

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Caracterização Química e Estrutural de Ácidos
Húmicos em Solos de Três Sistemas de Manejo**

Ernane Tarcisio Martins Gomes

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL
DE ÁCIDOS HÚMICOS EM SOLOS DE TRÊS
SISTEMAS DE MANEJO

ERNANE TARCISIO MARTINS GOMES

Sob orientação do professor
Ricardo Luís Louro Berbara

e Co-orientação do pesquisador
Andrés Calderín García

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Agosto de 2016

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gc Gomes, ERNANE TARCISIO MARTINS GOMES, 1987-
Caracterização Química e Estrutural de Ácidos
Húmicos em Solos de Três Sistemas de Manejo / ERNANE
TARCISIO MARTINS GOMES Gomes. - 2016.
45 f.: il.

Orientadora: Ricardo Luís Louro Berbara Berbara.
Coorientadora: Andrés Calderín García García.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Agronomia - Ciência do Solo, 2016.

1. Ciência do solo . 2. Solos - Manejo . 3.
Ecologia agrícola . 4. Substâncias húmicas . 5. Húmus.
I. Berbara, Ricardo Luís Louro Berbara, 1957-, orient.
II. García, Andrés Calderín García, 1981-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso
de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

ERNANE TARCISIO MARTINS GOMES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/08/2016.

Andrés Calderín García. Dr. UFRRJ
(Co-orientador)

Marcos Gervasio Pereira. Dr. UFRRJ

Ednaldo da Silva Araújo. Dr. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

*Especialmente aos meus pais, Antônio Tarcisio Gomes, e
Etelvina Martins Gomes, meus irmãos Eliane, Juvenal,
Natalino, Vicente, Sebastião e a minha namorada Graciane.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre estar presente em minha vida iluminando meus caminhos permitindo que aqui eu chegasse.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Louro Berbara por toda confiança, respeito, valiosa orientação, amizade e conhecimentos a mim dedicados.

Ao meu amigo Coorientador Dr. Andrés Calderín García pela dedicada orientação, confiança, respeito, convivência e por todo o apoio, que possibilitou a realização deste projeto.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), de tamanha beleza incomparável que se tornou minha casa dos últimos setes anos. Aos funcionários (professores e técnicos administrativos) do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (CPGA - CS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Aos colegas do Laboratório de Biologia do Solo (Andrés, Beto, Sael, Jorge, Camila, Lívia, Tatiane, Nádia, Frances, Junior, Jardel, Roberta, Rosana, Julia,) pelo agradável convívio e amizade.

Ao pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Dr. Segundo Urquiaga pela grande colaboração na realização de análises e contribuições através de críticas construtivas sobre a pesquisa.

À minha família, meus pais Antônio Tarcisio Gomes & Etelvina Martins Gomes, meus irmãos Sebastião, Eliane, Natalino, Vicente e Juvenal. Também a minha namorada Graciane.

A Professora Lucia Helena Cunha dos Anjos pela correção final da dissertação.

Aos colegas do alojamento Masculino M4, por todos estes anos de convívio e amizade.

Aos companheiros de alojamento Uilian, Marcos, Franco, Rafael, Jairo, Antonione, Ulisses, Danilo, e em especial a meu grande amigo Apolo.

A todos e todas que contribuíram direto ou indiretamente para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro do projeto e pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADO.

BIOGRAFIA

Ernane Tarcisio Martins Gomes nasceu na cidade de Capelinha (MG), em 25 de abril de 1987. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Agronomia no ano de 2008 onde foi monitor da disciplina de Prática de Maquinas e Maquinas Agrícolas. Diplomou-se em 2014. Em agosto de 2014, iniciou o Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciência do Solo na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e concluiu sua dissertação de mestrado em agosto de 2016.

RESUMO

GOMES, Ernane. **Caracterização química e estrutural de ácidos húmicos em solos de três sistemas de manejo. 2016. 33f.** Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A matéria orgânica do solo pode ser oriunda da decomposição de animais ou vegetais. A maioria das culturas comerciais apresentam mecanismos fotossintéticos C3 ou C4, que fixam diferentes isótopos de carbono C^{12} ou C^{13} . Através de análises isotópicas é possível determinar a origem e predominância do tipo de carbono que compõem a matéria orgânica do solo (MOS) em determinada área. Em função do fracionamento químico a MOS ainda pode ser dividida nas frações FAF, FAH e FHU, estas frações apresentam características específicas em função da sua origem de formação e condições ambientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da origem vegetal C3 ou C4 na formação da estrutura química e molecular das substâncias húmicas extraídas de quatro áreas com cobertura diferentes vegetais, porém submetidas ao manejo agroecológico. Para averiguar esta influência foram extraídas as substâncias húmicas (SH) destes solos, sendo realizado o fracionamento químico e caracterização química através de análises de RMN, FTIR, quantificação de isótopos $\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$ na fração de AH, ^{13}C -CP/MAS NMR e a determinação elementar. A partir dos resultados obtidos a partir dessas análises foi possível concluir que a origem vegetal não influencia em diferenças qualitativas e sim em quantitativas entre os componentes químicos das substâncias húmicas (SH), o tipo de ciclo fotossintético não parece ser um fator determinante na formação e incorporação dos tipos de estruturas nos AH, mas sim nas quantidades destas estruturas e na sua distribuição organizacional húmica. As análises teóricas quimiométricas indicam que a incorporação e preservação de MO humificada nestes solos pode ser possível em sistemas de manejo intensivo como a rotação, mediante aplicações de fontes exógenas de SH estabilizada, assim como também o favorecimento dos processos de humificação em sistemas menos manejados como pastagem e SAF. Neste estudo foi comprovado mediante caracterização e quimiometria aplicadas aos AH de um sistema agroecológico, o estado atual da MOS em termos de estabilidade e enriquecimento estrutural e sendo propostas possíveis vias para a recuperação e preservação das SH em solos minerais que possam contribuir ao aumento das condições de fertilidade e consequentemente da produção agrícola.

Palavras-chave: Manejo agroecológico, Frações Húmicas, Caracterização isotópica, Quimiometria.

ABSTRACT

GOMES, Ernane. **Chemical and structural characterization of humic acids in soils of three management systems. 2016. 33p.** Dissertation (Masters in Agronomy, Soil Science). Institute of Agronomy, Department of Soil Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Soil organic matter can be derived from the decomposition of animal or vegetable. Most commercial crops show photosynthetic mechanisms C3 and C4, which set different carbon isotopes C12 or C13. Through isotopic analysis can determine the origin and prevalence of type of carbon that make up the soil organic matter (SOM) in a given area. Depending on the chemical fractionation MOS can also be divided into fractions FAF, FAH and FHU, these fractions have specific characteristics depending on their origin training and ambient conditions. The objective of this study was to evaluate the influence of plant origin C3 or C4 in the formation of the chemical and molecular structure of humic substances extracted from four areas with different vegetation cover, but submitted to agroecological management. To investigate this influence were extracted humic substances (HS) of these soils, being held chemical fractionation and chemical characterization by NMR analysis, FTIR, quantification and $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ isotopes in the AH fraction, 13 C-CP / MAS NMR and elemental determination. From the results obtained from these analyzes it was concluded that the plant does not influence qualitative differences, but in quantitative between the chemical components of humic substances (HS), the type of photosynthetic cycle does not seem to be a determining factor in the formation and incorporation of the types of structures in HA, but rather the quantities of these structures and their humic organizational distribution. The chemometric theoretical analyzes indicate that the development and preservation of humic these soils may be possible in intensive management systems such as rotation upon application of exogenous sources of stabilized SH, as well as favoring the humidification process in less managed systems as pasture and SAF. In this study it was demonstrated by characterization and chemometrics applied to AH of an agro-ecological system, the current state of MOS in terms of stability and structural enrichment and being proposed possible avenues for recovery and preservation of SH in mineral soils that may contribute to the increase in conditions fertility and thus agricultural production.

Keywords: agro-ecological management, Humic Fractions, isotopic characterization, chemometrics

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades químicas do solo avaliadas nas áreas sob as diferentes coberturas vegetais na profundidade de 0 – 20cm.....	13
Tabela 2: Determinação do Diâmetro médio Ponderado (DMP) e o Diâmetro médio Geométrico.....	15
Tabela 3: Composição elementar, relações atômicas e propriedades dos AH extraídos dos solos em diferentes manejos.	15
Tabela 4: Distribuição dos tipos de carbono presente nos AH.	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Áreas de amostragem: a) Mandioca; b) Pasto; c) SAF; d) Rotação..... 8
- Figura 2: Composição textural 14
- Figura 3: Análises de componentes principais (A) e dendograma resultante da análise de agrupamento realizado a partir da composição dos AH (B). 16
- Figura 4: A) Teor de carbono orgânico total, B) Teor de Húmina, C) Teor de Ácido Fúlvico e Ácido Húmico, D) Áreas de Mandioca (M) e SAF, predomínio de carbono de origem de plantas de ciclo fotossintético C3, valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -20‰ e -32‰ (media: -27‰). As áreas de Pastagem (P) e Rotação (R) tiveram predomínio de carbono de origem de plantas com ciclo fotossintético C4 apresentam valores entre -9‰ e -17‰ (media: -13‰)..... 17
- Figura 5: Espectros obtidos dos AH na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). AH de solos orgânicos em cultura de mandioca (A), SAF (B), Pastagem (C) e Rotação (D)..... 19
- Figura 6: Espectros obtidos dos AH mediante CP-MAS ^{13}C NMR. AH de solos orgânicos em cultura de mandioca (A), SAF (B), Pastagem (C) e Rotação (D)..... 20
- Figura 7: Análises de componentes principais (PCA), realizado pelo carregamento dos espectros puros CP-MAS ^{13}C NMR dos AH, “scores” (A) e “loadings” (C). PCA realizado pelo carregamento dos espectros FTIR dos AH, “scores” (B) e “loadings” (D). 22
- Figura 8: Gráfico de calor (Heat graphic) mostrando a relação entre as variáveis estruturais e composicionais dos AH e alguns atributos físicos e químicos dos solos. 23
- Figura 9: Curva de resolução multivariada (MCR) realizada pelo carregamento dos espectros puros CP-MAS ^{13}C NMR dos AH. MCR considerando somente os sistemas de manejo P e R (A), MCR considerando os sistemas de manejo P, R e SAF (B) e MCR considerando os sistemas de manejo P, R, SAF e M (C). Valores de labilidade e recalcitrância expressos em por cem (%) e calculados a partir dos pesos dos componentes 1 e 2 na saída dos dados da MCR, considerando os sistemas P e R (D), considerando os sistemas P, R e SAF (E) e considerado os sistemas P, R, SAF e M (F). Gráficos G e H expressam o comportamento da labilidade e a recalcitrância quando considerando os sistemas SAF e M segundo os pesos das componentes 1 e 2 obtidos a partir da saída dos dados na MCR para os sistemas de pastagem (G) e rotação (H). Seta em azul no lado esquerdo da Figura indica a incorporação na análise MCR de AH mais aromáticos no sentido P,R→SAF→M. 25

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
2) REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1) Matéria Orgânica do Solos (MOS).....	2
2.2) Substancias Húmicas.....	4
3) MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1) Localização e Caracterização das Áreas de estudo	7
3.2) Análises dos atributos físicos do solo	8
3.2.1) Análise granulométrica	8
3.2.2) Determinação do Diâmetro Médio Ponderado (DMP) e Diâmetro Médio Geométrico (DMG)	8
3.3) Fertilidade do solo.....	9
3.4) Isolamento e purificação dos ácidos húmicos (AH) obtidos a partir das amostras de solo.....	9
3.5) Quantificação das Frações Húmicas	9
3.6) Quantificação de isótopos $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ na frações de AH.....	10
3.7) Determinação da composição elementar das frações húmicas e relação E_4/E_6 (SH e HA)	10
3.8) Caracterização mediante espectroscopia de infravermelho (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C -CP/MAS NMR)	11
3.9) Tratamento quimiométrico e estatístico dos dados espectrais e de atividade biológica	11
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1) Análise de fertilidade do solo.....	13
4.2) Atributos físicos do solo avaliadas nas diferentes áreas de estudo.	13
4.3) Determinação da composição elementar das frações húmicas.....	15
4.4) Quantificação isotópica e fracionamento químico das substancias húmicas	16
4.5) Caracterização dos AH mediante espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR). 17	
4.6) Caracterização dos AH mediante ^{13}C NMR do estado sólido (CP-MAS ^{13}C NMR)....	19
4.7) Tratamento quimiométrico aos dados espectrais mediante análise multivariada. Análises de componentes principais (PCA).	21
4.8) Relação entre as variáveis estrutrais e composicionais dos AH e alguns atributos físicos e químicos dos solos.....	22
5) CONCLUSÕES.....	25
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

A matéria orgânica presente no solo (MOS), sem dúvidas é um componente importante na qualidade e estrutura do solo, sendo esta responsável em parte por manter os níveis de umidade e fertilidade do solo. Esta MOS pode estar viva ou morta, sendo a parte viva constituída de raízes de plantas e micro-organismos, o qual ocupam em torno de 4% total da MOS. A parte morta é aquela já em decomposição, constituída pelas substâncias humificadas (substâncias húmicas) e as não humificadas. A MOS pode ser aportada diretamente pela vegetação, resíduos de animais em decomposição e ainda ser oriunda de outras áreas, introduzida através de manejos que utilizem práticas como uso de adubação verde; cobertura morta e aplicação de fertilizantes orgânicos.

A MOS pode se encontrar em vários estágios de decomposição, sendo as substâncias húmicas (SH) o estágio de decomposição mais avançado presente no solo. Generalizando as SH podem ser fracionadas em ácidos fúlvico (AF), ácidos húmico (AH) e humina (HU), podendo ser separadas e purificadas seguindo recomendações e protocolos propostos pela Sociedade Internacional de Substancias Húmicas (IHSS) além de outros métodos reportados na literatura específica. As SH são formadas a partir da degradação biológica e química de material orgânico, ligados principalmente a atividade microbiana. Devido a esta série de fatores, estas cadeias supramoleculares as quais são constituintes das SH, podem apresentar diferentes arranjos estruturais gerando diferentes propriedades e funções biológicas em função da origem de seu material e condições ambientais de sua formação.

Após vinte e seis anos da implementação, fundado em 1990, o Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), também conhecido como Fazendinha Agroecológica do Km 47 de Seropédica-RJ, possui uma área de 59 hectares amplamente utilizados sob o manejo agroecológico visando garantir a sustentabilidade e qualidade do ambiente agrícola produzindo tecnologias viáveis e acessíveis ao homem do campo. E apesar de ser uma área intensamente estudada em diferentes pesquisas científicas, não se tem na atualidade nenhum registro de estudos sobre o estado da qualidade estrutural da MOS humificadas, existindo ainda, evidências de baixo acúmulo de carbono e MOS nestes solos (PIAN, 2015).

Neste cenário o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar as características estruturais de ácidos húmicos (HA), presentes nos solos de três diferentes manejos agrícolas (Cultivo intensivo de Hortaliças, Pastagem e Sistema Agroflorestal) localizados no SIPA, e comparar com as mesmas características de HA extraídos de um solo orgânico sob cultivo de mandioca, localizado no bairro de Santa Cruz município da cidade do Rio de Janeiro. Visando conhecer se a qualidade química e estrutural da MOS, pode ser influenciada pelo tipo de mecanismo fotossintético (C3 ou C4) que deu origem a MOS, em relação ao tipo de vegetação predominante, e atributos químico-físicos do solo, para isto sendo utilizadas técnicas de caracterização espectroscópica (FTIR e ^{13}C CP MAS NMR) e de quantificação de abundância do isótopo de ^{13}C e para acessar às características estruturais dos HA e técnicas quimiométricas, para o estudo das relações de estruturas e atributos físico químicos do solo.

2) REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Matéria Orgânica do Solos (MOS)

A matéria orgânica do solo (MOS) controla importantes propriedades do solo, em particular, aquelas associadas à disponibilidade de nutrientes como um todo, à capacidade de retenção hídrica, e à fertilidade (ROSCOE & MACHADO, 2002), constituindo-se assim um eficiente indicador para avaliar a qualidade do solo, uma vez que seu teor no solo é muito sensível a práticas de manejo principalmente em regiões tropicais e subtropicais (STEVENSON, 1994). Na MOS podem estar representadas a maioria dos componentes orgânicos ou estruturas do carbono originariamente presentes ou não no solo. Embora um solo potencialmente produtivo seja composto de menos que 5% de matéria orgânica, está determina em grande parte sua produtividade (CARTER, 2001). A MOS serve como uma fonte de alimento para microrganismos através de reações químicas podendo influenciar algumas propriedades físicas do solo. Algumas combinações de compostos orgânicos contribuem até mesmo no desgaste de material mineral, o processo pelo qual o solo é formado (MOREIRA, 2006). A MOS pode representar também a história de mudanças naturais (paleoambientais) ou antropogênicas (manejo) (SCHMIDT et al., 2011).

Dois tipos de técnicas de avaliação da qualidade e propriedades da MOS são das mais utilizadas na última década. Uma técnica se corresponde com a datação do isótopo do carbono ^{14}C na MOS, fundamentalmente na fração Húmina, ou em carvões presentes no solo, o que permite estabelecer uma cronologia dos eventos acontecidos no solo ao longo do tempo. A outra técnica permite através de quantificação de $\delta^{13}\text{C}$ e datação de ^{14}C , estudar mudanças paleoambientais (paleovegetais e paleoclimáticas) (GOUVEIA et al., 2005).

O estudo da presença de isótopos estáveis do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) na MOS, baseia-se na diferença em que estes isótopos foram fixados por plantas com metabolismo C_3 e C_4 . Utilizam-se nestes estudos dois isótopos estáveis, o ^{12}C e ^{13}C . O ^{12}C é o isótopo mais leve e ocorre em uma proporção de 98,89%, entanto o ^{13}C ocorre em uma proporção de 1,11%. As determinações do conteúdo isotópico da MOS são feitas quantificando a relação existente entre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, expressando o resultado como a diferença de $\delta^{13}\text{C}$ comparado com um padrão (Pee Dee Belemnite, PDB, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}= 0,01124$) (PESSENDA et al., 2001, GOUVEIA et al., 2004, ALVES et al., 2005).

Nos sistemas solo-planta, esta relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ que pode ser mesurada na MOS, fornece informação sobre a presença de plantas com ciclo fotossintético de tipo C_3 ou C_4 nesses solos no decorrer do tempo, de maneira que, com as mudanças na presença de vegetação é também atribuída a variações no clima. A quantificação de relações isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ na MOS podem ser utilizada também para conhecer os efeitos na dinâmica da vegetação em um ecossistema, efeitos do uso da terra e as interações clima-vegetação (PESSENDA et al., 2001, GOUVEIA et al., 2004). Porém, para acessar as informações contidas na MOS, precisa-se de técnicas que forneçam confiabilidade e precisão. Isto porque, o isolamento da própria matéria orgânica de um ambiente natural já resulta um processo agressivo que pode por si mesmo, mudar algumas características intrínsecas da MOS fora de seu ambiente natural. Embora isto seja conhecido, é possível padronizar estes possíveis erros utilizando técnicas de datação isotópicas e caracterização espectroscópicas de alta precisão (ALVES et al., 2005).

Outras técnicas são as que pertencem ao grupo de técnicas espectroscópicas e espectrométricas: Caracterização mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR); Caracterização mediante ressonância magnética nuclear em estado sólido (CP MAS ^{13}C - RMN); ^1H -RMN, Py-GC-MS). Estas técnicas são mais direcionadas à interpretação estrutural e quantificação de características estruturais da MOS. As técnicas de FTIR permitem determinar a presença de grupamentos funcionais, as de RMN permitem

identificar e quantificar a estereoquímica do carbono (sp_3 , sp_2 e sp), entretanto a Py-CG-MS fornece informação sobre a presença de fragmentos estruturais e origem destes fragmentos (CANELLAS et al., 2005).

Na atualidade, a maioria dos modelos existentes para avaliar a qualidade da MOS fornecem respostas mais qualitativas existindo ainda deficiências para gerar propostas de manejo do solo em função da qualidade da MOS a partir de respostas quantitativas. Isto se deve fundamentalmente aos modelos de estudo existentes nas últimas décadas e à complexidade do solo como sistema aberto. Um exemplo importante é que a MOS, sendo ainda termodinamicamente instável, ela persiste por milhares de anos no solo. Os modelos até agora existentes explicam este fenômeno através das características intrínsecas da MOS, no entanto, técnicas mais atuais de genômica e modelação computacional tem demonstrado que a persistência da MOS não se deve em primeira instancia a suas propriedades estruturais senão às propriedades do ecossistema que propiciam condições ambientais para reduzir a velocidade de decomposição (Schmidt et al., 2011).

A utilização de técnicas espectroscópicas aplicada à MOS apresenta fundamentalmente três objetivos fundamentais. O primeiro está relacionado com a elucidação estrutural da MOS e suas frações humificadas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e húminas). O segundo objetivo se corresponde com a necessidade de caracterizar as propriedades da MOS (retenção de metais no solo, capacidade de troca catiônica, efeitos no crescimento radicular nas plantas). Um terceiro é a possibilidade de usar estas técnicas para caracterizar mudanças ocorridas na MOS ora por efeitos antropogênicos ora por efeitos naturais.

Existem várias técnicas espectroscópicas que são aplicadas ao estudo das características da MOS. Em geral, estas técnicas podem ser divididas em dois grupos atendendo ao nível de interação com a amostra. O grupo de técnicas que utilizam a energia eletromagnética para interatuar com a estrutura podem ser consideradas como técnicas não destrutivas (Espectrofotometria UV-vis, Fluorescência, FTIV, ^{13}C , 1H -RMN, Ressonância paramagnética eletrônica, microscopia eletrônica entre outras). Assim, as técnicas que utilizam energia para propiciar a quebra da estrutura são consideradas como técnicas destrutivas (composição elementar, espectrometria de massas, Pirólises, análises térmico diferencial entre outras).

As substâncias húmicas absorvem radiação na região do ultravioleta e do visível. Estes compostos também tem a capacidade de absorver radiações eletromagnéticas na região infravermelha do espectro. Esta radiação não é de suficiente intensidade como para produzir excitação de elétrons, mas é a necessária para provocar vibrações dos átomos e grupos de átomos, as que são registradas segundo seu número de onda. Por este motivo, a técnica também é conhecida como espectroscopia vibracional.

Na espectroscopia infravermelha, cada absorção e por tanto cada vibração está associada a determinado número de onda, o que determina a posição exata da banda de absorção provocada pela vibração de um grupamento funcional em um espectro FT-IV. A vibração dos átomos depende de dois fatores: massa dos átomos e tipo de ligação entre os átomos. As vibrações podem ser de tipo deformações ou estiramentos.

A obtenção de espectros FT-IV ainda é de grande importância na elucidação estrutural e obtenção de informação para explicar as propriedades das substâncias húmicas. A principal informação que esta técnica fornece é a identificação dos grupamentos funcionais que estão presentes em uma substância. Como consequência disto, outras informações podem ser obtidas inclusive com maior aprimoramento, como são a aromaticidade, carácter alifático da amostra e sua capacidade para a interação com metais. Como a estrutura da MOS e as substâncias húmicas apresentam uma elevada complexidade estrutural, a quantidade de grupos funcionais dada pela presença na quantidade de bandas nos espectros também é elevada.

Alguns trabalhos tem relatado um acompanhamento do grau de humificação mediante FTIV de ácidos húmicos em diferentes horizontes, com ênfases nas intensidades e presença das bandas. Nos trabalhos realizados por Fontana (2009), a partir da caracterização FTIV de ácidos húmicos obtidos de diferentes horizontes, se avalia o grau de humificação pela ausência de bandas em alguns espectros ou a intensidade de outras. A ausência das bandas entre 2860-2840 cm^{-1} e 1620-1600 cm^{-1} , assim como presença de bandas fortes 1660-1630 cm^{-1} , além de uma maior “quantidade” em 3100-3030 cm^{-1} e 1080-1040 cm^{-1} , já a ausência de bandas em 1660-1630 cm^{-1} foram interpretados pelo autor como indicativo de um ligeiro aumento do grau de humificação (Santos & Camargo, 1999; Mangrich et al., 2000).

Já o aspecto dos espectros RMN da MOS correspondem com uma presença de bandas em todas as regiões pertencentes a tipos de carbono. No entanto, pode se encontrar uma tendência ao predomínio de estruturas de *O*-alquil (41-46%), C-alquil (~25%), C-Aromático (~20%) e finalmente os C-carbonilas (Powlson et al, 2013).

Além da possibilidade de elucidação estrutural da MOS mediante as técnicas de RMN, o monitoramento de mudanças estruturais pela ação antropogênica ou natural, é dos processos mais estudados através da obtenção de espectros RMN. De maneira geral o processo de humificação pode ser considerado como a degradação de material orgânico lábil em matéria orgânica recalcitrante (Novotny et al., 2009).

Para isto, tem de serem reconhecidas as regiões mais características da MOS em um espectro ^{13}C - NMR e sua origem. Os espectros se mostram com uma região ampla de 50-110 ppm, geralmente provenientes de fragmentos de carboidratos (*O*-alquil e di-*O*-alquil: celulose e hemicelulose). Também contribuem para esta região fragmentos provenientes de proteínas (*O*-Metoxilas e *N*-alquil: 62-50 ppm). Outra importante região é a aromática, com estruturas *O*-arílicas (160-145 ppm) e acrílicas (124-112 ppm), provenientes dos processos de humificação de ligninas, taninos e cumarinas (Novotny et al., 2009).

Os espectros ^{13}C -NMR realizados a ácidos húmicos de solos onde tem acontecidos queima e a duas profundidades diferentes, mostram que é possível observar mudanças nos espectros dos ácidos húmicos da camada superficial do solo em relação ao queimado e não queimado. O solo queimado, à profundidade de 0-2 cm apresentou diminuição das regiões associadas a estruturas alifáticas e alifáticas oxigenadas, enquanto que houve um aumento na intensidade dos picos na região de aromáticos e de carboxilas e carbonilas. Isto indica que a queima pode provocar a degradação oxidativa, decompondo estruturas mais lábeis (carboidratos, proteínas), enquanto que as mais estáveis termicamente como as aromáticas ficam acumuladas nos solos (Crespo, 2011).

2.2) Substancias Húmicas

As substâncias húmicas (SH) se destacam como os principais componentes da MOS (85 a 90%), compostas de AH, AF e Hu e originam-se a partir de transformações bioquímicas de compostos como lignina, celulose, hemicelulose, açúcares, aminoácidos (SILVA & MENDONÇA, 2007). O efeito das SH não é fácil de ser explicado, devido à natureza complexa ainda pouco conhecida dessas substâncias. Existem SH com características muito diferentes, devido à origem do material, ao método de extração e até mesmo pelas diferentes concentrações em que se encontram, esses efeitos também podem diferir entre espécies vegetais, que podem responder diferentemente em cada estágio de desenvolvimento (SANTOS & CAMARGO, 1999).

A ação direta das SH sobre o metabolismo e o crescimento das plantas tem sido atribuída principalmente à ação das SH de menor peso molecular, principalmente os AF (VAUGHAN et al., 1985; NARDI et al., 2002). Com base na solubilidade em meio aquoso, as SH são classificadas em três categorias: Ácidos Fúlvicos (AF), solúveis em meio aquoso tanto

em pH ácido ou alcalino possuem coloração que pode variar de amarelo claro a castanho escuro em função de seu material de origem e concentração em solução; Ácidos Húmicos (AH), solúveis em pH alcalino de cor mais escura de marrom claro a preto também em função de seu material de origem ; e Húmina (HUM), insolúvel em qualquer pH geralmente de cores acinzentadas. Tradicionalmente, admite-se que esses compostos variam em peso molecular na ordem crescente $AF < AH < Hu$ (ZECH et al., 1997; HAYES, 1998).

O estabelecimento de um modelo estrutural para as SH é tema ainda controverso. O modelo mais aceito é de que as SH são macromoléculas que têm sua conformação variável de acordo com as condições do meio (STEVENSON, 1994; SANTOS & CAMARGO, 1999). Este modelo explica macroscopicamente as principais interações das SH, como a capacidade de adsorção e complexação de íons e interação com minerais do solo. No entanto, Picollo (2002) propôs a teoria de que as SH são formadas por arranjo supra estrutural de pequenas moléculas orgânicas através de forças de interação fraca. Este modelo é bastante útil para descrever o comportamento ambiental das SH, bem como os efeitos que elas têm sobre o metabolismo das plantas. A interação planta-microorganismos pode alterar a estrutura e a conformação das SH, e pequenas unidades portadoras de bioatividade contidas nas SH que podem estimular o crescimento e o metabolismo dos organismos (MOREIRA, 2006).

As características químico-físicas que as SH apresentam, possibilitam que elas sejam utilizadas em função de melhorar as condições de fertilidade dos solos, estimulação vegetal, conseqüentemente aumento de produção vegetal com baixo risco de contaminação, já que as SH são oriundas de processos naturais (CANELLAS et al. 2005). Os estudos das SH vão desde os métodos de extração, fracionamento e purificação até a caracterização por métodos espectroscópicos. Os métodos de extração mais utilizados são Kononova, Dabin, Danneberg & Ullah, Schnitzer, Swift, Benites e os de purificação são os com Ácido Fluorídrico (HF), resina DAX-8, diálise e liofilização. A caracterização é feita por técnicas espectroscópicas, sendo as espectroscopias na região do ultravioleta-visível (UV), na região do infravermelho (IV), fluorescência, ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) as mais utilizadas. Várias das técnicas utilizadas atualmente nos estudos das frações estáveis da matéria orgânica são de pouca acessibilidade, por serem complexas e os equipamentos necessários são de alto custo de aquisição e manutenção, o que pode estar limitando o desenvolvimento de pesquisas dessa natureza em algumas regiões do Brasil. As reuniões bianuais realizadas pela Sociedade Internacional das Substâncias Húmicas (IHSS) vem oferecendo grande contribuição na oferta e organização de informações sobre as frações húmicas da MOS no solo e nas águas, visando conhecer sua estrutura e transformação no meio ambiente (PRIMO, 2011).

Segundo Stverson (1994), o AF se torna solúvel em meio aquoso, podendo este meio apresentar pH alcalino ou ácido (HAYES, 1996). Ele é constituído, por polissacarídeos, aminoácidos e compostos fenólicos, que são mais reativos do que as outras frações pela maior quantidade de grupos carboxílicos e fenólicos que contém. Pesquisas de ação direta de SH no metabolismo e crescimento de plantas tem se concentrado nas frações humificadas de menor peso molecular que apresentam maior solubilidade e conseqüentemente maior mobilidade no perfil do solo, no caso os AF (SILVA, 2007).

Os AH são substâncias de coloração escura, compostas por macromoléculas de massa molecular relativamente elevada, formadas por meio de reações de síntese secundárias a partir de resíduos orgânicos de plantas, animais e micro-organismos. AH são solúveis em meio alcalino e insolúveis em meio ácido diluído (STVERSON 1994). Os AH apresentam um maior teor de C, menor teor de O e teor similar de H que os AF (PICCOLO 2002), o que pode ser verificado em estudos realizados por (CANELLAS, 2004) em amostras de Argissolo Amarelo. A massa molecular relativa dos AH é maior do que a dos AF, tendendo a ter mais carbonos aromáticos e menos carboxílicos e grupos C-O alquil do que os AF (PICCOLO

2002) possivelmente por possuírem maior conteúdo de estruturas tipo polissacarídeos. Entre as SH, os AF e AH são os mais estudados.

