

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

DISSERTAÇÃO

**Caracterização Estrutural da Matéria Orgânica do
Solo, Glomalina e Substâncias Húmicas de
Diferentes Ambientes e Origens**

Luiz Gilberto Ambrósio de Souza

2016



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

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA MATÉRIA ORGÂNICA DO
SOLO, GLOMALINA E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE DIFERENTES
AMBIENTES E ORIGENS**

LUIZ GILBERTO AMBRÓSIO DE SOUZA

Sob orientação do Professor
Ricardo Luiz Louro Berbara

e co-orientação do pesquisador
Andrés Calderín García

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

Seropédica – RJ
Fevereiro de 2016

631.4
S729c
T

Souza, Luiz Gilberto Ambrósio de, 1986-

Caracterização estrutural da matéria orgânica do solo, glomalina e substâncias húmicas de diferentes ambientes e origens / Luiz Gilberto Ambrósio de Souza – 2016.

60 f. : il.

Orientador: Ricardo Luiz Louro Berbara.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 46-56.

1. Ciência do solo – Teses. 2. Solos orgânicos – Teses. 3. Substâncias húmicas – Teses. 4. Húmus – Teses. 5. Glicoproteínas – Teses. I. Berbara, Ricardo Luiz Louro, 1957-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

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

LUIZ GILBERTO AMBRÓSIO DE SOUZA

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 29/02/2016.

Ricardo Luiz Louro Berbara. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Ednaldo da Silva Araújo. Dr. Embrapa Agrobiologia

Marcos Gervasio Pereira. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

*Eu gosto do impossível
porque lá a concorrência é menor.
(Walt Disney)*

Aos meus pais

*Gilberto de Souza
e Leonice de Lourdes Ambrósio de Souza*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Grande Arquiteto do Universo, por me proporcionar uma vida repleta de saúde e sabedoria; agradeço também à minha família meus pais Gilberto e Leonice e também à minha “família carioca” meus tios João e Dalva.

Além dos meus amigos de alojamento, de laboratório e dessa escola da vida chamada RURAL os quais não citarei nomes para não cometer o terrível equívoco de me esquecer de alguém. Agradeço também a minha namorada Elisa por ter me acompanhado nesta caminhada tanto como minha amante e amiga nas horas mais angustiantes, mas também nas mais felizes.

Ao meu grande mentor e “pai científico” Ricardo Berbara o qual me mostrou o caminho da pesquisa e fez com que eu me apaixonasse pela mesma. Assim como meu amigo, irmão e co-orientador Andrés Calderín García pela experiência a mim passada bem como todos os conselhos em todas as fases da minha pós-graduação.

Aos alunos, professores, funcionários do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ, em especial ao Laboratório de Biologia do Solo que contribuíram para a minha aprendizagem e muito para a minha lapidação como ser humano.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida neste mestrado.

RESUMO GERAL

SOUZA, Luiz Gilberto Ambrósio de. **Caracterização estrutural da matéria orgânica do solo, glomalina e substâncias húmicas de diferentes ambientes e origens.** 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A glomalina é considerada como uma glicoproteína hidrofóbica, termoestável e recalcitrante produzida pelos Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA). Tais características possivelmente implicam em altas quantidades desta proteína nos solos bem como uma reduzida taxa de decomposição, sendo considerada como uma importante fração da matéria orgânica do solo. As Substâncias Húmicas (SH) têm sido reconhecidas durante muito tempo como o componente orgânico mais amplamente distribuído no planeta, presentes tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos. Elas são formadas a partir da degradação química e biológica de resíduos de plantas, animais e da atividade microbiana. Embora existam alguns avanços sobre aspectos estruturais da glomalina e as substâncias húmicas, ainda são escassos os estudos que descrevem as suas diferenças estruturais utilizando uma abordagem espectroscópica e quimiométrica. Buscando encontrar respostas a estes questionamentos, assumindo como base de estudo a relação ambiental e ecológica existente, este estudo tem como objetivo confirmar a relação estrutural (diferenças e semelhanças) existente entre a glomalina e as substâncias húmicas de diferentes origens, através do isolamento e purificação das frações da proteína do solo relacionada à glomalina (Glo) e as frações de substâncias húmicas (SHs) de diferentes ambientes e materiais compostados; caracterizando a glomalina e as substâncias húmicas obtidas através de técnicas químicas, físicas e espectroscópicas (composição elementar, UV-vis, FTIR, CP-MAS ¹³C RMN, MEV) e através da utilização de técnicas quimiométricas (Unscrambler® X 10.3).

Palavras chave: Substâncias húmicas. Glicoproteínas. Quimiometria.

GENERAL ABSTRACT

SOUZA, Luiz Gilberto Ambrósio de. **Structural characterization of soil organic matter, glomalin and humic substances from different environments and backgrounds.** 2016. 60p. Dissertation (Master in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Glomalin is regarded as a hydrophobic, heat-stable and recalcitrant glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Such characteristics possibly result in high amounts of this protein in the soils, as well as a reduced rate of decomposition, and it is considered an important fraction of soil organic matter. Humic Substances (HS) have been recognized for a long time as the organic component most widely distributed on the planet, present both in terrestrial and aquatic environments. They are formed from chemical and biological degradation of residues from plants, animal and microbial activity. Although with some progress on structural aspects of glomalin and humic substances, there are few studies that describe their structural differences using a spectroscopic and chemometric approach. To search for answers for these questions, having as a reference the existing environmental and ecological relationships, this study aimed to confirm the structural relationship (differences and similarities) between the glomalin and humic substances obtained from different sources, through the isolation and purification of soil protein fractions related to glomalin (Glo), and the humic substances (HSs) fractions from different environments and composted materials; characterizing glomalin and humic substances obtained by chemical, physical and spectroscopic techniques (elemental composition, UV-vis, FTIR, ¹³C CP-MAS RMN, EMS), and by using chemometric techniques (Unscrambler® X 10.3).

