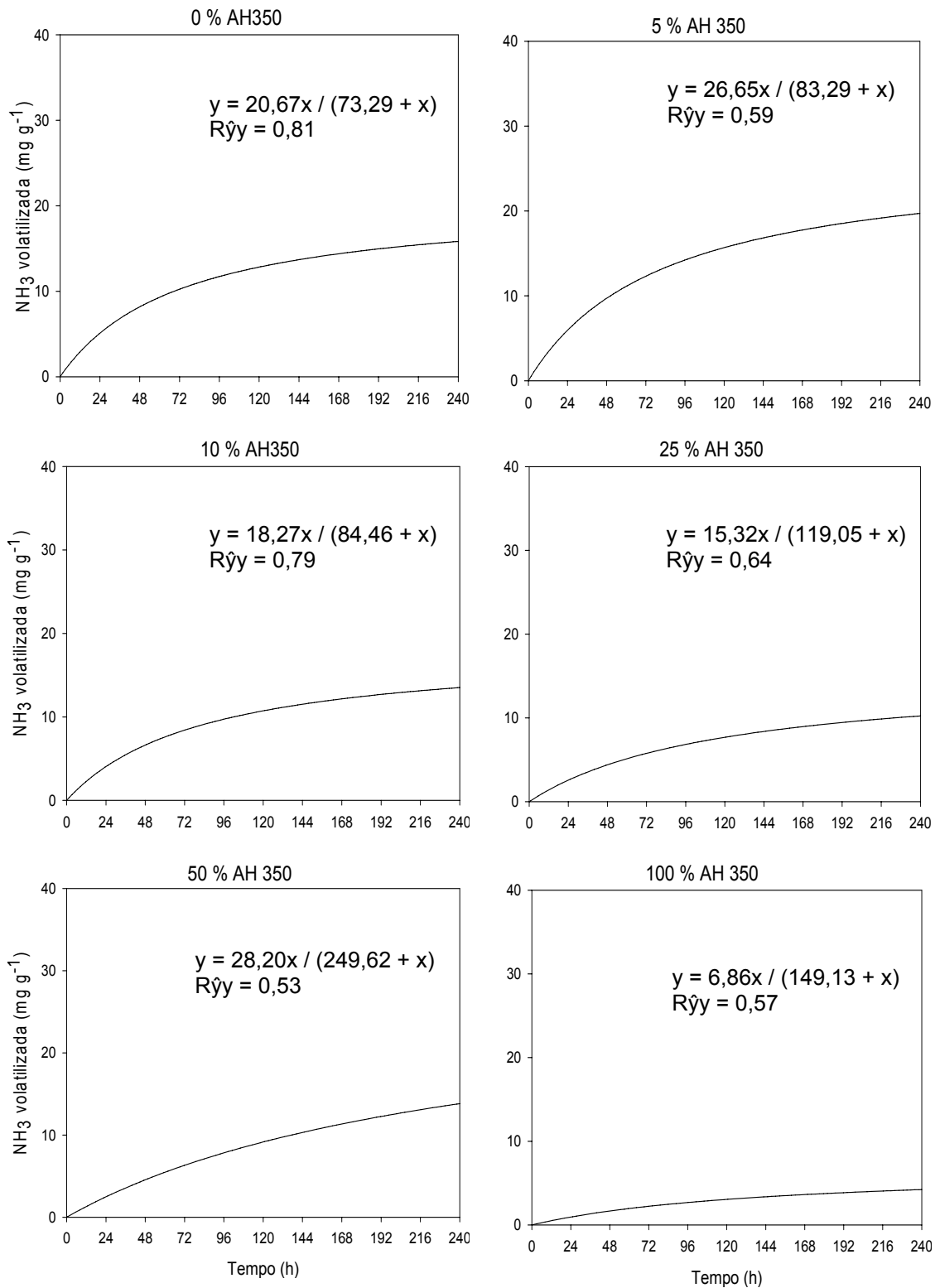
Apesar do efeito não significativo das doses de AH na volatilização total de N-NH<sub>3</sub>, a mistura dos AH com a uréia alterou a dinâmica de volatilização, como pode ser observado nas figuras 4 e 5, que traz equações de regressão ajustadas com os dados de volatilização acumulados no período de acordo com o modelo:  $aX/(b + X)$ , onde  $a$  é a estimativa da volatilização máxima acumulada e  $b$  é o tempo necessário para que ocorra

a metade da perda máxima acumulada ( $T_{0,5}$ ). Essa alteração na dinâmica da volatilização é evidenciada principalmente para as misturas de uréia com  $AH_{350}$  (Figura 4), onde ocorre aumento do  $T_{0,5}$  com o aumento das doses do  $AH_{350}$ , com exceção da dose de  $1000 \text{ g kg}^{-1}$ . Assim, maiores doses do  $AH_{350}$  proporcionou maior atraso no tempo necessário para que ocorra metade das perdas estimadas de  $N-NH_3$ . Apesar da dose de  $1000 \text{ g kg}^{-1}$  de  $AH_{350}$  não ter seguido essa tendência, ainda apresentou esse tempo relativamente alto e a menor perda de  $NH_3$  estimada.