Os AH e AF são bastantes reativos e essa elevada reatividade deve-se principalmente, à presença de grupos funcionais que contem oxigênio, tais como carboxilas e hidroxilas fenólicas que são responsáveis pela sua acidez. A acidez dos AH é menor que a acidez dos AF, o que está relacionado com seus menores teores de carboxilas (CANELLAS, 2004).

A Hu é insolúvel em meio alcalino e meio ácido, e pode ter composição variada. Possui reduzida capacidade de reação. A sua não insolubilidade em meio aquoso pode ser devido à elevada hidrofobicidade e forte interação com os componentes inorgânicos e também por conter compostos lipídicos, estruturas de carboidratos e aromáticos em diferentes proporções (RICE, 2001). A Hu apresenta baixa acidez em comparação aos AF e AH, o que, ao lado da forte associação com os minerais, acarreta insolubilidade em meio aquoso alcalino. A insolubilidade da Hu pode ser proveniente da sua firme adsorção ou ligação a constituintes inorgânicos do solo (STVERSON, 1994)

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Localização e Caracterização das Áreas de estudo

Foram realizadas coletas de solo em três diferentes áreas localizadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica – SIPA, conhecido como Fazendinha Agroecológica do Km 47, município de Seropédica-RJ. As áreas amostradas no SIPA são: Pastagem orgânica, Módulo intensivo de produção de hortaliças (Rotação de culturas), ambos cultivados em área de PLANOSSOLO, Sistema Agroflorestal cultivado em um ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO foi amostrada também uma área de cultivo de Mandioca (*Manihot esculenta crantz*) sob um ORGANOSSOLO localizado no bairro de Santa Cruz, pertencente a cidade do Rio de Janeiro a margem da BR 101 (SANTOS ET AL., 2013).

A área de cultivo de mandioca (M) (*Manihot esculenta crantz*) (**Figura 1A**) com aproximadamente 1ha cultivado em camalhões (canteiros) apresenta solo pertencente a classe dos Organossolo, sendo explorada desde os anos 1980 com a chegada de imigrantes japoneses que receberam incentivo do governo para implantação de projetos de olericultura e fruticultura. Esta área apresenta relevo plano e tem uma forte influência do lençol freático, em consequência ela foi drenada para possibilitar o cultivo, recebendo calagem e preparo mecanizado (aração e gradagem) do solo para o plantio da mandioca, seguido por tratamentos culturais como capina mecânica e controle de pragas.

A Pastagem Orgânica (P) também com aproximadamente 1 ha (**Figura 1B**) localiza-se em área de PLANOSSOLO, apresenta relevo como uma leve inclinação tendo um solo de textura arenosa e formado por capim suázi (*Digitaria swazilandensis Stent*), capim rabo de burro (*Andropogon bicornis*) e capim colônia (*Panicum maximum Jacq.*).

O Sistema Agroflorestal (SAF), com 13 anos de implantação (**Figura 1C**) sob ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO, possuindo relevo com baixa declividade, formado por banana (*Musa sapientum*), palmito jussara (*Euterpe oleracea*), cacau (*Thebroma cacao*), mamão (*Carica papaya*) e guapuruvu (*Schizolobium parahyba*).

A área de Cultivo intensivo com 0,25ha, chamada neste trabalho de área de rotação de culturas (R), também cultivada em área de PLANOSSOLO (**Figura 1D**) com 18 espécies de hortaliças é conduzida do mês de abril a outubro, se propõe a replicar uma propriedade agrícola de pequena escala, que não apresente produção animal vinculada à produção vegetal. Desta forma não há entrada de qualquer material proveniente da produção animal, como esterco, compostos mistos, adubos orgânicos, entre outros produtos utilizados pela agricultura orgânica e que apresentam vínculo com a produção animal. O objetivo do módulo é apresentar um modelo de produção que apresente o máximo de independência de insumos externos, gerando trabalho e renda para uma família de quatro pessoas. Esta área foi planejada e implantada no ano de 2011 para a dissertação de Mata (2012). A adubação do Módulo de cultivo se baseia no uso de composto fermentado anaeróbico, o chamado Bokashi. Este é obtido pela fermentação anaeróbica de torta de mamona, farelo de trigo, após inoculação com microrganismos eficientes (EM - produto comercial Embiotic Line). O Bokashi apresenta em média 3,32 g.kg⁻¹ de cálcio, 3,48 g.kg⁻¹ de magnésio, 3,94 g.kg⁻¹ de fósforo, 11,50 g.kg⁻¹ de potássio e 4,08 g.kg⁻¹ de nitrogênio (PIAN, 2015).

Além disso, adubações de cobertura são feitas com torta de mamona, que apresenta concentração média de 4,46 g.kg⁻¹ de fósforo, 10,38 g.kg⁻¹ de potássio e 5,23 g.kg⁻¹ de nitrogênio. Uma cobertura morta com 50% de palhada de gliricídia e 50% de capim-elefante é adicionada aos canteiros. O composto vegetal (capim-elefante + torta de mamona) é utilizado no preparo das covas de pepino, couve, tomate e quiabo (PIAN, 2015).

Para a coleta das amostras, cada uma das quatro áreas foi subdividida em três subáreas, sendo que em cada subárea foram retiradas quatro amostras simples aleatoriamente para composição de uma amostra composta, totalizando três amostras compostas por área,

retiradas a uma profundidade de (0,00 – 0,20m). Após a coleta as amostras foram devidamente identificadas e levadas para o laboratório para realização das devidas análises.

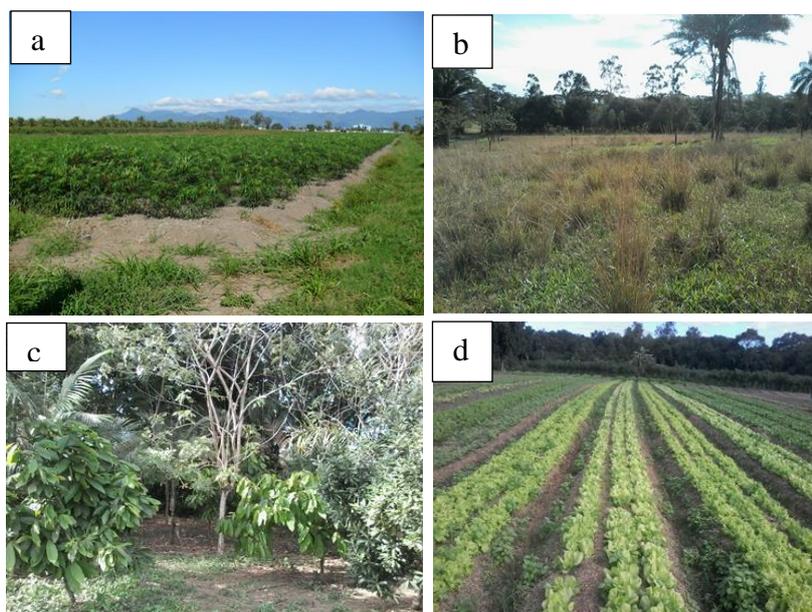


Figura 1: Áreas de amostragem: a) Mandioca; b) Pasto; c) SAF; d) Rotação

3.2) Análises dos atributos físicos do solo

3.2.1) Análise granulométrica

As amostras foram peneiradas em malha de 8,0 e 4,0 mm, e posteriormente secas ao ar e homogeneizadas, terra fina seca ao ar (TFSA) para a execução das análises. O método utilizado para a separação das frações granulométricas foi o método da pipeta segundo Day (1965).

3.2.2) Determinação do Diâmetro Médio Ponderado (DMP) e Diâmetro Médio Geométrico (DMG)

Através do tamisamento por via úmida e o aparelho de Yoder (1963), calibrado para funcionar durante 15 minutos, com 38 oscilações de imersão em água e suspensão em um intervalo espacial de 3,5 cm de amplitude entre o ponto máximo e mínimo.

A umidade residual foi determinada em outra amostra indeformada. Cada amostra de solo foi colocada em placa Petri e umedecida, lentamente, com água, com auxílio de pulverizador manual. Depois, as amostras foram transferidas para o aparelho de YODER, colocadas na primeira parte superior de um conjunto de peneiras com malhas de tamanho decrescente de 2,0 1,0 0,5 0,25 e 0,105 mm de abertura. Após o termino programado de oscilação do conjunto de peneiras, o conteúdo retido em cada uma foi transferido para placa de Petri e levado a secar em estufas a 105°C, durante 24 horas, e em seguida pesado. A classe de tamanho de agregados menos que 0,105 mm foi calculada por diferença, tomando-se o peso inicial, menos a umidade residual, e o peso das demais classes de agregados como base. Todos esses procedimentos foram realizados conforme Embrapa (1997).

A partir dos dados de pesos de agregados em cada peneira, foram calculados o diâmetro médio ponderado (DMP) e o diâmetro médio geométrico (DMG), segundo a formula proposta por Castro Filho et al., (1998).

3.3) Fertilidade do solo

Foram realizada segundo Embrapa (1997), sendo determinados pH, Al^{3+} , P, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , soma de bases e CTC.

Seguindo metodologia proposta por Tedesco (1985) foram determinados os teores de Cu, Fe, Mn e Zn.

3.4) Isolamento e purificação dos ácidos húmicos (AH) obtidos a partir das amostras de solo

Os AH foram obtidos segundo a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e de acordo com o protocolo metodológico descrito por Swift (1996). Uma modificação inicial foi adaptada realizando um pré-tratamento das amostras de terra com uma solução de HCl ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$), pH 1.0-2.0 (NOVOTNY, 2004). Resumidamente, para a obtenção das frações húmicas a partir das amostras, após pré-tratamento com HCl, uma dissolução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada a uma massa de terra em proporções de 10:1 (v:m) sob atmosfera de N_2 e em agitação por 24 h. Seguidamente o material foi centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos e recolhido o sobrenadante que contém as substâncias húmicas (HS) (AF+HA), assim como a fração sólida que contém às huminas. Para a separação por precipitação dos HA, a um volume de HS obtidas na etapa anterior, foi ajustado o pH até 2.0 mediante gotejamento de uma dissolução de HCl (6 mol. L^{-1}) e mantido em repouso durante 16 horas, após este período, o material foi centrifugado a 5.000 g por 10 min e o sobrenadante foi sifonado e descartado, este processo foi repetido por três vezes. Para remover os sólidos solúveis em suspensão, os HA foram redissolvidos em uma dissolução de KOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e adicionado KCl até atingir-se uma concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de K^+ e seguidamente centrifugado a 4.000 g durante 15 min. Posteriormente, a purificação foi realizada mediante adição aos HA de uma dissolução de HF ($0,3 \text{ mol. L}^{-1}$) +HCl ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) e agitação por 24 horas a 5.000 g , este processo foi repetido até um conteúdo de cinzas menor a 1% (SCHNITZER, 1982). Posteriormente, os HA foram dialisados em água deionizada usando membrana SPECTRA/POR[®] 7 dialysis tubing, 1 kD, até a condutividade elétrica da água deionizada não apresentar valores superiores a $1 \mu\text{S}$. Após este processo, os HA foram congelados em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente liofilizados.

3.5) Quantificação das Frações Húmicas

Para quantificação das frações húmicas AH, AF e HU, foram pesados um 1,0g, sendo adicionado a esta 20 ml da NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução permaneceu em contato com a amostra durante 24 horas. Aos este período foi realizada a separação do extrato alcalino (EA= FAF+FAH) e o resíduo separado através de centrifugação a 5000g por 30 minutos. Após a centrifugação foi novamente realizada uma lavagem com a mesma solução anterior, adicionando-se o extrato anteriormente obtido, resultando em volume final de 40 ml. O resíduo obtido nos tubos de centrifugação foram colocados em placa petri e secos em estufa a 65°C até atingirem a secagem completa. O pH do extrato alcalino (EA) foi ajustado a 1,0 ($\pm 0,1$) com H_2SO_4 20%, deixado em repouso para decantação durante 18 horas em geladeira. Após a decantação o precipitado (FAH) foi separado da fração solúvel (FAF) por filtragem e ambos os volumes aferidos a 50 ml, com água destilada.

A quantificação do carbono orgânico nas frações FAF e FAH foi feita tomando-se alíquotas de 5,0 ml de extrato, 1,0 ml de dicromato de potássio $0,042 \text{ mol L}^{-1}$ e 5,0 ml de H_2SO_4 concentrado, em bloco digestor a 150°C durante 30 minutos e titulação com sulfato ferroso amoniacal $0,0125 \text{ mol.L}^{-1}$. No resíduo seco em estufa foi determinado o carbono

orgânico na Húmina (HU), e adicionado 5,0 ml de dicromato de potássio 0,1667 mol L⁻¹ e 10,0 ml de H₂SO₄ concentrado, em bloco digestor a 150°C por 30 minutos e titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,25 mol L⁻¹ e indicador ferroin (YEOMANS & BREMMER, 1988).

3.6) Quantificação de isótopos $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ na frações de AH.

A análise isotópica foi realizada em amostras sólidas preparadas em equipamentos específicos, tais como linhas de vácuo; bombas de compressão; concentradores; fornos de reação; e equipamentos de microdestilação (WERNER e BRAND, 2001), elas são pesadas dentro de cápsulas de estanho devidamente identificadas em balança (AG245 Metler Toledo) de alta precisão com cinco casas decimais. A massa a ser pesada em miligramas foi calculada de acordo com a porcentagem de carbono total da amostra, dividindo-se essa porcentagem por 40, o valor encontrado é a massa a ser pesada. Para que as leituras isotópicas sejam realizadas, é necessário que tanto a amostra como o padrão de referência sejam transformados em uma forma gasosa (MARTINELLI et al., 2009; MEIER-AUGENSTEIN, 1999).

As concentrações naturais dos isótopos e suas variações foram determinadas através da espectrometria de massa de razões isotópicas (EMRI), na qual a amostra é analisada contra um padrão de referência. Os resultados obtidos serão expressos em delta per mil (amostras com abundâncias isotópicas naturais) (MEIER-AUGENSTEIN, 1999; ROSSMANN, 2001).

No EMRI, a amostra sólida deve ser convertido em um gás, que deve ser isotopicamente representativo da amostra original (BENSON et al., 2006). Para que isso ocorra as amostras são submetidas à alta temperatura em tubo de combustão (BASKARAN, 2011). As medidas das razões isotópicas são feitas através dos gases hidrogênio (H₂), nitrogênio (N₂), dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂) ou hexafluoreto de enxofre (SF₆), respectivamente (BENSON et al., 2006). As amostras serão introduzidas utilizando-se da técnica de dupla entrada (DE-EMRI) esta técnica requer que as amostras sólidas sejam convertidas em gases puros. O gás de referência e o gás da amostra são introduzidos por vias diferentes, com isso consegue-se fazer comparações entre as composições isotópicas da amostra em relação ao gás de referência (BENSON et al., 2006).

A abundância isotópica do ¹³C nos AH foi realizada nas amostras em função da quantidade de carbono total (aproximadamente 200 µg de C). As determinações foram realizadas em um aparelho de espectrometria de massa “continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer” do tipo Finnigan DeltaPlus mass spectrometer coupled to the output of a Carlo Erba EA 1108 total C and N analyser—Finnigan MAT, Bremen, Germany.

3.7) Determinação da composição elementar das frações húmicas e relação E₄/E₆ (SH e HA)

A composição elementar foi realizada utilizando um analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN. As análises foram realizadas utilizando-se 1,1 ± 0,1 mg de amostras pesadas em micro balança acoplada ao aparelho. Os padrões de referência usados foram a acetanilide (C: 71,09%; H: 6,71%; N: 10,36%). O aparelho foi calibrado diariamente e as leituras das amostras alternadas por leituras de branco, na razão de um branco para cada cinco amostras. O teor de oxigênio foi determinado por subtração segundo a equação: %O = {100% - (%C + %H + %N)}. Do mesmo modo foram calculadas as razões molares atômicas: H/C = {(%C/12) / (%H/1)}; C/N = {(%C/12) / (%N/14)}; O/C = {(%O/16) / (%C/12)} e O/H = {(%O/16) / (%H/1)}.

O grau de oxidação interna (ω) foi calculado a partir da composição elementar segundo a seguinte equação: $W = \{(2 \times \%QO) - \%QH\} / \%QC$, onde: QO, QH e QC são as quantidades dos elementos oxigênio, hidrogênio e carbono, respectivamente (ORLOV, 1985). A densidade dos AH foi calculada segundo (ORLOV, 1995), onde inicialmente é calculado o volume específico aparente (v) mediante a somatória dos volumes específicos dos átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, segundo a seguinte equação: $v = (0.825 \times \%C) / 100 + (3.1 \times \%H) / 100 + (0.107 \times \%N) / 100 + (0.144 \times \%O) / 100$, onde %C, %H, %N e %O são as quantidades destes elementos em função do peso. Com este valor de v , a densidade ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) é calculada segundo a equação: $\delta = 1/v$.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos na faixa de 4.000 - 400 cm^{-1} , em espectrômetro de infravermelho da marca NICOLET (FT-IR), modelo 6700, com transformada de Fourier (FTIR), utilizando pastilhas de KBr (5 mg de AH liofilizado + 200 mg de KBr). A espectroscopia de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico CP MAS ^{13}C -RMN foi realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos pela coleta de 2048 data points para igual número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5s. O tempo de contato para a sequência em rampa de ^1H ramp foi de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foi realizada utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (FID) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

3.8) Caracterização mediante espectroscopia de infravermelho (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C -CP/MAS NMR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos na faixa de 4.000 - 400 cm^{-1} , em espectrômetro de infravermelho da marca NICOLET (FT-IR), modelo 6700, com transformada de Fourier (FTIR), utilizando pastilhas de KBr (5 mg de AH liofilizado + 200 mg de KBr).

A espectroscopia de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico CP MAS ^{13}C -RMN foi realizada no aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, as amostras dos materiais humificados são colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros são obtidos pela coleta de 2048 data points para igual número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5 s. O tempo de contato para a sequência em rampa de ^1H ramp é de 2 ms. A coleta e elaboração espectral foi realizada utilizando o Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (FID) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

3.9) Tratamento quimiométrico e estatístico dos dados espectrais e de atividade biológica

As análises quimiométricas de componentes principais (PCA), curva de resolução multivariada (MCR) e regressão de componentes principais (PCR) envolvendo os dados espectrais de ^{13}C -CP/MAS NMR e FTIR de todas as frações húmicas serão realizadas

utilizando o programa Unscrambler[®] X 10.3 package (Camo Software AS Inc., Oslo, Norway). Os espectros ¹³C-NMR e FTIR das frações húmicas são carregados a partir do software e normalizados segundo a normalização por area (area normalization). A faixa selecionada para conformar as matrizes de dados espectrais ¹³C-NMR será desde -20 ppm até 240 ppm, os valores fora desta faixa serão descartados para evitar falsas contribuições nas análises. Nas análises PCA de cada fração húmica serão realizadas utilizando um algoritmo NIPALS, método de validação CROSS VALIDATION com o número máximo de componentes. Para as análises PCA FTIR, foi selecionada uma faixa entre 400 cm⁻¹ e 3800 cm⁻¹. Foram utilizadas as mesmas condições de análises que as utilizadas para ¹³C-NMR. As análises de MCR para os dados de ¹³C-NMR foram realizados mediante carregamento dos espectros e restrições para valores negativos de concentrações espectrais. A quantificação da labilidade e a recalcitrância expressos em porcentagem (%), foi realizada a partir da concentração dos componentes, uns dos resultados fornecidos por esta análise. As análises de PCR foram realizadas a partir dos dados espectrais FTIR e ¹³C-NMR. Foi utilizado como variável preditora X (KHATTREE & NAIK, 2000; CRUZ & REGAZZI, 2012), e como variável de resposta Y: os dados espectrais. Foi utilizado um número máximo de sete componentes principais, “mean center”, para 95% de nível de confiança, o algoritmo NIPALS e validação “leverage correction”.

As análises multivariadas que não envolvam carregamentos de dados espectrais (PCA da composição elementar das frações húmicas, PCA dos parâmetros radiculares avaliados nos experimentos de bioatividade) foram realizadas utilizando Statgraphics[®] Centurion XVI package (StatPoint Technologies, Inc). Os dados organizados em planilha de trabalho Excel e carregados desde o Statgraphics[®], as análises foram realizadas a partir dos dados homogeneizados a partir de seu desvio padrão (KHATTREE & NAIK, 2000; CRUZ & REGAZZI, 2012).

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Análise de fertilidade do solo

De acordo com a Tabela 1 pode ser observado que as áreas de Pastagem, Rotação de culturas e SAF pertencentes as classes de solos amostradas na Fazendinha (PLANOSSOLO e ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO), naturalmente apresentam baixa fertilidade. Essas áreas apresentaram acidez ativa e potencial moderada (LOSS, 2008). Os teores de macro nutrientes estão em níveis médio, podendo estes solos serem manejados e cultivados normalmente. No entanto, a área cultivada com mandioca apresentou alta acidez potencial e um elevado teor de alumínio, esses fatores podem estar relacionados com as características do Organossolo. Este pode apresentar saturação por bases baixa (distrófico), fortemente ácido, alta capacidade de troca de cátions e teor de alumínio elevado. Os valores de Cu estão baixos em todas as áreas, exceto na área de SAF que apresenta valor médio. Os níveis de Fe e Mn na área de mandioca e rotação apresentam valores baixos e nas áreas de SAF e pastagem apresentam valores alto e médio respectivamente. Os valores de Zinco são satisfatórios para todas as áreas (Ribeiro et. al, 1999).

Tabela 1: Propriedades químicas do solo avaliadas nas áreas sob as diferentes coberturas vegetais na profundidade de 0 – 20cm.

Áreas	Propriedades químicas do solo (FERTILIDADE)				
	pH (H ₂ O)	Al	H+Al	Na	S
	------(cmol _c dm ⁻³) -----				
Mandioca	5,0	1,2	22,1	0,11	8,75
Pasto	6,0	0,0	4,5	0,04	3,07
SAF	6,1	0,0	5,4	0,04	6,72
Rotação	6,0	0,0	4,9	0,06	5,33
	P	K	Ca	Mg	T
	------(mg/L) -----		------(cmol _c dm ⁻³) -----		
Mandioca	11,09	208	5,7	2,4	30,85
Pasto	21,00	54	1,7	1,2	7,57
SAF	50,00	108	4,8	1,6	12,12
Rotação	58,8	67	3,7	1,4	10,23
	Cu	Fe	Mn	Zn	V
	----- (mg dm ⁻³) -----				(%)
Mandioca	0,31	14,6	5,5	1,1	28
Pasto	0,55	33,6	7,0	1,2	41
SAF	1,03	67,2	8,3	1,1	55
Rotação	0,89	15,7	3,4	2,4	52

4.2) Atributos físicos do solo avaliadas nas diferentes áreas de estudo.

A textura do solo é constituída pela proporção relativa das frações granulométricas que constituem o solo. Para se determinar a textura, partículas com diâmetro maior do que 2mm e a MOS não são considerados visto que o tamanho das partículas não está sujeito a mudanças rápidas, sendo por isso considerado uma propriedade básica. A textura do solos influencia nos

atributos físicos e químicos do solo, como capacidade de trocas catiônicas (CTC), capacidade de retenção de água, porosidade e velocidade de infiltração de água no solo (VIB).

Os solos arenosos possuem baixa CTC, pequena capacidade de retenção de água com uma maior predominância de macroporos, facilitando a infiltração de água e lixiviação de nutrientes como possivelmente ocorra nas áreas de P e R (Planossolo); SAF (Argissolo) (Figura 3). Por outro lado os solos orgânicos e de textura argilosa, geralmente com maior CTC, apresentam uma maior capacidade de retenção de água podendo ter predomínio de microporos. A textura do solo influencia diretamente na conservação da MOS, pois solos arenosos possuem maior aeração em seu perfil, são mais bem drenados e por tanto promovem uma rápida mineralização da MOS ao contrário do que ocorre em solos de textura argilosa como pode ser visto na Figura 3, a área cultivada com M (Organossolo).

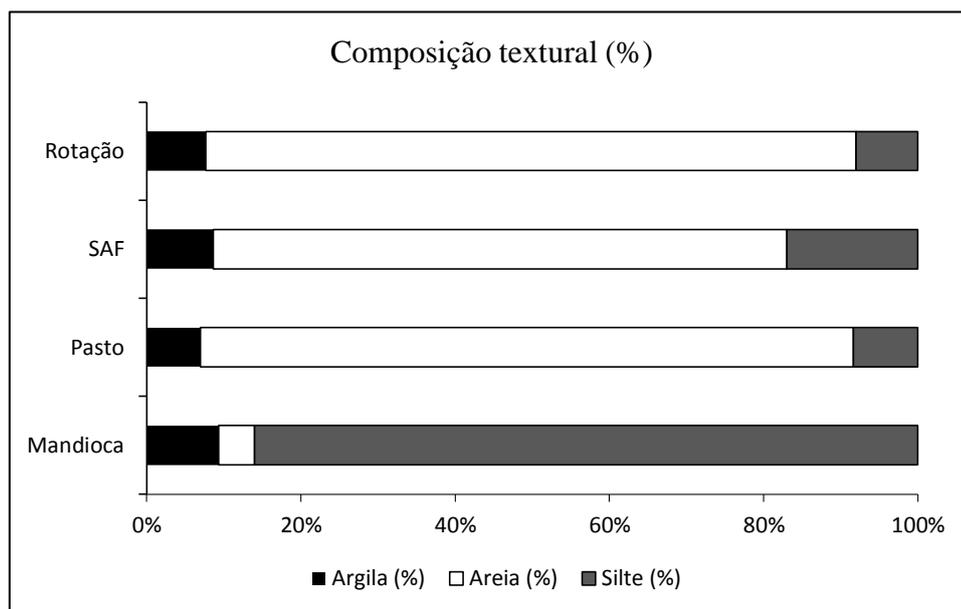


Figura 2: Composição textural

Outras duas importantes propriedades do solo que podem sofrer alterações em decorrência do manejo são Diâmetro médio Ponderado (DMP) e o Diâmetro médio Geométrico, quanto maior for a porcentagem de agregados retidos nas peneiras de maiores diâmetro de malhas do aparelho, maior será o DMP, já o DMG está relacionado a estimativa do tamanho dos agregados de maior ocorrência retidos. O tamanho e estabilidade dos agregados são influenciados pela textura, teor de MOS e principalmente manejo (ANGULO et al., 1984). Apesar do Organossolo cultivado com M ter um maior teor de MO, as amostras da área apresentaram menores valores de DMP e DMG enquanto os valores obtidos na área de P (Planossolo) e SAF (Argissolo) foram maiores, possivelmente este fato esteja relacionado ao tipo de preparo adotado na área de plantio M, sendo que o produtor utiliza um arado de disco para confeccionar leiras ou camalhões para o cultivo de M, e na época da coleta de amostras de solo, esta área tinha sido submetida à uma aração e gradagem para novo plantio, e as áreas de Planossolo e Argissolo cultivadas estavam em pousio o que pode ter proporcionado maiores índices de DMP e DMG nas áreas de SAF, P e R (MENDONÇA & ROWELL, 1994).

Pode se concluir que o preparo adotado no cultivo de mandioca seja mais agressivo com um caráter menos conservacionista do que o manejo adotado no SIPA.

Tabela 2: Determinação do Diâmetro médio Ponderado (DMP) e o Diâmetro médio Geométrico

Áreas	(DMP e DMG)	
	DMP	DMG
	----- (mm) -----	
Mandioca	3,58	2,66
Pasto	4,37	3,35
SAF	4,05	3,13
Rotação	4,40	3,53

4.3) Determinação da composição elementar das frações húmicas

A composição elementar e as propriedades avaliadas se mostraram diferentes nos AH obtidos a partir das amostras das diferentes áreas (Tabela 3). Os AH extraídos dos solos do SIPA possuem menores conteúdos de C, N, relação C/N, maior relação H/C e ω em comparação com os AH do Organossolo M. Os AH extraídos dos solos de P e em R apresentaram os menores conteúdos de C, N, relação C/N e maiores conteúdos de O e ω . Dentre os AH extraídos dos solos do SIPA, os AH extraídos do SAF apresentam uma maior semelhança com os AH dos solos orgânico, especificamente nos conteúdos de C, N, relação C/N e ω (Tabela 3), provavelmente a textura do solo destas áreas estejam contribuindo para esta proximidade.

Tabela 3: Composição elementar, relações atômicas e propriedades dos AH extraídos dos solos em diferentes manejos.

	C	H	N	O	H/C	C/N	ω^a	v^b	δ^c
	-----%-----								
M	48,27	5,11	2,66	43,96	1,27	21,19	1,72	0,63	1,57
P	34,34	8,38	2,31	54,97	2,96	17,45	2,99	0,63	1,58
SAF	45,11	7,66	2,53	44,69	2,04	20,81	1,81	0,69	1,45
R	34,73	8,17	2,46	54,64	2,84	16,56	2,94	0,63	1,59

a: grau de oxidação
b: volume
c: densidade

A análise da composição elementar (PCA) agrupa os AH segundo o conteúdo de cada elemento (Figura 4A). Na PC-1 (68,9% da variância explicada, PC-1+PC-2=90,3%) se separaram os AH em dois grupos, a valores negativos da componente se agruparam os AH de P e R em relação com o elevado conteúdo de O, H/C e ω , enquanto que, a valores positivos da componente se agruparam os AH de SAF e M em relação com um elevado conteúdo de C, N e C/N. A PCA reafirma que atendendo à composição, os AH de SAF se mostram mais semelhantes aos AH do solo orgânico de referência. Este agrupamento observado em PCA foi confirmado mediante o dendograma de agrupamento, onde se obteve um grupo composto pelos AH de R e P e outro grupo que contém os AH de SAF e M (Figura 4B).

Estes resultados indicam que em termos de composição elementar, no sistema SAF podem estar se desenvolvendo processos de transformação da MOS onde se originam AH com características composicionais mais semelhantes às presentes nos AH de solos orgânicos de referência. Por outro lado, nos sistemas de P e R, os processos de humificação originam AH mais diferentes aos presentes no Organossolo, isto porque, nestes sistemas P e R, os AH apresentaram maior relação C/H, conteúdo de O e grau de oxidação, o que significa uma menor aromaticidade (GONZÁLEZ-PÉREZ et al. 2004) e maior oxidação que os AH de SAF e do solo orgânico, padrão que pode estar associado a textura mais arenosa nas áreas de P e R. Estas evidências são as primeiras a indicar que para finalidades de acúmulo e em termos de qualidade da MO humificada nestes solos, um sistema SAF seria o mais indicado para a recuperação e formação de MO de maior qualidade quando comparados com os sistemas de R e P.