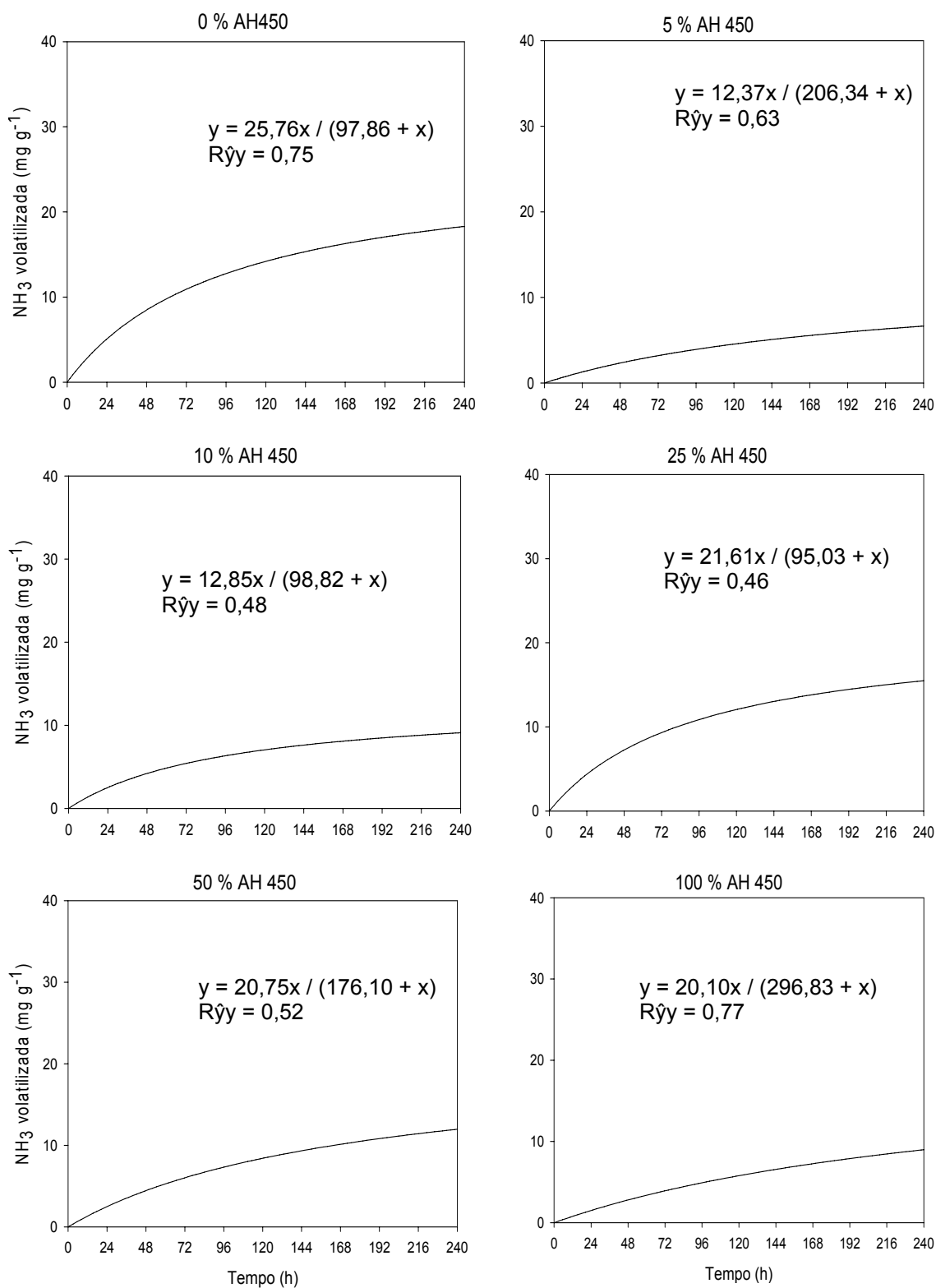
Essa alteração na dinâmica da volatilização não é evidente para as misturas de uréia com  $AH_{450}$  (Figura 5), uma vez que as doses de  $100$  e  $250 \text{ g kg}^{-1}$  de  $AH_{450}$ , apresentaram  $T_{0,5}$  próximos do tratamento controle ( $0 \text{ g kg}^{-1}$  de  $AH_{450}$ ), e o  $T_{0,5}$  para a menor dose de  $AH_{450}$ ,  $50 \text{ g kg}^{-1}$ , só não foi maior que o  $T_{0,5}$  estimado para a dose de  $1000 \text{ g kg}^{-1}$ .

Além de a uréia perolada ter apresentado maior perda de N por volatilização de  $NH_3$  (Quadro 2), o ajuste da cinética de volatilização demonstrou que para a uréia perolada o processo se dá de uma maneira mais intensa, uma vez que apresentou um  $T_{0,5}$  menor (Figura 6).

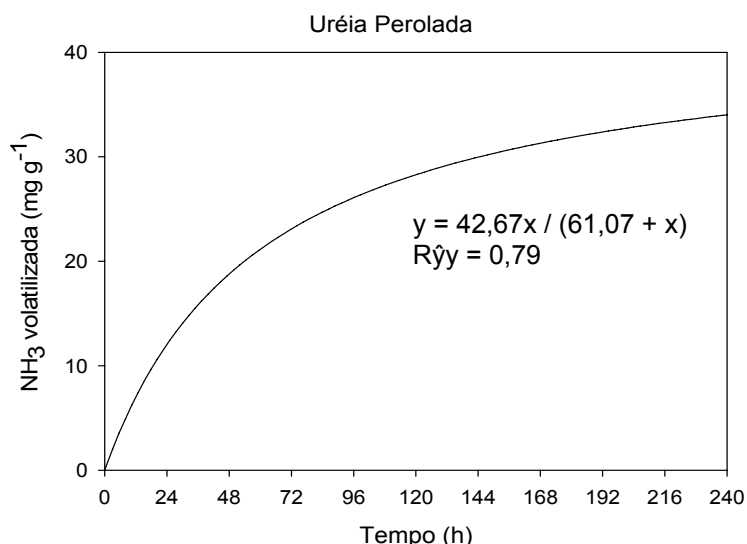




**Figura 4.** Teor acumulado de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação ao N aplicado da uréia solubilizada e liofilizada sem (controle) e com diferentes proporções de ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (AH<sub>350</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. O “R<sup>2</sup>” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.



**Figura 5.** Teor acumulado de  $\text{N-NH}_3$  volatilizado em relação ao N aplicado da uréia solubilizada e liofilizada sem (controle) e com diferentes proporções de ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a  $450\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\text{AH}_{450}$ ), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de  $\text{NH}_3$ . O “ $R^2$ ” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.



**Figura 6.** Teor acumulado de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação ao N aplicado da uréia perolada (tratamento adicional), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. O “R<sup>2</sup>” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.