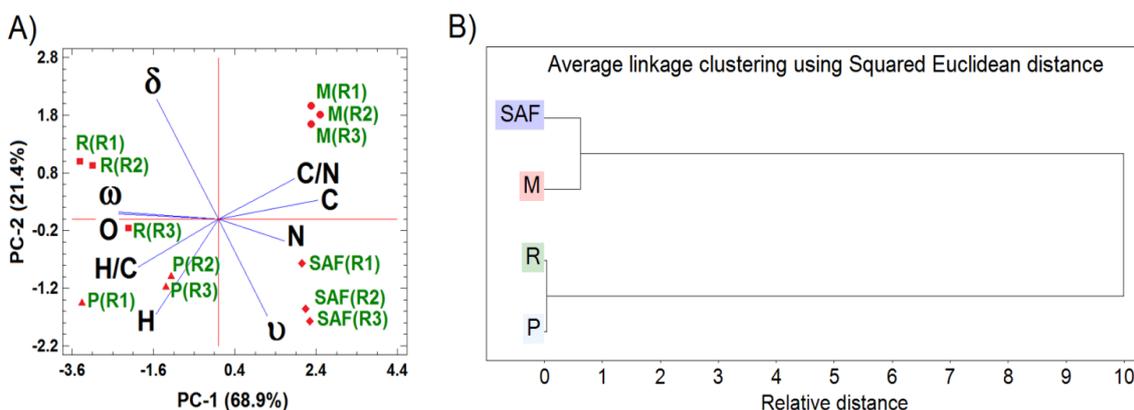


Figura 3: Análises de componentes principais (A) e dendrograma resultante da análise de agrupamento realizado a partir da composição dos AH (B).

4.4) Quantificação isotópica e fracionamento químico das substâncias húmicas

No intuito de que não ocorresse perdas de características estruturais do complexo universo estrutural da MOS, o fracionamento foi realizada com amostras representativas de todo o horizonte estudado na profundidade de (0-0,20 m) (LOSS, 2008), na Figura 5A é apresentado o teor de carbono orgânico total das áreas de estudo, com destaque para a área de Organossolo cultivada com M seguida pelas áreas de SAF, apresentaram maiores valores de COT. A área P é utilizada para o pastejo de rebanho orgânico, e não é submetida à nenhum tipo de preparo de solo a não ser a limpeza de espécies de plantas invasoras, e como o sistema radicular fasciculado das gramíneas se renovam constantemente e o maior volume de raízes se concentra na profundidade estudada (0-0,02m), isto pode ter proporcionado maiores teores de COT em relação a R uma vez que essa área está se encontra sob o cultivo intensivo de hortaliças exigindo constantemente o preparo mecanizado do solo para implantação de culturas, acelerando o processo de mineralização e queima da MOS.

Ainda através da análise das Figuras (1B e 1C) nota-se que a maior parte do COT se encontra na fração humina (FHU) nos sistemas de SAF, R e P sendo esta a fração mais pesada, de maior peso molecular quando comparado aos pesos moleculares do AF e AH presente nas áreas de Argissolo seguida pelo Planossolo, ficando está em maior quantidade quando comparado às frações FAH e FAF que apresentam maior labilidade no solo. Padrão contrário foi verificado nas áreas cultivadas com M (Organossolo) que apresenta maiores teores de COT nas frações FAF e FAH, o que pode sugerir que a classe de solo, possivelmente pelo predomínio de material orgânico em sua composição atrelado ao seu

ambiente de formação em uma condição de influência do lençol freático possam, estar influenciando na conservação e formação das frações humificadas.

Os resultados do $\delta^{13}\text{C}$ apresentados na (Figura 5 D), mostram que as áreas de M e SAF apresentaram predomínio de carbono de origem de plantas C_3 com valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -15 e -18‰ (BOUTTON, 1996). O mecanismo fotossintético da planta de mandioca assim como da maioria das espécies arbóreas que constituem o SAF são plantas com anatomia pertencentes ao grupo das plantas C_3 , discriminam o ^{13}C , fixando preferencialmente o isótopo ^{12}C de menor peso molecular quando comparado com o isótopo de ^{13}C , mais pesado (Angelov et al., 1993) mostrando a concordância com os valores indicados na análise isotópica e histórico de uso das áreas e profundidade estudada (0 - 0,02m). Já nas áreas de P e R foram quantificados valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -20 e -23‰ característicos de plantas com mecanismo fotossintético C_4 (GOUVEIA et al., 2000), uma vez que a área de P e constituída por espécies forrageiras gramíneas as quais possuem sistema radicular volumoso que promove um grande incremento de biomassa através da decomposição de suas raízes (ARAÚJO et al., 2014), e a área de R recebe o uso de adubação verde e aplicação de condicionador de solo, o Bokashi feito à base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) o que justificam a maior proporção de carbono de origem vegetal C_4 encontrada. Ou seja, pode ser concluído que as áreas de M e SAF apresentaram MOS com predomínio de C^{12} e as áreas de Pastagem e Rotação de culturas tiveram MOS predominantemente constituída de C^{13} (GOUVEIA et al., 2005, ALVES et al., 2005).

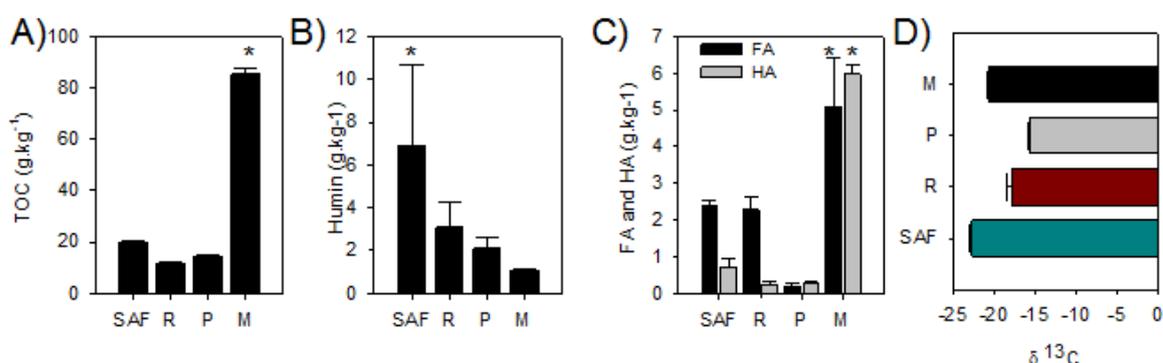


Figura 4: A) Teor de carbono orgânico total, B) Teor de Húmina, C) Teor de Ácido Fúlvico e Ácido Húmico, D) Áreas de Mandioca (M) e SAF, predomínio de carbono de origem de plantas de ciclo fotossintético C_3 , valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -20‰ e -32‰ (media: -27‰). As áreas de Pastagem (P) e Rotação (R) tiveram predomínio de carbono de origem de plantas com ciclo fotossintético C_4 apresentam valores entre -9‰ e -17‰ (media: -13‰).

4.5) Caracterização dos AH mediante espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho fornece informações sobre a presença de grupamentos funcionais mostrou um padrão semelhantes entre todos os AH (Figura 6). Os AH possuem grupamentos funcionais pertencentes a estruturas orgânicas, mas também uma contribuição importante de estruturas inorgânicas. Na fração orgânica, as bandas localizadas em $3311\text{-}3376\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas a estiramentos de hidroxilas ($\nu\text{ O-H}$) pertencentes a carboxilas, álcoois, fenóis e/ou estiramentos $\nu\text{ N-H}$ pertencentes à amino ou amida. As bandas entre $2980\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ pertencem a vibrações de estiramentos de grupos alifáticos $\nu\text{ C-H}$, assimétricos e simétricos de CH_2 e CH_3 . As bandas entre $1655\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ pertencem a vibrações de estiramentos $\nu\text{ C=C}$ (aromáticos e olefínicos) e $\nu\text{ C=O}$ (amidas I, cetonas e

quinonas). Bandas localizadas entre 1150-1050 cm^{-1} pertencem a estiramento O-H de álcoois alifáticos e polissacarídeos (GONZÁLEZ-PÉREZ et al. 2004; BAIGORRI et al. 2009; DROUSSi et al. 2009; SHIRSHOVA et al. 2006; AMIR et al. 2010; LI et al. 2011; KUMAR et al. 2015; MUSCOLO et al. 2007). Na fração inorgânica, as bandas em 3096 cm^{-1} , 3019 cm^{-1} e 911 cm^{-1} podem ser atribuídas a estiramento ν O-H de caulinita (K). Houve uma contribuição importante também das bandas entre 1010-1090 cm^{-1} responsáveis pelos estiramentos ν Si-O de silicatos presentes em K. As bandas presentes em 420-560 cm^{-1} pertencem a minerais do tipo Hematita (H) (RUSSELL e FRASER 1994, PARKER 1969).

Embora haja uma semelhança nos espectros dos AH, algumas particularidades podem ser observadas. Os AH extraídos do Organossolo cultivado com M apresentam bandas de absorção mais resolvidas entorno a 1713 cm^{-1} , esta banda pode ser atribuída principalmente a estiramentos ν C=O de carboxilas (-COOH). A ausência desta banda (1713 cm^{-1}) pode indicar a baixa evolução dos AH dos solos P, R e SAF e/ou maior comprometimento destes grupamentos em ligações (possivelmente com a fração inorgânica) quando comparados com o solo M. Por outro lado, os AH extraídos dos solos P, mostram uma elevada intensidade nas bandas responsáveis pela presença de estruturas minerais, indicando a elevada possibilidade de formação de ligações entre os componentes humificados da MO com a fração mineral deste solos com elevados conteúdos de areia (Figura:3).

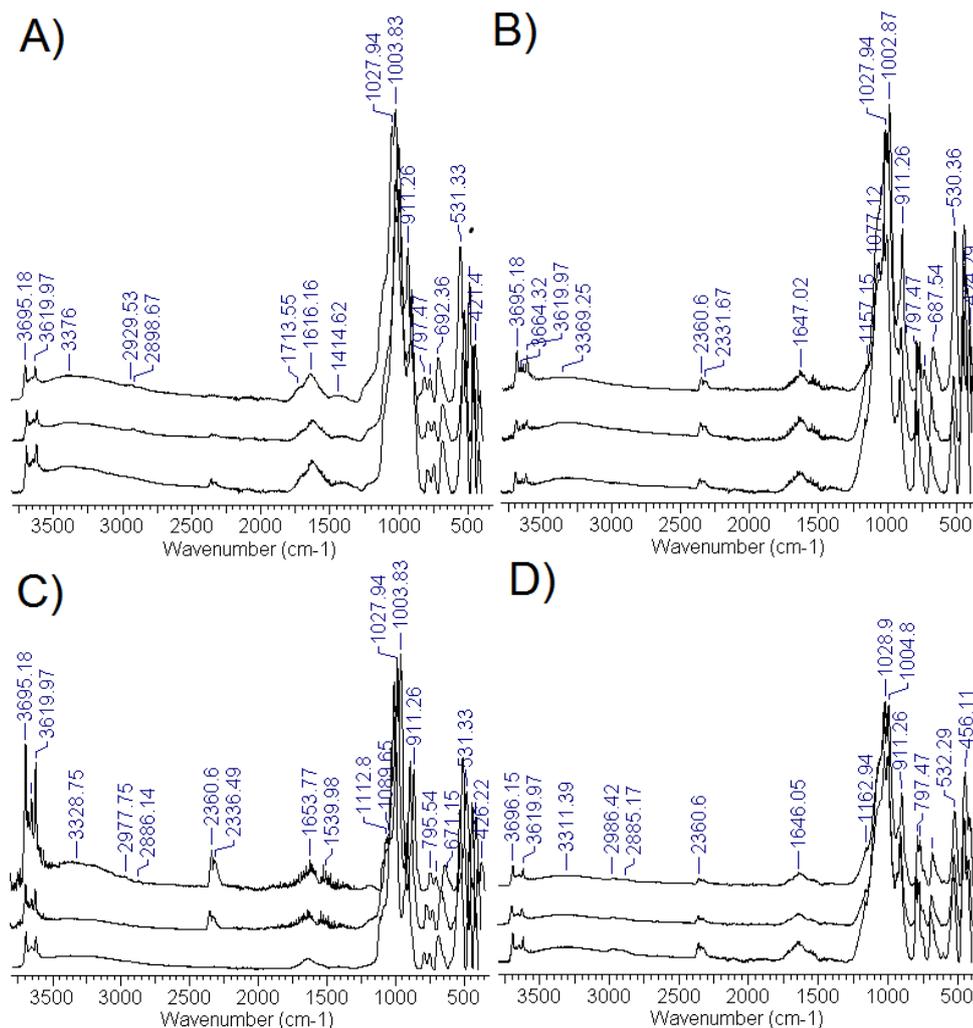


Figura 5: Espectros obtidos dos AH na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). AH de solos orgânicos em cultura de mandioca (A), SAF (B), Pastagem (C) e Rotação (D).

4.6) Caracterização dos AH mediante ^{13}C NMR do estado sólido (CP-MAS ^{13}C NMR)

Os AH de todos os solos apresentaram semelhanças em termos de presença estrutural. A assinatura espectral que registram os AH corresponde à presença de sinais de carbonos sp^3 e sp^2 (Figura 7). Os reflexos presentes em ~ 24 ppm e ~ 32 ppm correspondem a carbonos CH_3 ($^*\text{CH}_3\text{-R}$, $\text{R}=\text{alquil}$) e CH_2 ($\text{R-}^*\text{CH}_2\text{-R}'$, $\text{RR}'=\text{alquil}$). Reflexos em ~ 55 ppm pertencem a carbonos CH_3 ($^*\text{CH}_3\text{-O-R}$, $\text{R}=\text{alquil}$). Os picos em ~ 70 ppm pertencem a carbonos CH_2 ($\text{R-}^*\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{R}=\text{monossacarídeo}$) e os reflexos em $\sim 100\text{-}105$ ppm correspondem a carbonos anoméricos de unidades de monossacarídeo. Os reflexos em $\sim 129\text{-}130$ ppm pertencem a carbonos de anéis aromáticos (fenil-R, $\text{R}=\text{H}$). Reflexos em $\sim 172\text{-}175$ ppm são atribuídos a COO ($\text{RO-}^*\text{CO-R}'$, $\text{R}=\text{H}$ e $\text{R}'=\text{arilo}$) e em $\sim 206\text{-}209$ ppm a C=O ($\text{R-}^*\text{CO-R}'$, $\text{RR}'=\text{alquil}$) (KEELER et al. 2006; SPACCINI & PICCOLO, (2007); SONG et al. 2008; NOVOTNY et al. 2008)).

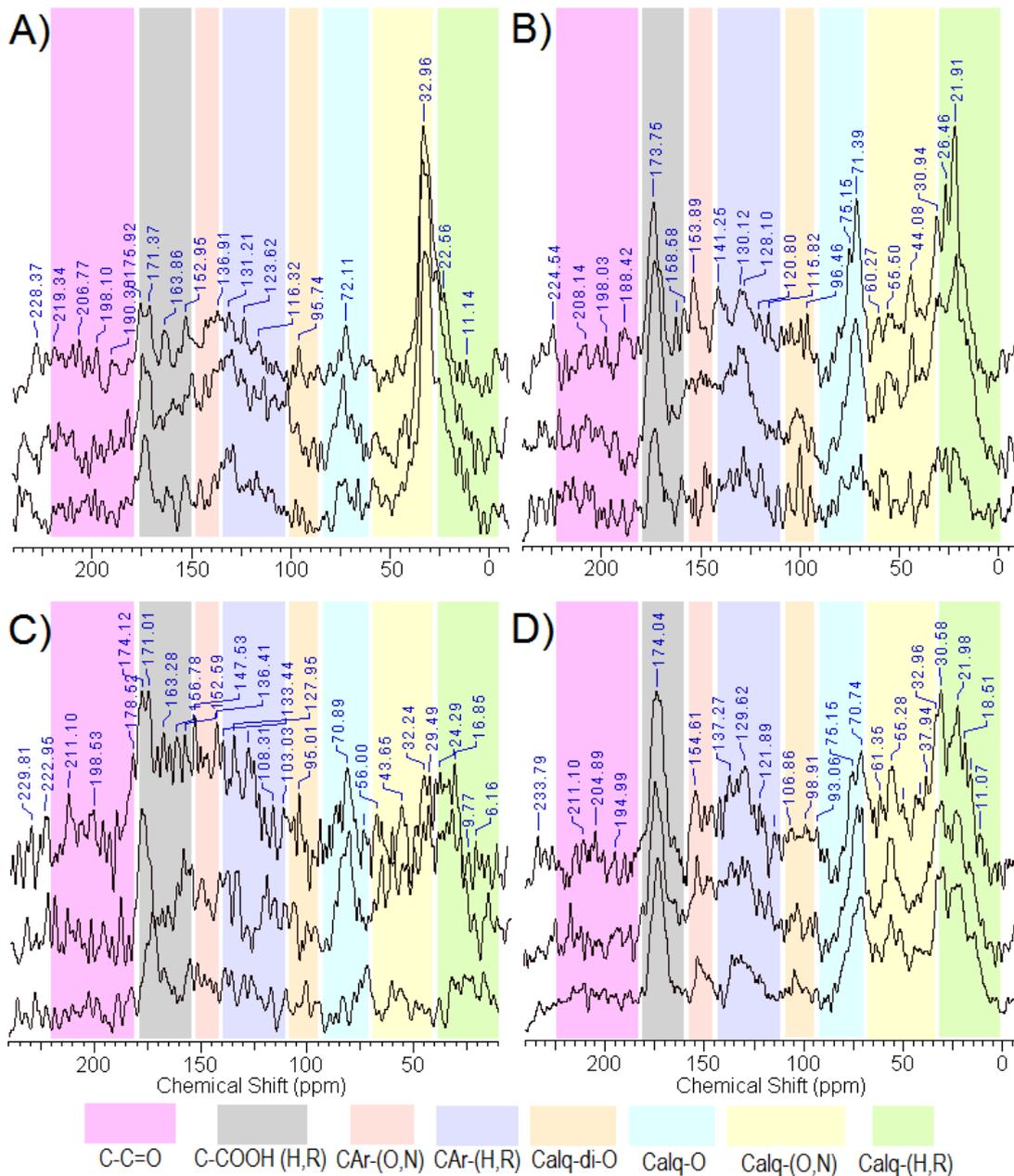


Figura 6: Espectros obtidos dos AH mediante CP-MAS ^{13}C NMR. AH de solos orgânicos em cultura de mandioca (A), SAF (B), Pastagem (C) e Rotação (D).