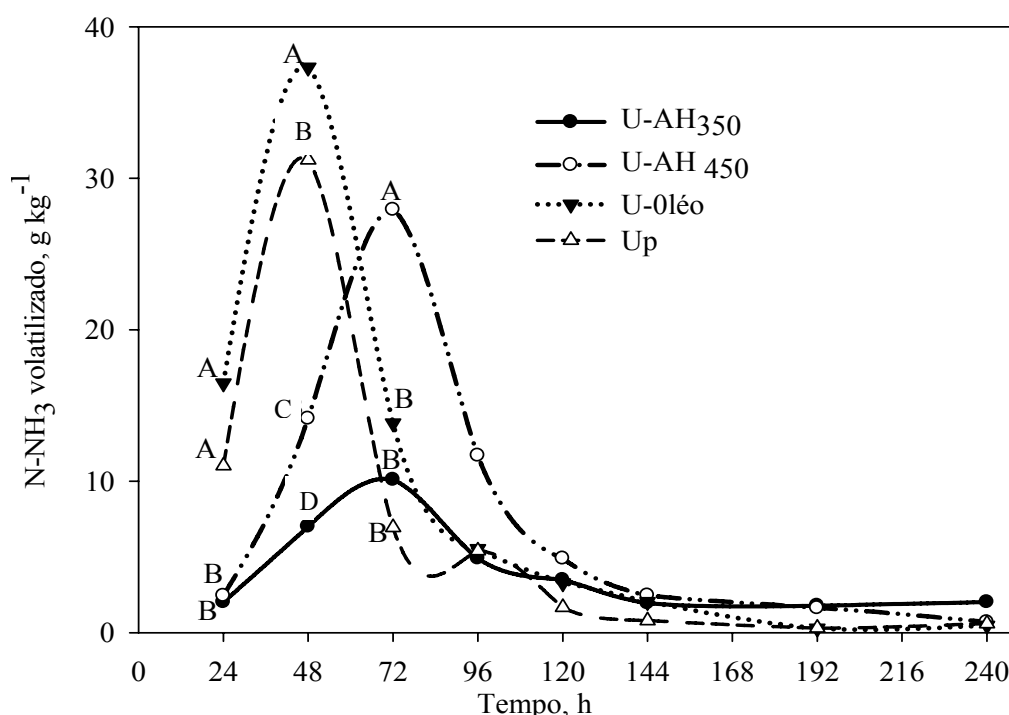
A grande variabilidade observada no ajuste dos modelos possivelmente se deu em função do material utilizado ter se apresentado em pó, como dito anteriormente, que pôde ter mascarado a influência dos AH na volatilização de NH<sub>3</sub>. O maior contato da uréia liofilizada com o solo proporcionou a rápida solubilização da uréia, e possivelmente a maior área de reação da uréia com o solo não favoreceu a elevação do pH que favoreceria a volatilização, além da provável maior adsorção do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> produzido. Isso explica a menor volatilização das uréias liofilizadas em relação aquela perolada, bem como o pequeno e inconsistente efeito das proporções de AH sobre a volatilização de NH<sub>3</sub>. Mas mesmo assim o AH<sub>350</sub> se mostrou com maior efeito que o AH<sub>450</sub> na volatilização de NH<sub>3</sub>, tomando-se que pode ser observado que as doses crescentes de AH<sub>350</sub> proporcionou a diminuição da volatilização total e o atraso mais evidentes do T<sub>0,5</sub> do que para o AH<sub>450</sub>.

### Uréia revestida com AH

A quantidade de AH e óleo adicionados para o revestimento dos grânulos da uréia (Figura 1) corresponderam, respectivamente, a 25 e 0,03 % de sua massa, o que resultou na redução no teor de N de 45 % para 36 %.

O revestimento da uréia perolada com os AH alterou as quantidades diárias de NH<sub>3</sub> volatilizada (Figura 7). Na primeira avaliação, às 24 h, as quantidades de N-NH<sub>3</sub> volatilizada para a U-AH<sub>350</sub> e U-AH<sub>450</sub>, foram significativamente menores que a da U<sub>p</sub> e U-óleo. Às 48 h depois de aplicada ao solo ocorreu a máxima volatilização da U-óleo

e da Up, sendo que a quantidade volatilizada da U-óleo foi significativamente maior do que aquela verificada para a Up, que teve perda de N-NH<sub>3</sub> significativamente maior que a U-AH<sub>450</sub> e a volatilização dessa foi significativamente maior do que a para a U-AH<sub>350</sub>. Mesmo no pico de volatilização das uréias revestidas com AH, às 72 h após aplicadas ao solo, a quantidade de N-NH<sub>3</sub> perdida da U-AH<sub>350</sub> foi significativamente menor do que a perda verificada para a U-AH<sub>450</sub>. Já a volatilização acumulada em 240 h da U-AH<sub>350</sub> foi significativamente menor do que a que ocorreu a partir da U-óleo, da U-AH<sub>450</sub> e da Up (Quadro 4).



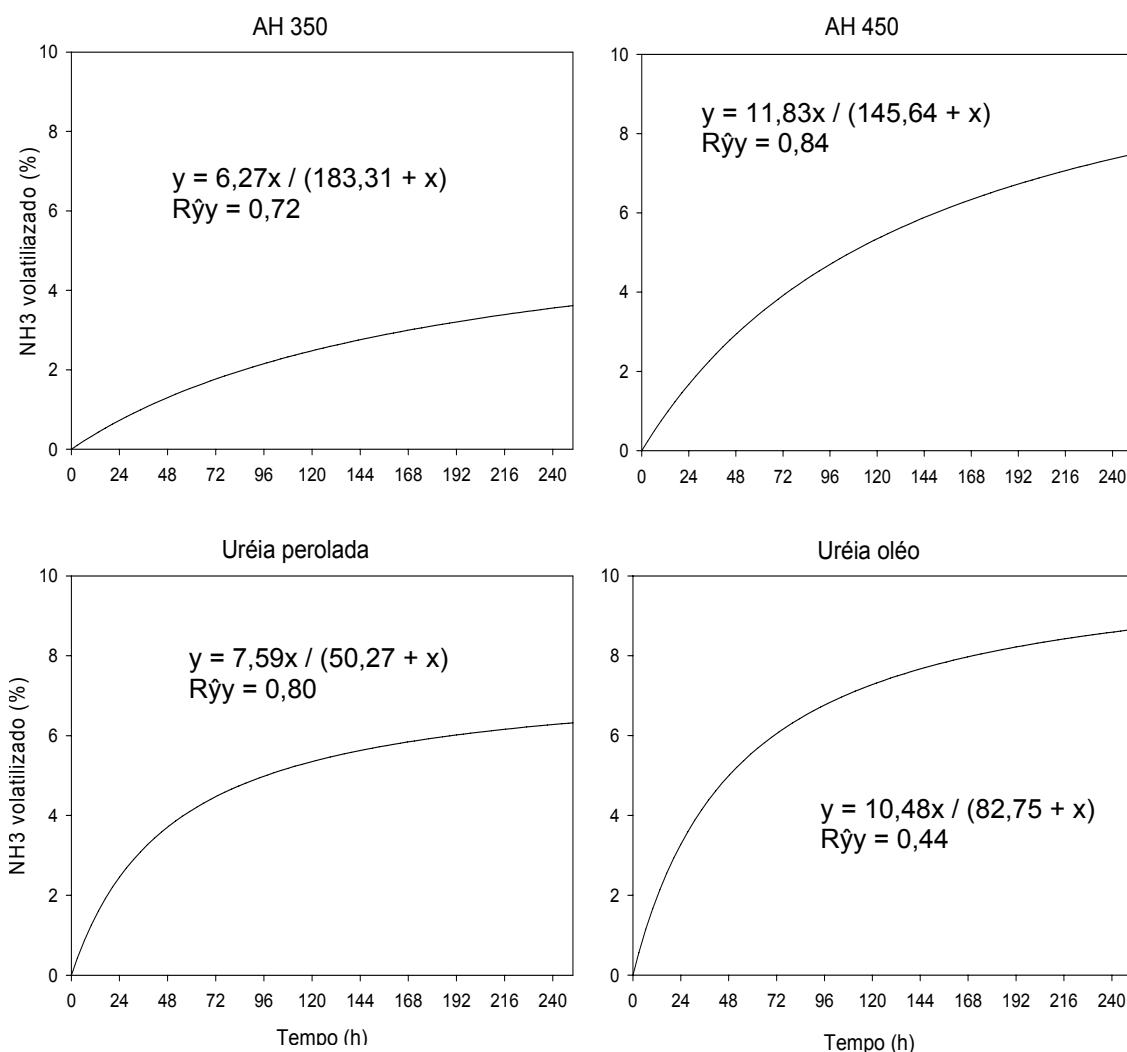
**Figura 7.** Teores de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação à dose de N aplicada (g kg<sup>-1</sup>) ao solo por meio da uréia perolada (Up) e uréia revestida com óleo vegetal (U-óleo) e com ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (U-AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (U-AH<sub>450</sub>), em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. Dentro de cada tempo letras diferente indicam diferenças significativas entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5 %.

**Quadro 4** Quantidade total de N-NH<sub>3</sub> volatilizada e erro padrão da média em relação ao N aplicado (g kg<sup>-1</sup>) por meio da uréia perolada, e uréia revestida com óleo vegetal (U-óleo) e com ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (U-AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (U-AH<sub>450</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>

Tratamento	N-NH <sub>3</sub> volatilizado g kg <sup>-1</sup> de N-NH <sub>3</sub>
Uréia perolada	57,90 ± 5,08 b
Uréia-óleo	79,19 ± 20,77 b
Uréia-AH <sub>350</sub>	33,25 ± 4,66 a
Uréia-AH <sub>450</sub>	65,84 ± 7,74 b

Médias seguidas com mesma letra não diferem significativamente a 10 % pelo teste de Tukey.

Na figura 8, que caracteriza a cinética de volatilização, observa-se que houve alteração da dinâmica de volatilização com o atraso do T<sub>0,5</sub> para a U-AH<sub>350</sub> e U-AH<sub>450</sub>. Possivelmente isso se deu pela solubilização mais lenta da uréia recoberta com os AH, alterando sua dinâmica no solo e ocasionando perdas de NH<sub>3</sub> mais lenta. A uréia revestida com o AH<sub>350</sub> foi a que proporcionou a menor quantidade total de NH<sub>3</sub> volatilizada, refletindo um possível efeito maior em relação ao AH<sub>450</sub>.



**Figura 8.** Percentagem acumulada de N-NH<sub>3</sub> volatilizado em relação ao N aplicado como uréia perolada (Up) e uréia revestida com óleo vegetal (U-óleo), com ácidos húmicos extraídos de carvão de eucalipto produzido a 350 °C (U-AH<sub>350</sub>) e a 450 °C (U-AH<sub>450</sub>), durante 240 h, em um sistema fechado e dinâmico de captura de NH<sub>3</sub>. O “R<sup>2</sup>” corresponde à correlação entre os dados observados e os estimados pelas equações.

A menor perda de N-NH<sub>3</sub> 24 h depois de aplicada ao solo e o atraso no T<sub>0,5</sub> das uréias revestidas pelos AH, provavelmente, se deu pela solubilização mais lenta da uréia, decorrente do caráter hidrofóbico de algumas regiões dos AH (Canellas, 2008) e da própria barreira física. Foi observado, de fato, que a uréia recoberta com os AH persistia visível no solo até 10 h após a aplicação (dados não apresentados). A uréia sem o revestimento desapareceu após 3 h de aplicada. Com a solubilização mais lenta, possivelmente as reações da uréia com o solo sofreriam certa limitação.

O atraso do T<sub>0,5</sub> é interessante do ponto de vista agrônomo, pois se aumenta a chance que ocorram chuvas após a aplicação da uréia o que favoreceria o transporte da uréia no solo.