Embora a presença das estruturas seja semelhante, a distribuição dos tipos carbonos foram diferente para os tipos de manejo (Tabela 4). Os AH presentes em Organossolo (M) apresentam predomínio de estruturas alifáticas ($\text{C}_{\text{Alk-H,R}}$) e aromáticas ($\text{C}_{\text{Ar-H,R}}$) com baixa funcionalização (O, N) quando comparadas com os AH dos Planossolo e Argissolo (P, R e SAF). Estes resultados estruturais confirmam os obtidos nas análises de composição elemental (Tabela 4). Os AH obtidos dos Planossolo e Argissolo com diferente manejo mostraram predomínio de estruturas alifáticas funcionalizadas ($\text{C}_{\text{Alk-O,N}}$; $\text{C}_{\text{Alk-O}}$; $\text{C}_{\text{Alk-di-O}}$) reafirmando a elevada relação H/C. Os AH destes solos também apresentaram maiores conteúdos de carbonos $\text{C}_{\text{COO-H,R}}$ quando comparados com os AH do Organossolo, justificando os elevados valores de O e grau de oxidação obtidos na composição elemental. Por outro lado, a aromaticidade e alifaticidade calculada mediante RMN mostram que os AH originados do

sistema de P e de R são os mais alifáticos, enquanto que, os AH originados no sistema SAF apresentam uma aromaticidade semelhante com os AH dos Organossolo.

Tabela 4: Distribuição dos tipos de carbono presente nos AH.

	0-46	46-59	59-91	91-110	110-142	142-156	156-186	186-230	Arom	Alph
	$C_{Alk-H,R}$	$C_{Alk-O,N}$	C_{Alk-O}	$C_{Alk-di-O}$	$C_{Ar-H,R}$	$C_{Ar-O,N}$	$C_{COO-H,R}$	$C_{C=O}$		
M	34,88	3,49	8,14	3,49	19,77	8,14	13,95	8,14	31,39	68,60
P	30,43	5,43	13,04	5,43	13,04	8,70	15,22	8,70	27,17	72,82
SAF	18,68	5,49	12,09	6,59	15,38	12,09	19,78	9,89	32,96	67,03
R	29,79	8,51	13,83	4,26	14,89	7,45	14,89	6,38	30,85	69,14
Arom (aromaticidade):										
Aliph (alifaticidade):										

4.7) Tratamento quimiométrico aos dados espectrais mediante análise multivariada. Análises de componentes principais (PCA).

A PCA (64 % da variância total explicada) obtida a partir dos espectros puros de RMN mostra uma separação de dois grupos de AH na PC-1 (42 % da variância total explicada), um grupo que compõe aos AH obtidos do Organossolo (M) a valores positivos da PC-1 e outro grupo composto pelos AH obtidos dos Planossolo e Argissolo com diferentes manejos (P, R e SAF) a valores negativos na PC-1. Na PC-2 (22% da variância total explicada) houve uma separação também em dois grupos dos AH obtidos a partir do Planossolo e Argissolo, um grupo composto pelos AH obtidos a partir do sistema SAF (Argissolo) a valores negativos na PC-2 e outro grupo composto pelos AH dos sistemas P e R (Planossolo) a valores positivos na PC-2 (Figura 8A). O carregamento “loadings” mostra que as estruturas alifáticas e carboxilas ($C_{Alk-(H,R)}$, $C_{Alk-O,N}$; C_{Alk-O} ; $C_{Alk-di-O}$, $C_{COO-H,R}$) constituem as de maior contribuição para a separação dos grupos em ambas as componentes (Figura 8C).

Na PCA realizada a partir dos espectros FTIR (85 % da variância total explicada) se mostra uma separação de dois grupos, porém com uma distribuição diferente à obtida na PCA-RMN (Figura 8A). Os AH de SAF e de solos orgânico (M) mostraram um padrão de agrupamento a valores positivos da PC-1 (72 % da variância total explicada) enquanto que P e R se agruparam a valores negativos da PC-2 (13 % da variância total explicada). Como visto nos espectros FTIR na Figura (Figura 8B), os “loadings” mostram maior contribuição dos grupamentos funcionais pertencentes carboxilas e os provenientes da fração inorgânica na separação dos grupos (Figura 8D).

Em termos de relação entre a origem do carbono e a estrutura dos AH, a análise de PCA ^{13}C -RMN indica que não há uma influência direta no tipo de vegetação presente nos solos (que fornece o carbono vegetal incorporado nos AH) com as características estruturais desta fração, isto em relação ao tipo de carbono presente. Isto significa que, plantas de ciclo fotossintético C_3 ou C_4 , neste tipo de solos originam AH com os mesmos tipos de estrutura (Figura 8A). Porém, a análise de PCA-FTIR indica que o tipo de vegetação ($\delta^{13}C$) apresenta uma influência nos grupamentos funcionais ou disposição destes grupamentos nos AH (Figura 8B). A interpretação a estes resultados indica que a formação de AH nestes solos não está influenciada pelo tipo de vegetação onde nos solos com ambos os tipos (C_3 ou C_4), haveria formação de AH estrutural e presencialmente semelhantes, porém, haveria uma influência do tipo de vegetação nas quantidades das estruturas nos AH, o que pode originar propriedades

distintas em função desta organização estrutural supramolecular. Isto é especialmente importante porque a partir desta distribuição estrutural se originam as propriedades destas SH.

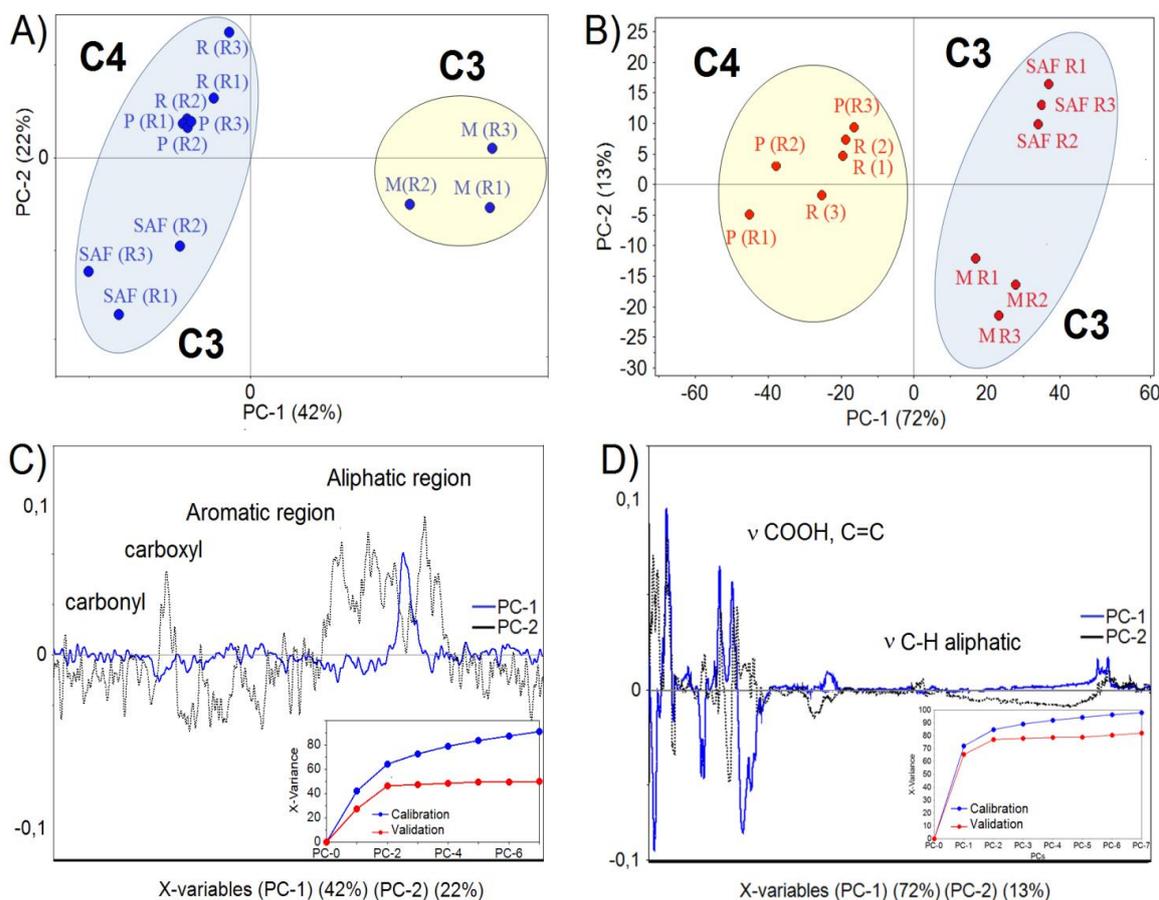


Figura 7: Análises de componentes principais (PCA), realizado pelo carregamento dos espectros puros CP-MAS ^{13}C NMR dos AH, “scores” (A) e “loadings” (C). PCA realizado pelo carregamento dos espectros FTIR dos AH, “scores” (B) e “loadings” (D).

4.8) Relação entre as variáveis estrutrais e composicionais dos AH e alguns atributos físicos e químicos dos solos.

O primeiro resultado de importância a destacar na Figura 9 é a relação que apresentam as características estrutrais e composicionais dos AH com os atributos tanto químicos quanto físicos dos solos (agrupamento na parte superior da Figura 9). A influência das SH na fertilidade nos atributos dos solos tem sido amplamente relatada na literatura (MADEMOV et al., 2016; PICCOLO et al. 1999; SENESI and PLAZA. 2007; KÖGEL-KNABNER et al. 1992; TAN 2014; PIZZEGHELLO et al. 2015), porém, neste estudo se mostra qual o tipo de estrutura dos AH apresenta relação com os atributos químicos ou físicos separadamente. Por outro lado, estes resultados reafirmam o agrupamento dos três tipos de manejo nos solos da área de estudo se diferenciando da área de Organossolo (M) (agrupamento na parte superior da Figura 9).

Através da análise da Figura 9 verifica-se que nas áreas com os diferentes tipos de manejo (P, R e SAF) as estruturas dos AH são predominantemente lábeis e mais funcionalizadas ($\text{C}_{\text{alq-O}}$, $\text{C}_{\text{alq-(O,N)}}$, $\text{C}_{\text{COOH-(H,R)}}$, $\text{C}_{\text{Ar-O}}$ e $\text{C}_{\text{alq-di-O}}$) e são as que apresentam

uma relação com a textura do solo, enquanto as estruturas predominantemente recalcitrantes e menos funcionalizadas (CAr-(H,R), Calq-(H,R) e CC=O) mostram relação com atributos químicos.

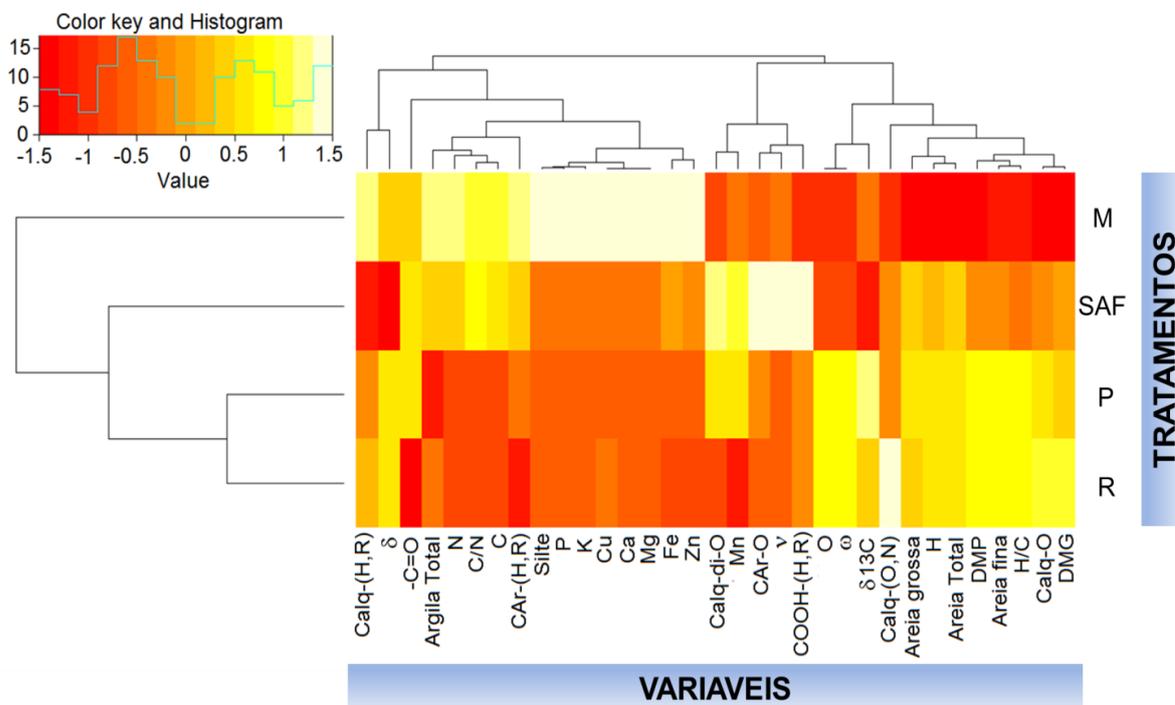


Figura 8: Gráfico de calor (Heat graphic) mostrando a relação entre as variáveis estruturais e composicionais dos AH e alguns atributos físicos e químicos dos solos.

Os resultados estruturais e da composição dos AH mostram que a prática de sistemas de manejo de rotação, pastagem e sistema agroflorestal no SIPA não originaram ainda SH com as características estruturais presentes nos AH de Organossolo escolhido como referência. Os sistemas de manejo adotados no SIPA para as classes de solo (Planossolo e Argissolo) propiciam AH de menor complexidade estrutural (aromaticidade), maior grau de oxidação (ω) e funcionalização química. A espectroscopia FTIR e as análises de FTIR-PCA dos AH extraídos das amostras provenientes do SIPA apresentam uma elevada ligação com a fração inorgânica, o que pode ser explicado textura destes solos (Figura 9).

Os AH extraídos do sistema SAF apresentam as características composicionais e estruturais mais semelhantes aos AH gerados no Organossolo de referência. Estes resultados sugerem que, em termos de preservação e qualidade da MO humificada, o SAF constitui um tipo de manejo que propicia a formação de AH com natureza química mais humificada. Uma interpretação a partir da abundância isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ nos AH e as suas características estruturais mostram que, o tipo de vegetação (C_3 ou C_4) não influencia a presença de estruturas na formação dos AH. Isto sugere que nestas áreas de estudo, as características minerais dos solos podem ser mais determinantes na formação das SH, influenciando os processos de humificação e por tanto os conteúdos e disposição dos grupamentos funcionais (organização estrutural).

Para entender o significado da preservação de SH e formação de AH com maior estabilidade estrutural na MO destes solos, foram obtidas as curvas de resolução multivariada (MCR) dos AH utilizando os espectros CP MAS ^{13}C RMN. A MCR realizada que considera somente os AH de P e R não mostraram padrões espectrais claros de labilidade e recalcitrância (Figura 10A), no entanto, a porcentagem de labilidade nestes AH foi

predominante quando comparado com a recalitrância, confirmando as características estruturais e composicionais destes AH discutidas anteriormente (Figura 10D). Quando considerados os AH do sistema SAF junto aos sistemas P e R na geração da MCR (Figura 10B), foi observada uma melhor separação na distribuição dos padrões estruturais de labilidade e recalitrância, isto poderia ser interpretado como uma melhor distribuição e organização das estruturas das SH, além disso, a inclusão dos AH de SAF na análise gerou um aumento do valor da labilidade para pastagem (Figura 10B). A realização da MCR com a inclusão dos AH do Organossolos (Figura 10C) originou uma distribuição mais homogênea dos padrões de labilidade e recalitrância, o que poderia ser interpretado como a obtenção de estruturas húmicas com uma distribuição mais regular dos fragmentos estruturais que compõem a supraestrutura das SH, ao mesmo tempo, a inclusão dos AH de Organossolos continuou a gerar um aumento na labilidade do sistema P e SAF e um aumento da recalitrância no sistema R.

Estes resultados teóricos apresentam uma elevada importância prática. Aqui está sendo sugerido que em sistemas onde há formação de SH com baixo grau de evolução e condensação aromática, a aplicação de SH mais evoluídas mediante uma fonte exógena ou um manejo adequado que propicie estas características, poderia ser capaz de gerar “*in situ*” AH com maior recalitrância, no caso do sistema de manejo mais intenso como a rotação (R), isto pressupõe maior preservação de MO humificada nestes solos. No caso de sistemas manejados com menor intensidade como pastagem e SAF, um aumento da labilidade dos AH pressupõe favorecimento dos processos de humificação e mineralização da MOS. Isto foi registrado quando feitos gráficos da labilidade e recalitrância tomando em consideração os pesos dos componentes na MCR para os sistemas de SH mais pobres, rotação e pastagem (Figura 10G e 10H). Para pastagem, a análise indica que uma incorporação de AH mais aromáticos, inclusive de fonte exógena como os AH de Organossolo, aumenta a labilidade das SH formadas nesses solos (Figura 10G) e para rotação, se sugere um aumento da recalitrância nas SH originadas (Figura 10H).

Desde o ponto de vista prático, estes resultados estão indicando que em um sistema agroecológico, onde as práticas de manejo de solos requerem a utilização de insumos orgânicos, seria possível também gerar SH com certo grau de enriquecimento estrutural da MO humificada ainda nas condições destes solos minerais. O resultado obtido neste estudo mediante comprovação teórica a partir do estado atual dos AH indica que para um sistema de manejo mais intenso como a rotação (R), uma incorporação na rotina de manejo de uma fonte orgânica exógena de SH mais estabilizadas, favoreceria a estabilização e preservação de SH nestes solos aumentando a qualidade MO.

É importante que nos solos com manejo de R e P se favoreçam a formação de AH com maior peso molecular, predomínio de estruturas mais aromáticas, recalitrantes e de maior hidrofobicidade, isto propiciaria um aumento na estabilidade dos agregados do solo e diminuiria os efeitos de desagregação (CHANEY & Swift, 1996; PICCOLO & MBAGWU, 1997; PICCOLO & MBAGWU, 1999). No caso do sistema de R, um aumento de estruturas aromáticas funcionalizadas tipo quinonas e semiquinonas também propiciariam as condições adequadas para o desenvolvimento de microorganismos, uma vez que estas estruturas servem como aceptoras e transportadoras de elétrons nos processos de respiração microbiana. Uma maior funcionalização química em AH mais estáveis, poderia gerar efeitos benéficos nos solos tanto da R quanto da P, isto porque, os AH com estas características estruturais aumentam a CTC nos solos e a biodisponibilização de nutrientes (PICCOLO et al. 1982; TAN 2014).

Neste estudo se sugere que a aplicação exógena de SH aos solos da área de estudo poderia contribuir para um aumento da fertilidade. Sabe-se que a aplicação de carbono orgânico favorece o aumento da CTC, capacidade de retenção de água, a agregação do solo

(LAL et al. 2006). As aplicações de VC (vermicomposto) ao solo podem melhorar a estabilidade dos agregados em água, diminuir a densidade do solo e a resistência à penetração (AKSAKAL et al. 2016). A aplicação de SH de lignina e composto mostrou que é possível propiciar o acúmulo de C e possivelmente o aumento da fertilidade dos solos (MONTIEL-ROZAS et al. 2016).

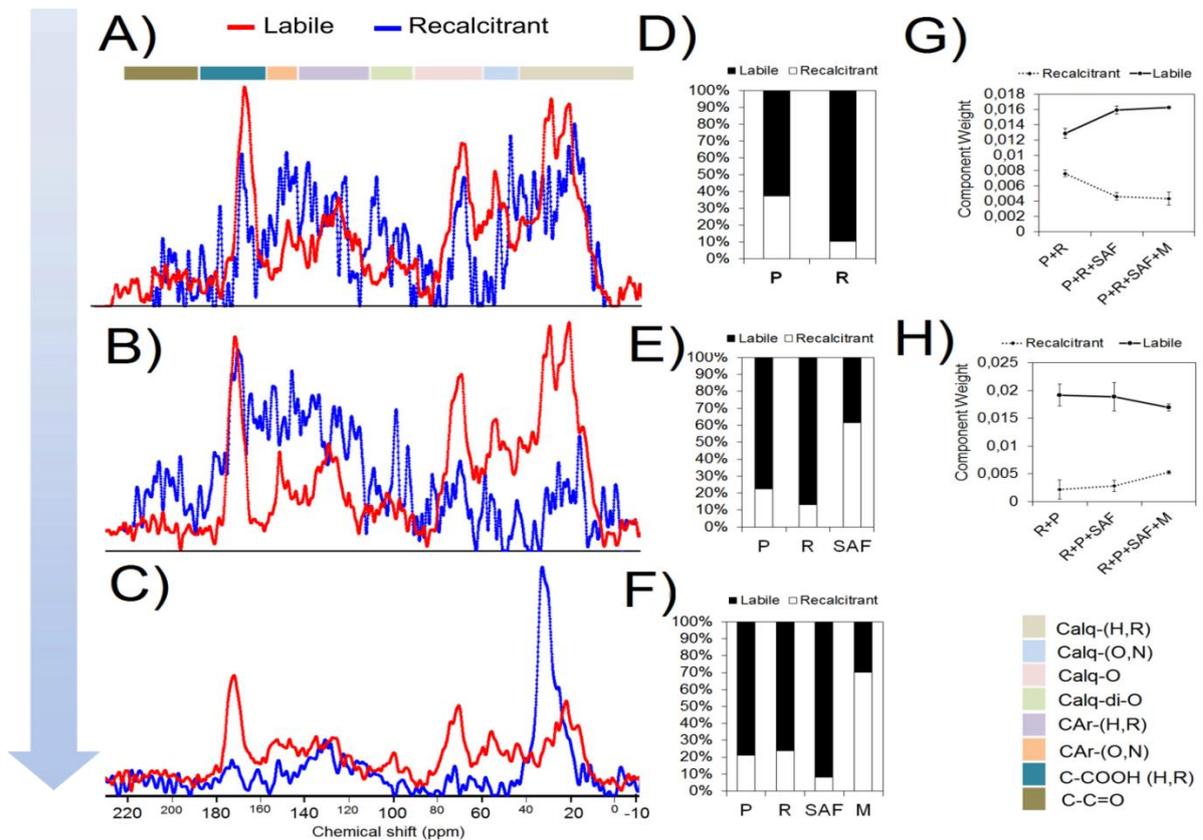


Figura 9: Curva de resolução multivariada (MCR) realizada pelo carregamento dos espectros puros CP-MAS ^{13}C NMR dos AH. MCR considerando somente os sistemas de manejo P e R (A), MCR considerando os sistemas de manejo P, R e SAF (B) e MCR considerando os sistemas de manejo P, R, SAF e M (C). Valores de labilidade e recalcitrância expressos em por cem (%) e calculados a partir dos pesos dos componentes 1 e 2 na saída dos dados da MCR, considerando os sistemas P e R (D), considerando os sistemas P, R e SAF (E) e considerado os sistemas P, R, SAF e M (F). Gráficos G e H expressam o comportamento da labilidade e a recalcitrância quando considerando os sistemas SAF e M segundo os pesos das componentes 1 e 2 obtidos a partir da saída dos dados na MCR para os sistemas de pastagem (G) e rotação (H). Seta em azul no lado esquerdo da Figura indica a incorporação na análise MCR de AH mais aromáticos no sentido P,R→SAF→M.

5) CONCLUSÕES

A caracterização composicional e estrutural dos AH aliados a técnicas quimiométricas constituíram ferramentas para a avaliação crítica da qualidade da MOS em sistemas de produção agroecológica com predomínio de solos minerais. No SIPA estudado, com Planossolo e Argissolo, os sistemas de manejo de R e P (Planossolo) por si só não propiciaram ainda a formação de AH com características estruturais que forneçam estabilidade a MO humificada. Somente o sistema de manejo SAF (Argissolo), propicia no solo a formação de AH com características composicionais e estruturais semelhantes às presentes em AH de um Organossolo. Nestes três sistemas de manejo do SIPA, o tipo de vegetação com ciclo fotossintético diferente não parece ter uma importância determinante na formação e incorporação dos tipos de estruturas nos AH, mas sim nas quantidades destas estruturas e na sua distribuição organizacional húmica.

As análises teóricas quimiométricas indicam que a incorporação e preservação de MO humificada nestes solos pode ser possível em sistemas de manejo intensivo como a R, mediante aplicações de fontes exógenas de SH estabilizada, assim como também o favorecimento dos processos de humificação em sistemas menos manejados como P e SAF. Neste estudo comprova se através das técnicas utilizadas de caracterização e quimiometria aplicadas aos AH de um sistema agroecológico, o estado atual da MOS em termos de estabilidade e enriquecimento estrutural. Propõe-se possíveis vias para a recuperação e preservação das SH em solos minerais que possam contribuir ao aumento das condições de fertilidade e conseqüentemente da produção agrícola.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B.J.R.; CAMPOS, D. V. B. de; P.; S.; M. **Emprego do isótopo estável ^{13}C para o estudo da dinâmica da matéria orgânica do solo.** In: Renato Roscoe, Fábio Martins Mercante, Júlio Cesar Salton. (Org.). *Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionais (Modelagem matemática e métodos auxiliares.* Dourados - MS: Embrapa Agropecuária Oeste, v., p. 133-161, (2006).
- ALVES, B. J. R, ZOTARELLIL, JANTALIA CP, BODDEY RM, URQUIAGA S **Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e do nitrogênio no sistema solo planta.** In: Aquino, A.M.& Assis, R.L., eds. *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável.* Brasília, Embrapa-SCT, 2005.p.343-350. (2005).
- AMIR S, JOURAIPHY A, MEDDICH A, GHAROUS M, WINTERTO P, HAFIDI M **Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: elemental analysis, FTIR and ^{13}C NMR.** J Hazard Mater 177:524-529. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.12.064. (2010).
- ANGELINI, G. A. R. LOSS, A.; PEREIRA, A.C.C.; TORRES, J.L.F.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. **Colonização micorrízica, densidade de esporos e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em solo de Cerrado sob plantio direto e convencional Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 1, p. 115-130, jan./mar. (2012).**
- ANGULO, R.J.; ROLOFF, G. & SOUZA, M.L.P. **Relações entre a erodibilidade e agregação, granulometria e características químicas de solos brasileiros.** R. Bras. Ci. Solo, 8:133-138, (1984).
- ANGELOV, M. N.; SUN, J.; BYRD, G. T.; BROWN, R. H.; BLACK, C. C. Novel characteristics of cassia, *Manihot esculenta* Crantz, a reputed C3-C4 intermediate photosynthesis species. **Photosynthesis Research**, Doedrecht, v. 38, p. 61-72, (1993).
- ARAÚJO, E. A.; KER, C. J.; MENDONÇA, E. S.; SILVA, I. R; OLIVEIRA, E. K. **Impacto da conversão floresta - pastagem nos estoques e na dinâmica do carbono e substâncias húmicas do solo no bioma Amazônico.** Acta Amazônica, v. 41, n. 1, p 103-114, (2014)
- BAIGORRI R, FUENTES M, GONZÁLEZ-GAITANO G, GARCÍA-MINA JM, ALMENDROS G, GONZÁLEZ-VILA FJ. **Complementary multianalytical approach to study the distinctive structural features of the main humic fractions in solution: gray humic acid, brown humic acid, and fulvic acid.** J Agri Food Chem 57:3266-3272. Doi: 10.1021/jf8035353. (2009).
- BASKARAN, M. **Handbook of environmental isotope geochemistry. Advances in isotope geochemistry.** 1a. ed. Ed. New York: Springer, 951 p, (2011).
- BRAND, W. A. **High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry.** Journal of Mass Spectrometry, v. 31, n. 3, p. 225-235, (1996).
- BENSON, S. et al. **Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry - A review.** Forensic Science International, v. 157, n. 1, p. 1-22, (2006).

BENITES, V.M.; MADARI, B.; MACHADO, P.L.O. A. **Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo.** (Comunicado Técnico, 16). Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 7p. (2003).

BOUTTON, T. W. **Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change.** In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S-I. **Mass Spectrometry of Soils.** New York: Marcel Dekker, cap. 2, p. 47-82 (1996).

CAPPUYNS, V.; SWENNEN, R.J. **The application of pHstat leaching tests to assess the pH-dependent release of trace metals from soils, sediments and waste materials.** *Journal of Hazardous Materials*, v.158, p.185-195, (2008).

CARTER, M. R. Organic matter and sustainability. In: REES, B. C.; BALL, B. C.; CAMPBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Ed.). **Sustainable management of soil organic.** Wallingford: CAB International. p. 9-22, (2001).

CANELLAS LP, SANTOS GA **Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas Campos dos Goytacazes.** 309 p.: il (2005).

CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. **Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 233-240, (2004).

CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.L.O. & FAÇANHA, A.R. **Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots.** *Plant Physiol.*, 130:1951-1957, (2002).

CHANEY, K., & SWIFT, R. S. Studies on aggregate stability. 11. **The effect of humic substances on the stability of re-formed soil aggregates.** *Journal of soil science*, 37(2), 337-343. . (1986)

CRUZ, C. D.; REGAZZY, A J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 4. Ed. Viçosa: Editora UFV. 514p, (2012).

DANIELS, B.A SKIPPER, H.D. **Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil.** In: Schenk, N.C. (Ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research.* St. Paul: The American Phytopathological Society, p.29-35, (1982).

DAY, P. R. **Particle fractionation and particle size analysis.** In: Black, C. A. Ed., *methods soil analysis.* Madryson, American Society of Agronomy, n.1 p 545-66, (1965).