O número de dias da aplicação da uréia até a ocorrência de chuva é importante para determinar a volatilização. Fox et al. (1986) observaram perdas maiores que 30% de  $\text{NH}_3$  quando uma precipitação de 10 mm aconteceu de cinco a sete dias após a aplicação da uréia. Essa perda foi bem menor quando a mesma precipitação ocorreu dentro de dois a três dias após a aplicação da uréia.

A menor volatilização de  $\text{NH}_3$  da uréia revestida com o  $\text{AH}_{350}$  e seu efeito mais evidente quando utilizado em doses crescentes, provavelmente se deu por este apresentar um pH menor e uma CTC maior que o  $\text{AH}_{450}$ . Além disso, a faixa mais ampla de dissociação dos grupamentos funcionais, principalmente carboxílicos (Figura 3), confere ao  $\text{AH}_{350}$  maior poder tampão, que provavelmente limitou a elevação do pH devido a hidrólise da uréia, o que, além de ter limitado a atividade inicial da urease, criou condição favorável para formação e adsorção do  $\text{NH}_4^+$ . A maior CTC de solos argilosos foi considerada como responsável pela menor volatilização de  $\text{NH}_3$  observada em relação a solos arenosos (Al-Kanani et al., 1991; Silva et al., 1995).

A possível liberação mais lenta da uréia para as reações com o solo, que também refletiria em uma disponibilização mais lenta do  $\text{NH}_4^+$  é interessante do ponto de vista agrônomo, uma vez que poderia colaborar para aumentar a eficiência da uréia. Além de um acesso em maior prazo pelas raízes ao nutriente, o  $\text{NH}_4^+$  estaria menos sujeito a outras transformações de perdas além da volatilização de  $\text{NH}_3$ , como a nitrificação que favoreceria a lixiviação do  $\text{NO}_3^-$  e a desnitrificação desse último.

## CONCLUSÕES

- O AH obtido de carvão produzido na temperatura final de carbonização de 350 °C possui maior acidez e CTC que o AH obtido de carvão produzido na temperatura final de carbonização de 450 °C.
- A atividade da urease *in vitro* não é alterada diretamente pelos AH, com o período de pré-incubação de 5 minutos.
- O recobrimento do grânulo de uréia com os AH retarda o início e o pico máximo de volatilização de NH<sub>3</sub>.
- O recobrimento do grânulo de uréia com os AH promove a liberação mais lenta do N.
- O AH obtido de carvão produzido na temperatura final de carbonização de 350 °C é capaz de diminuir a volatilização de NH<sub>3</sub> da uréia e seu pico máximo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, O.H., AMINUDDIN, H. & HUSNI, M.H.A. Reducing ammonia loss from urea and improving soil-exchangeable ammonium retention through mixing triple superphosphate, humic acid and zeolite. *Soil Use and Management*, 2006, 22, 315–319.
- AKGOL, S., YALÇINKAYA, Y., BAYRAMOĞLU, G., DENIZLI, A. & ARICA, M.Y. Reversible immobilization of urease onto Procion Brown MX-5BR-Ni(II) attached polyamide hollow-fibre membranes. *Process Biochemistry*, 38:675-683, 2002.
- AL-KANANI, T.; MACKENZIE, A.P.; BARTHAKUR, N.N. Soil water and ammonia volatilization relationships with surface-applied nitrogen fertilizer solutions. *Soil Science Society American Journal*, Madison, v.55, p.1761-1766, 1991.
- BARHOUMI, H., MAAREF, A., RAMMAH, M. MARTELET, C. JAFFREZIC, N. MOUSTY, C. VIAL, S. FORANO, C. Urea biosensor based on Zn 3Al-Urease layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures. *Materials Science and Engineering C*, 26:328-333, 2006.
- BENITES, V.M. Caracterização de solos e de substâncias húmicas em áreas de vegetação rupestre de altitude. Viçosa, MG: UFV, 2001. 74p. Tese (Doutorado em Solos)-Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- BENITES, V.M.; MENDONÇA, E. DE S.; SCHAEFER, C.E.G.R.; NOVOTNY, E.H.; REIS, E.L.; KER, J.C. Properties of black soil humic acids from high altitude rocky complexes in Brazil. *Geoderma*, v. 127, p. 104-113, 2005.
- BOWLES, E.C.; ANTWEILER, R.C.; MACCARTHY, P. Acid-base titration and hydrolysis of Suwannee River fulvic acid. P. 205-230. In: AVERETT, R.C. (Ed) *Humic substances in the Suwannee River, Geórgia; Interactions, properties, and proposed structures*. U.S. Geol. Surv. Open File Rep. no. 87-557. U.S. Geol. Surv., Denver, CO.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas. Disponível em:<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do>

BREMNER, J.M. & AHMAD, N. Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. *Nitrogen Economy in Tropical Soils*, 42:321-329, 1995.

BREMNER, J.M. & MULVANEY, C.S. Urease activity in soil. In: BURNS, R.G. (Ed) *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp. 149-196, 1978.

CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; RUMJANEK, V.M.; SANTOS, G.A. Métodos complementares. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). *Fundamentos da material orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais*. 2.ed. rev. e atual. – Porto Alegre: Metropole, 2008. p. 277-290.

CANTARELLA, H.; MATTOS JR. D.; QUAGGIO, J.A. & RIGOLIN, A.T. Fruit yield of Valencia sweet orange fertilized with different N sources and the loss of applied N. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 67:215-223, 2003.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F., FONTES, R.L.F., CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., (Eds). *Fertilidade do Solo*. Viçosa, MG, SBCS, 2007. p. 375-470.

CERETA, C.A.; BAYER, C.; DICK, D.P.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A. Métodos espectroscópicos. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). *Fundamentos da material orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais*. 2.ed. rev. e atual. – Porto Alegre: Metropole, 2008. p. 277-290.

CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41: 352-358, 1977.

- CORSI, M. Uréia como fertilizante na produção de forragem. In: Peixoto, A.M.; Moura, J.C. de; Faria, V.P. de eds. Uréia fertilizante. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1994. p.239-267.
- FENILLI, T.A.B. Destino do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) do fertilizante em uma cultura de café. 2006. 92p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - ESALQ-USP, Piracicaba,SP, 2006.
- FERGUSON, G.A. & PEPPER, I.L. 1987. Ammonium retention in sand amended with clinoptilolite. *Soil Science Society of America Journal*, 51, 231–234.
- FONSECA, R.A.D. Caracterização potenciométrica de ácidos húmicos utilizando análise das componentes principais. Viçosa, MG: UFV, 2005. 74p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- FOX, R.H.; KERN, J.M. & PIEKIELEK, W.P. Nitrogen fertilizer source and method and time of application effects on no-till corn yields and N uptake. *Agron. J.*, 78:741-746, 1986.
- FRENEY, J.R. AND BLACK, A.S. Importance of ammonia volatilization as a loss process. In: Wilson, J.R. (Ed). *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*. CAB International, Wallingford, pp. 156-173. 1988.
- FRENEY, J.R.; DENMEAD, O.T.; WOOD, A.W.; SAFFIGNA, P.G. Ammonia loss following urea addition to sugar cane trash blankets. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.*, 16:114-121, 1994.
- GARCÍA-SERNA, J.; JUÁREZ, M.; JORDÁ, J.; SÁNCHEZ-ANDRÉU, J. Influence of Organic Compounds on Nitrogen-Fertilizer Solubilization. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 27(11&12), 2485-2491, 1996.
- GRAYBILL, F.A. *Theory and application of the linear model*. Belmont, Duxbury Press, 1976. 704p.

- HARGROVE, W.L. Soil, environmental, and management factors influencing ammonia volatilization under field conditions. In: BOCK, B.R. & KISSEL, D.E., (Ed). Ammonia volatilization from urea fertilizers. Muscle Shoals, National Fert. Develop. Center. Tennessee Valley Authority, p.17-36, 1988.
- HAUMAIER, L., ZECH, W. Black carbon – possible source of highly aromatic components of soil humic acids. *Organic Geochemistry* 23:191–196, 1995.
- HE, Z.L.; CALVERT, D.V.; ALVA, A. K.; LI, Y. C.; BANKS, D. J.. Clinoptilolite zeolite and cellulose amendments to reduce ammonia volatilization in a calcareous sandy soil. *Plant and Soil*, 247:253-260, 2002.
- HOUSSAIN, KAZI-Z., MONREAL, C.M., SAYARI, A. Adsorption of urease on PE-MCM-41 and its catalytic effect on hydrolysis of urea. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 62:42-50, 2008.
- INBAR, Y.; CHEN, Y.; & HADAR, Y. Humic Substances formed during the composting of organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54:1316-1323, 1990.
- KIBARER, G.D. & AKOVALI, G. Optimization studies on the features of an activated charcoal-supported urease system urease system. *Biomaterials* 17:1473-1479, 1996.
- KISSEL, D.E.; CABRERA, M.L. & FERGUSON, R.B. Reactions of ammonia and urea hydrolysis products with soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52:1793-1796, 1988.
- KONONOVA, M.M. *Soil organic matter*. Oxford: Pergamon Press, 450 p. 1966.
- KUMADA, K. Carbonaceous materials as a possible source of soil humus. *Soil Science and Plant Nutrition* 29 (3), 383–386. 1983.
- LARA-CABEZAS, W.A.R.; KORNDORFER, G.H.; MOTTA, S.A. Volatilização de nitrogênio da amônia na cultura de milho: I. Efeito da irrigação e substituição parcial da uréia por sulfato de amônio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.21, n.3, p.481-487, 1997.

- LARA CABEZAS, W. A. R. et al. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluída de cobertura na cultura do milho, em sistema de plantio direto no triângulo mineiro (MG). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.24, p.363-376, 2000.
- LIANG, Z., WANG, C., TONG, Z., YE, W., YE, S. Bio-catalytic nanoparticles with urease immobilized in multilayer assembled through layer-by-layer technique. *Reactive & Functional Polymers* 63:85–94, 2005.
- LIGHTNER, J.W.; MENGEL, D.B.; RHYKERD, C.L. Ammonia Volatilization from Nitrogen Fertilizer Surface Applied to Orchardgrass Sod. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.54, p.1478-1482, 1990.
- LINDSAY, WILLARD LYMAN. *Chemical equilibria in soils*. John Wiley & Sons, New York. 1979. 423p.
- LOPES, A.S.; BASTOS, A.R.R.; DAHER, E. Fertilizantes Nitrogenados no Brasil: Um problema de escassez. *International Plant Nutrition Institute – Brasil*. 2007. (Informações Agronômicas, 120)
- MANUNZA, B.; GESSA, C.; DEIANA. S. & RAUSA, R. A normal distribution model for the titration curves of humic acids. *Journal of Soil Science*, 43: 127-131, 1992.
- MASINI, J.C.; ABATE, G.; LIMA, E.C.; HAHN, L.C.; NAKAMURA, M.S.; LICHTIG, J.; NAGATOMY, H.R. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic in humic acids. *Analytica Chimica Acta*, 364:223-233, 1998.
- MATTLA, P.K. Ammonia volatilization from cattle slurry applied to grassland as affected by slurry treatment and application technique – first year results. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 51: 47–50, 1998.
- MENGEL, D. Manejo de nutrientes na cultura do milho de alta produtividade. Piracicaba: Potafôs, 1996. 16p. (Informações Agronômicas, 73).