DROUSSI Z, D’ORAZIO V, HAFIDI M, Ouattmane A **Elemental and spectroscopic characterization of humic-acid-like compounds during composting of olive mill by-products.** *J Hazard Mater* 163:1289-1297. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.07.136. (2009)

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo.** 2.ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 212p, (1997).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** EMBRAPA/CNPS. Rio de Janeiro. 305p, (2006).

EKREM LUTFI AKSAKAL, SERDAR SARI, ILKER ANGIN. **Effects of Vermicompost Application on Soil Aggregation and Certain Physical Properties.** Land Degrad. Develop. 27: 983–995 (2016).

Façanha, A.R.; Façanha, A.R.; Olivares, F.L.; Velloso, A.C.X.; Braz-filho, R.; Santos, G.A. & Canellas, L.P. **Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento de prótons.** Pesq. Agropec. Bras., 37:1301-1310, (2002).

FELLET, G.; MARMIROLI, M.; MARCHIOL, L. **Elements uptake by metal accumulator pecies grown on mine tailings amended with three types of biochar.** Science of the Total Environment, v.468, p.598-608, (2014).

Gerdemann, J. W.; Nicholson, T.H. **Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting.** Transactions of the British Mycological Society, v.46 p. 235-244, (1963).

Goto, B. T. & Maia, L. C. **Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota.** Mycotaxon 96, 129-132, (2006).

González-Pérez JA, González-Vila FJ, Almendros G, Knicker H. **The effect of fire on soil organic matter-a review.** Environ Int 30:855-870. doi:10.1016/j.envint.2004.02.003. (2004)

Gouveia SEM, Pessenda LCR, Aravena R, Boulet R, Scheel-Ybert R, Bendassoli JA, Ribeiro AS, Freitas HA. **Carbon isotopes in charcoal and soils in studies of paleovegetation and climate changes during the late Pleistocene and the Holocene in the southeast and centerwest regions of Brazil Global and Planetary Change.** 33:95–106, (2005)

GOUVEIA SEM and PESSENDA LCR. **Datation par le 14C de charbons inclus dans le sol pour l'étude du rôle de la remontée biologique de matière et du colluvionnement dans la formation de latosols de l'état de São Paulo. Brésil.** C. R. Acad. Sci. Paris Serie 2A 330: 133-138, (2000).

GRASSINEAU, N. V. **High-precision EA-IRMS analysis of S and C isotopes in geological materials.** Applied Geochemistry, v. 21, n. 5, p. 756-765, (2006).

Hayes, K.R. **Ecological risk assessment for ballast water introductions: a suggested approach.** ICES Journal of Marine Science 55, 201–212, (1998).

HAYES, T.M.; HAYES, M.H.B.; SKJEMSTAD, J.O.; SWIFT, R.S. & MALCOLM, R.L. **Isolation of humic substances from soil using aqueous extractants of different pH and XAD resins, and their characterization by 13C-NMR.** In: CLAPP, C.E., ed. **Humic substances and organic matter in soil and water environments: Characterization, transformations and interactions.** Birmingham, IHSS, p.13-24, (1996).

HMID, A.; AL CHAMI, Z.; SILLEN, W.; DE VOCHT, A.; VANGRONSVELD, J. **Olive mill waste biochar: a promising soil amendment for metal immobilization in contaminated soils.** Environmental Science and Pollution Research, v.22,p.1444-1456, (2015).

IHSS, 2013. **International Humic Substances Society**. Disponível em: <http://www.humicsubstances.org/>. Acesso em: 15 04 2014.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**, 4. ed, CRC Press, Boca Raton, 520 p. (2011).

Keeler, C.; Kelly, E.F.; Maciel, G.E. **Chemical–structural information from solid-state ¹³C NMR studies of a suite of humic materials from a lower montane forest soil, Colorado, USA**. *Geoderma*, v.130, p.124-140, (2006).

KELLY, S. D.; RHODES, C. **Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry**. *Grasas Y Aceites*, v. 53, n. 1, p. 34-44, (2002).

KHATTREE, R. & NAIK, D.N. **Multivariate data reduction and discrimination with SAS software**. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. 558 p.(2000).

Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J. W., & Hatcher, P. G. **Nature and distribution of alkyl carbon in forest soil profiles: implications for the origin and humification of aliphatic biomacromolecules**. *Science of the Total Environment*, 117, 175-185, (1992).

Kumar MS, Rajiv P, Rajeshwari S, Venckatesh R. **Spectroscopic analysis of vermicompost for determination of nutritional quality**. *Spectrochim Acta* 135:252-255, (2015).

Lal, R. **Enhancing crop yields in the developing countries through restoration of the soil organic carbon pool in agricultural lands**. *Land Degradation & Development*, 17(2), 197-209, (2006)

LAL, R. **Enhancing crop yields in the developing countries**, (2006).

LI X, MEIYAN X, JIAN Y, ZHIDONG H. **Compositional and functional features of humic acid-like fractions from vermicomposting of sewage sludge and cow dung**. *J Hazard Mater* 185:740-748. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.081, (2011).

LOSS, Arcangelo. **Frações orgânicas e agregação do solo em diferentes sistemas de produção orgânico**. Seropédica, 2008. 62 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Ciências do Solos) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciências do Solos - CPGACS, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

MAMEDOV, A. I., BAR-YOSEF, B., LEVKOVICH, I., ROSENBERG, R., SILBER, A., FINE, P., & LEVY, G. J. **Amending Soil with Sludge, Manure, Humic Acid, Orthophosphate and Phytic Acid: Effects on Infiltration, Runoff and Sediment Loss**. *Land Degradation & Development*. (2016).

MAR MONTIEL-ROZAS, M., PANETTIERI, M., MADEJÓN, P., & MADEJÓN, E. **Carbon Sequestration in Restored Soils by Applying Organic Amendments**. *Land Degradation & Development*. (2015).

MARTINELLI, L. A. et al. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. 1a. ed. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 144 p, (2009).

MEIER-AUGENSTEIN, W. **Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry**. *Journal of Chromatography A*, v. 842, n. 1-2, p. 351-371, (1999).

MENDONÇA, E.S. & ROWELL, D.L. **Dinâmica do alumínio e de diferentes frações orgânicas de um Latossolo argiloso sob cerrado e soja.** R. Bras. Ci. Solo, 18:295-303, (1994).

MOREIRA, F.M.S. SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 729p, (2006).

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. **The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation.** Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1465, n. 1/2, p. 1-16, (2000).

MUSCOLO A, SIDARI M, ATTINÁ E, FRANCIOSO O, TUGNOLI V, NARDI S. **Biological activity of humic substances is related to their chemical structure.** Soil Sci Soc Am J 71:75-85. doi:10.4161/psb.5.6.11211, (2007).

NANNIPIERI, P., GREGO, S., DELL'AGNOLA, G., NARDI, S. **Proprietà biochimiche e fisiologiche della sostanza organica.** In: Nannipieri, P (ed.): Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici, chimici, ecologici, ecologici e selvicolturali. Bologna: Patron Editore, p.67-78, (1993).

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. & VIANELLO, A. **Physiological effects of humic substances on higher plants.** Soil Biol. Biochem., 34:1527-1536, (2002).

NOVOTNY, E. H., KNICKER, H., MARTIN-NETO, L., AZEREDO, R. B. V., & HAYES, M. H. B. **Effect of residual vanadyl ions on the spectroscopic analysis of humic acids: a multivariate approach.** *European journal of soil science*, 59(3), 439-444, (2008).

NOVOTNY, E. H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo.** Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 231p. Tese (Doutorado em Ciências - Físico Química). (2004).

ORLOV, D.S. **Humic substances of soils and general theory of humification.** A.A. Balkema, Rotterdam, (1995).

ORLOV, D.S. **Humus Acids of Soils.** Moscow University Press. Translated from Russian. TAN, K.H (Ed.). Amerind Publ. New Delhi, India, (1985).

PARKER, T. W. **A classification of kaolinites by infrared spectroscopy.** *Clay Minerals*, 8(2), 135-141, (1969).

PAZ-FERREIRO, J.; LU, H.; FU1, S.; MÉNDEZ, A.; GASCÓ, G. **Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review.** *Solid Earth*, v.5, p.65-75, (2014).

PEREIRA, M.G.; ANJOS, L.H.C.; VALLADARES, G.S. **Organossolo: Ocorrência, gênese, classificação, alterações pelo uso agrícola e manejo.** In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, Á.P.; CARDOSO, E.J. (Org.). *Tópicos em Ciência do Solo*. 4.ed. Viçosa, v.4, p.233-276, (2005).

PESSENDA LCR, GOUVEIA SEM, ARAVENA R. **Radiocarbon dating of total soil organic matter and humin fraction and its comparison with ^{14}C ages of fossil charcoal.** *Radiocarbon* 43(2B): 595-601, (2001).

PIAN, L. B. **Fungos Micorrízicos Arbusculares e Matéria Orgânica do solo de um Módulo de Cultivo Intensivo de Hortaliças Orgânicas.** Seropédica, 2015. 69 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Ciências do Solos) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciências do Solos - CPGACS, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PICCOLLO, A. **The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science.** *Adv. Agron*, 75:57-134, (2002).

PICCOLO, A., CONTE, P., & COZZOLINO, A. **Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances.** *European Journal of Soil Science*, 50(4), 687-694, (1999).

PICCOLO, A., & MBAGWU, J. S. **Role of hydrophobic components of soil organic matter in soil aggregate stability.** *Soil Science Society of America Journal*, 63(6), 1801-1810, (1999).

PICCOLO, A., & MBAGWU, J. S. C. **Exogenous humic substances as conditioners for the rehabilitation of degraded soils.** *Carbon*, 36, 62-9, (1997)

PICCOLO, A., STEVENSON, F.J. **Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Ca^{2+} complexes of soil humic substances.** *Geoderma* v.27, p.195-208, (1982).

PRIMO. D. C., R, MENEZES S. C., SILVA T. O; **Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro:** SCIENTIA PLENA VOL. 7, Num. 5 (2011).

PIZZEGHELLO, D., COCCO, S., FRANCIOSO, O., FERRARI, E., CARDINALI, A., NARDI, S., & CORTI, G. **Snow vole (*Chionomys nivalis* Martins) affects the redistribution of soil organic matter and hormone-like activity in the alpine ecosystem: ecological implications.** *Ecology and evolution*, 5(20), 4542-4554, (2015).

REZVANI, M.; ZAEFARIAN, F.; MIRANSARI, M.; NEMATZADEH, G.A. **Uptake and translocation of cadmium and nutrients by *Aeluropus littoralis*.** *Archives of Agronomy and Soil Science*, v.2, p.114-119, (2011).

RIBEIRO, Antonio Carlos. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5. Aproximação.** Comissão de fertilidade do solo do estado de Minas Gerais, 1999.

RICE, J. **Humim.** *Soil Science*, 166:848-857, (2001).

RILLIG, M. C.; WRIGHT, S. F.; NICHOLS, K. A.; SCHMIDT, W. F.; TORN, M. S. **Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils.** *Plant and Soil*, The Hague, v. 233, n. 2, p. 167-177, (2001).

ROSCOE, R.; MACHADO, P.L.O.A. **Fracionamento físico do solo em estudos da matéria orgânica.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 86p, (2002).

ROSSMANN, A. **Determination of stable isotope ratios in food analysis.** Food Reviews International, v. 17, n. 3, p. 347-381, (2001).

RUSSELL, J. D., FRASER, A. R., & WILSON, M. J. Clay Mineralogy: **Spectroscopic and Chemical Determinative Methods.** Chapman Hall, London, UK, 11-67, (1994).

SANTOS, F.S.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; MAZUR, N. **Mecanismo de tolerância de plantas a metais pesados.** In: FERNANDES, M.S. Nutrição mineral de plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.419-432, (2006).

SANTOS GA, CAMARGO FAO (1999) **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais.** Porto Alegre: Genesis, 293-298p, (1999).

SCHMIDT MWI, TORN MS, ABIVEN S, DITTMAR T, GUGGENBERGER G, JANSSENS IA, KLEBER M, KOGEL-KNABNER I, LEHMANN J, MANNING DAC, NANNIPIERI P, RASSE DP, WEINER S, TRUMBORE SE. **Persistence of soil organic matter as an ecosystem property.** Nature 478:49-56, (2011).

SCHNITZER, M. Organic matter characterization. 2.ed. In: PAGE, A.L., ed. **Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.** Madison, ASA/SSSA, p.581-593, (1982).

SENESI, N., & PLAZA, C. **Role of humification processes in recycling organic wastes of various nature and sources as soil amendments.** *Clean-Soil, Air, Water*, 35(1), 26-41, (2007).

SENESI, N., & PLAZA, C. **Role of humification processes in recycling organic wastes of various nature and sources as soil amendments.** *Clean-Soil, Air, Water*, 35(1), 26-41, (2007)

SHIRSHOVA LT, GHABBOUR EA, DAVIES G. **Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures.** *Geoderma* 133:204-216. doi:10.1016/j.geoderma.2005.07.007, (2006).

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. Fertilidade do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.275-374, (2007).

SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; **Molecular Characterization of Compost at Increasing Stages of Maturity. 1. Chemical Fractionation and Infrared Spectroscopy.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.2293-2302, (2007).

SONG, G., NOVOTNY, E. H., SIMPSON, A. J., CLAPP, C. E., & HAYES, M. H. B. **Sequential exhaustive extraction of a Mollisol soil, and characterizations of humic components, including humin, by solid and solution state NMR.** *European journal of soil science*, 59(3), 505-516, (2008).

STEINBERG, P.D.; RILLIG, M.C.; **Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin.** *Soil Biology & Biochemistry* (35), 191-194, (2003).

STEVENSON, J.F. **Humus chemistry, genesis, composition, reactions**. 2.ed. New York, John Wiley, 496p, (1994).

SWIFT, R.S. **Organic matter characterization**. In: Sparks, D.L.; Page, A.L.; Helmke, P.A.; Loeppert, R.H.; Soltanpour, P.N.; Tabatabai, M.A.; Johnston, C.T.; Sumner, M.E. (Eds.) *Methods of soil analysis: chemical methods*. Vol. 3. Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, Madison. (SSSA. Book Series, 5). p. 1011-1020, (1996).

TAN, K. H. **Humic matter in soil and the environment: principles and controversies**. CRC Press. ((2014).

TEDESCO, Marino José, et al. "Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p." *Boletim técnico* 5.

TINSLEY, J. **Determination of organic carbon in soils by dichromate mixtures**. In: International congress of soil science, 4. Amsterdam 1950. *Transactions*. Amsterdam, v.1. p.161-164.j (1950).

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. **Influence of humic substances on growth and physiological process**. In: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. (Ed.). *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 37-75, (1985).

VENEGAS, A.; RIGOL, A.; VIDAL M. **Viability of organic wastes and biochars as amendments for the remediation of heavy metal-contaminated soils**. *Chemosphere*, v.119, p.190-198, (2015).

WATSON, J. T. **Introduction to mass spectrometry**. 3rd. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 496 p, (1997).

WERNER, R. A.; BRAND, W. A. **Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 15, n. 7, p. 501-519, (2001).

WU, Z., MCGROUTHER, K., HUANG, J., WU, P., WU, W., WANG, H. **Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration**: Field experiment. *Soil Biology & Biochemistry*. (68), 283-290, (2014).

VAUGHAN, D.; MALCOM, R.E. & Ord, B.G. **Influence of humic substances on biochemical processes in plants**. In: Vaughan, D. & Malcom, R.E. *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht, Martinus Nijhoff/Junk W, p.77-108. (1985).

YOEMANS, J.C.; BREMNER, J.M. **A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil**. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*, 19(13): 1467-1476, (1988).

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T.M.; MILTNER, A. & SCHROTH, G. **Factor controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics**. *Geoderma*, 79:117-161, (1997).