- MONTE, M.B.M.; RESENDE, N.G.A.M. Zeolitas Naturais. In: Lins, F.F.; Luz, A.B. Rochas e Minerais Industriais. Cetem. p.699-720. 2005.
- NOVAIS, R.F. & MELLO, J.W.V. Relação solo-planta. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F., FONTES, R.L.F., CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., (Eds). Fertilidade do Solo. Viçosa, MG, SBCS, 2007. p.275-374.
- OLIVEIRA, M.W.; TRIVELIN, P.C.O.; BOARETTO, A.E.; MURAOKA, T. & MORTATI, J. Leaching of nitrogen, potassium, calcium and magnesium in a sandy soil cultivated with sugarcane. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37:861-868, 2002.
- OUYANG, D.; MACKENZIE, A.F.; FAN, M. Phytotoxicity of banded urea amended with triple superphosphate and potassium choride. *Agronomy Journal, Madison*, v.90, p.734-739, 1998.
- PRAMMANEE, P.; SAFFIGNA, P.G.; WOOD, A.W. & FRENEY, J.R. Loss of nitrogen from urea and ammonium sulphate applied to sugar cane crop residues. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.*, 11:76-84, 1989.
- REGAZZI, A.J. Teste para verificar a identidade de modelos de regressão e a igualdade de parâmetros no caso de dados de delineamento experimentais. *Revista Ceres*, 46:383-409. 1999.
- RODRIGUES, M.B.; KIEHL, J.C. Volatilização de amônia após o emprego de uréia em diferentes doses e modos de aplicação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.10, n.1, p.37-43, 1986.
- SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; LECH, V.A.; RAMPAZZO, C. Volatilização de N-NH<sub>3</sub> em decorrência da forma de aplicação de uréia, manejo de resíduos e tipo de solo, em laboratório. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.33, n.4, p.687-692, jul-ago, 2003.
- SEGEL, I.H. *Bioquímica. Teoria e Problemas*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 527p, 1979.

- SENGIK, E. & KIEHL, J.C. Controle da volatilização de amônia em terra tratada com uréia e turfa pelo emprego de sais inorgânicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 19:455-461, 1995a.
- SENGIK, E. & KIEHL, J.C. Efeito de resíduos orgânicos e do fosfato monocálcico na volatilização de amônia em terra tratada com uréia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 19:321-426, 1995b.
- SILVA, I.R. & MENDONÇA, E.S. Matéria Orgânica do Solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F., FONTES, R.L.F., CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., (Eds). *Fertilidade do Solo*. Viçosa, MG, SBCS, 2007. p.275-374.
- SILVA, A. J. da et al. Perdas de amônia por volatilização proveniente da uréia aplicada a solos dos trópicos úmidos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.19, p.141-144, 1995.
- SIVA, K.B., AMINUDDIN, H., HUSNI, M.H.A. & MANAS, A.R. Ammonia volatilization from urea as affected by tropical-based palm oil palm effluent (pome) and peat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30, 785–804, 1999.
- SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: Sparks, D.L., ed. *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*. Soil Sci. Soc. Am. Book Series: 5. Soil Sci. Soc. Am. Madison, 1996. p. 1018-1020.
- TERMAN, G.L. Volatilization losses of nitrogen as ammonia from surface-applied fertilizers, organic amendments, and crop residues. *Adv. Agron.*, 31:189-223, 1979.
- TROMPOWSKY, P.M.; BENITES, V.M.; MADARI, B.E.; PIMENTA, A.S.; HOCKADAY, W.C.; HATCHER, P.G. Characterization of humic like substances obtained by chemical oxidation of eucalyptus charcoal. *Organic Geochemistry* 36:1480–1489, 2005.

YOU, ZHONG-LU; ZHOU, PEN. Synthesis, characterization and crystal structures of a pair of azido-bridged polynuclear Schiff base copper(II) complexes with urease inhibitory activity. *Transition Met. Chem.* 33:453-457, 2008.

WEIL, R.R.; MAGDOFF, F. Significance of Soil Organic Matter to Soil Quality and Health. In: Magdoff, F. and Weil, R.R. *Soil organic matter in sustainable agriculture*. CRC Press. 2004. p.1-44.

WITEE, CLAUS-PETER & MEDINA-ESCOBAR, N. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry*, 290: 102-107, 2001.



## APÊNDICE

Quadro 1A: Análise de variância pelo delineamento inteiramente casualizado da atividade da urease *in vitro* em meio de reação com doses crescentes de AH<sub>350</sub>.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
TRAT	4	78,58ns
Resíduo	10	29,11
TOTAL	14	

ns: não significativo.

Quadro 2A: Análise de variância pelo delineamento inteiramente casualizado da atividade da urease *in vitro* em meio de reação com doses crescentes de AH<sub>450</sub>.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
TRAT	4	137,53ns
RESÍDUO	10	90,73
TOTAL	14	

ns: não significativo.

Quadro 3A: Análise de variância pelo delineamento inteiramente casualizado da volatilização total de NH<sub>3</sub> da mistura de uréia com doses crescentes de AH<sub>350</sub> ou AH<sub>450</sub>.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
TRAT	12	145,54*
AH	1	12,90ns
DOSE	5	64,34ns
AH X DOSE	5	60,40ns
Adicional vs Fatorial	1	1109,88**
Contraste 1	1	12,90ns
Contraste 2	1	969,89**
Contraste 3	1	1093,15**
RESÍDUO	26	58,01
TOTAL	38	

ns; \*, \*\*: não significativo; significativo a 5 e 1 % respectivamente.

Quadro 4A: Análise de variância pelo delineamento inteiramente casualizado da volatilização diária de NH<sub>3</sub> para o recobrimento dos grânulos de uréia com o AH<sub>350</sub> ou AH<sub>450</sub>.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
TRAT	3	233,14*
ERRO (A)	16	84,19
AVA	7	1171,33**
TRAT x AVA	21	217,12**
RESÍDUO	112	23,01
TOTAL	159	

\*, \*\*: significativo a 5 e 1 % respectivamente.

Quadro 5A: Análise de variância pelo delineamento inteiramente casualizado da volatilização total de  $\text{NH}_3$  para o recobrimento dos grânulos de uréia com o  $\text{AH}_{350}$  ou  $\text{AH}_{450}$ .

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
TRAT	3	1865,00°
RESÍDUO	16	673,53
TOTAL	19	

°: significativo a 10%.

Abaixo é descrito a metodologia utilizada nesse trabalho para obtenção de ácido húmico de carvão vegetal.

Metodologia para extração do ácido húmico de carvão vegetal:

- 1 – Passar o carvão em peneira de 200 mesh e seca-lo a 105 °C por 12 h
- 2 – Pesar 4,5 g do carvão seco e coloca-lo no balão soster (250 mL)
- 3 – Adicionar 112 g de HNO<sub>3</sub> 250 g kg<sup>-1</sup> no balão
- 4 – Aquecer a mistura até a ebulição e manter sobre refluxo por 4 h
- 5 – Repousar por 12 h
- 6 – Filtrar a mistura em um sistema de filtragem a vácuo, utilizando membrana de 0,45 µm
- 7 – Filtrado (AF 1): descartar ou armazenar
- 8 – Solubilizar o material retido no filtro em 800 mL de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, passar a solução para tubos de centrífuga e repousar por cerca de 12 h
- 9 – Centrifugar a 4000 rpm por 30 minutos
- 10 – Filtrar o sobrenadante em um sistema de filtragem a vácuo, utilizando membrana de 0,45 µm
- 11 – Ajustar o pH do filtrado para próximo de 2,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 300 ml L<sup>-1</sup> (v / v)
- 12 – Passar a mistura para tubos de centrífuga e repousar por cerca de 12 h
- 13 – Centrifugar a 4000 rpm por 30 minutos
- 14 – Filtrar o sobrenadante em um sistema de filtragem a vácuo, utilizando membrana de 0,45 µm
- 15 - Filtrado (AF 2): descartar ou armazenar
- 16 – Juntar o que ficou retido no filtro (15) com o precipitado no tubo (14) e ressolubilizar em 500 mL de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>
- 17 – Repousar a solução por 4 h
- 18 – Acidificar a solução para pH próximo de 2,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 300 ml L<sup>-1</sup>
- 19 – Passar a mistura para tubos de centrífuga e repousar por cerca de 12 h
- 20 – Centrifugar a 4000 rpm por 30 minutos
- 21 – Descartar o sobrenadante e transferir o precipitado (AH) para sacolas de celofane para diálise
- 22 – Após a diálise, passar o AH para recipiente de vidro e secar o material em estufa de circulação forçada a 60 °C

A metodologia utilizada para obtenção de ácido húmico de carvão vegetal é demorada e certamente apresentaria custo elevado para obtenção em maiores

quantidades. No entanto, abaixo é apresentada metodologia alternativa, que são eliminados alguns procedimentos para facilitar a obtenção do ácido húmico.

Metodologia alternativa para extração do ácido húmico de carvão vegetal:

- 1 – Passar o carvão em peneira de 200 mesh e seca-lo a 105 °C por 12 h
- 2 – Pesar 4,5 g do carvão seco e coloca-lo no balão soster (250 mL)
- 3 – Adicionar 112 g de HNO<sub>3</sub> 250 g kg<sup>-1</sup> no balão
- 4 – Aquecer a mistura até a ebulição e manter sobre refluxo por 4 h
- 5 – Centrifugar a mistura a 4000 rpm por 15 minutos
- 6 – Descartar o sobrenadante
- 7 – Adicionar água destilada aos tubos de centrífuga para lavar o resíduo, cetrifugar novamente e descartar o sobrenadante
- 8 – Solubilizar o material precipitado em NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, repousar por cerca de 12 h
- 9 – Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos e filtrar o sobrenadante
- 9 – Acidificar a solução para pH próximo de 2,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 300 ml L<sup>-1</sup>
- 10 – Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos
- 11 – Descartar o sobrenadante
- 12 – Passar o precipitado (AH) para recipiente de vidro, e secar o material em estufa de circulação forçada a 60 °C
- 14 – Armazenar o AH em dessecador.

A diálise é uma etapa que demandaria tempo e provavelmente oneraria o procedimento para obtenção dos ácidos húmicos do carvão vegetal. Talvez para a finalidade proposta neste trabalho a diálise não seja importante, sendo necessário verificar que níveis de íons, como o Na, permaneceria no produto, e a consequência de seu uso. Se existir o impedimento do uso, uma lavagem como descrito no passo sete pode ser suficiente.

Abaixo é descrito o método do hipoclorito-fenol (Witte & Medina-Escobar, 2000), utilizado para determinar  $\text{NH}_4^+$  da atividade da urease.

### **Reagentes**

#### **Solução A**

Dissolver 7 g de fenol e 0,034 g de nitroprussiato de sódio em 80 mL de água deionizada e completar para 100 mL.

Estocar em recipiente protegido da luz e armazenado a 4 °C.

#### **Solução B**

Solubilizar 2,96 g de NaOH em 140 mL de água deionizada, adicionar 29,74 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  até completa solubilização. Após, adicionar 40 mL de NaOCl 5 %, ajustar o pH para 12 com NaOH e completar o volume 200 mL com água deionizada.

Estocar em recipiente protegido da luz na temperatura ambiente.

### **Determinação**

De cada reação, pipetar 20  $\mu\text{L}$  para novo tubo contendo 0,98 mL de água deionizada, e adicionar 0,1 mL do reagente A, seguido de 0,2 mL do reagente B. Após a adição do reagente B, os tubos devem ser imediatamente fechados para evitar perdas de amônia. Verter várias vezes os tubos para misturar os reagentes e incubar a 50 °C por 30 minutos para o desenvolvimento da cor.

A curva padrão é feita a partir de estoque de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Após pipetado a quantidade necessária do estoque para preparação da curva, adicionar em cada tubo 20  $\mu\text{L}$  de mistura de reação, preparada com exceção da enzima, e completar o volume para 1 mL com água deionizada. Para o desenvolvimento da cor adicionar em cada tubo 0,1 mL do reagente A mais 0,2 mL do reagente B, e seguindo como descrito anteriormente. A leitura da absorvância é feita no comprimento de onda de 636 nm.