Key words: Humic substances. Glycoproteins. Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A glomalina observada por microscopia e fluorescência recobrando raízes (www.ars.usda.gov).....	3
Figura 2. Imagens dos ecossistemas onde foram obtidas as glomalinas objeto de estudo. CA: Carrasco, CE: Cerradão, BA: Brejo altitude, AE: Ecossistema agrícola, EE: Ecossistema estressado (contaminado).....	14
Figura 3. Espectros CP MAS ¹³ C RMN das glomalinas extraídas dos diferentes ecossistemas. G1: Ecossistema natural (Carrasco-Brasil), G2: Ecossistema natural (Cerradão-Brasil), G3: Ecossistema natural (Brejo altitude-Brasil), G4: Ecossistema Estressado (Contaminado-Cuba), G5: Ecossistema Agrícola (Cultura de soja-Argentina).....	18
Figura 4. Análise multivariada de ACP realizada a partir dos dados espectrais de CP MAS ¹³ C RMN.....	19
Figura 5. Espectros FTIR das glomalinas extraídas dos diferentes ecossistemas. G1: Ecossistema natural (Carrasco-Brasil), G2: Ecossistema natural (Cerradão-Brasil), G3: Ecossistema natural (Brejo altitude-Brasil), G4: Ecossistema Estressado (Contaminado-Cuba), G5: Ecossistema Agrícola (Cultura de soja-Argentina).....	20
Figura 6. Análise multivariada de ACP realizada a partir dos dados espectrais de FTIR.....	21
Figura 7. Imagens de MEV obtidas a duas magnificações das glomalinas dos ecossistemas. G1: Ecossistema natural (Carrasco-Brasil), G2: Ecossistema natural (Cerradão-Brasil), G3: Ecossistema natural (Brejo altitude-Brasil), G4: Ecossistema Estressado (Contaminado-Cuba), G5: Ecossistema Agrícola (Cultura de soja-Argentina).....	21
Figura 8. Espectros de ¹³ C CP MAS RMN das diferentes fracções húmicas extraídas de solos orgânicos e materiais compostados.....	31
Figura 9. PCA para os dados obtidos por do ¹³ C-CP / MAS RMN dos espectros de SHs extraídos de solos orgânicos e de materiais compostados. A, B e C) ACP realizada utilizando os espectros puro. A1, B1 e C1) ACP realizada através da integração por regiões no espectro puro.....	34
Figura 10. Análises de ACP para os dados obtidos a partir do carregamento dos espectros de ¹³ C CP MAS RMN para as SH dos solos orgânicos e materiais compostados. A e C) ACP realizado a partir dos espectros puros. B e D) ACP realizado a partir da integração por regiões nos espectros puros.....	35
Figura 11. Curva de resolução multivariada (CRM) realizada a partir do carregamento dos espectros ¹³ C CP MAS RMN para as SH dos solos orgânicos e materiais compostados. A) CRM das SH, B) CRM dos AH e C) CRM das Hu.....	36
Figura 12. Espectros de FTIR das SH extraídas de solos orgânicos e materiais compostados.....	38

Figura 13. ACP para os dados obtidos dos espectros FTIR de SHs extraído dos solos orgânicos e materiais compostados.....	39
Figura 14. Analises de ACP para os dados obtidos a partir do carregamento dos espectros de FTIR para as SH dos solos orgânicos e materiais compostados.....	40
Figura 15. Analises de ACP para os dados obtidos a partir da composição elementar das SH dos solos orgânicos e materiais compostados.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns estudos do isolamento de frações húmicas a partir de diferentes fontes, sua caracterização mediante diferentes técnicas químico-físicas e as principais informações obtidas por meio da análise estrutural. (Modificado de Garcia, 2013).	8
Tabela 2. Distribuições relativas (percentuais) de tipos de carbono dos espectros de ¹³ C-CP/MAS-RMN.....	32
Tabela 3. Composições elementares, isotópicas, parâmetros de oxidação, volumes aparentes, densidades aparentes, e relação E4 / E6 de SHs.....	40
ANEXO Tabela 1. Características dos solos presentes nos ecossistemas em estudo	57
ANEXO Tabela 2. Características das glomalinas presentes nos ecossistemas em estudo	57
ANEXO Tabela 3. Propriedades químicas do Organossolo utilizado neste estudo. Os valores médios de 3 réplicas.....	58
ANEXO Tabela 4. Propriedades do vermicomposto e do material compostado. Os valores médios de 4 réplicas.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL.....	3
2.1 Glomalina (Glo).....	3
2.2 Substâncias Húmicas (SH).....	6
3. CAPÍTULO I – RESPOSTA DO PADRÃO ESTRUTURAL DE GLOMALINAS EM ECOSSISTEMA NATURAL, AGRÍCOLA E PERTURBADO	10
3.1 RESUMO	11
3.2 ABSTRACT	12
3.3 INTRODUÇÃO.....	13
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.4.1 Extração e purificação das glomalinas.....	15
3.4.2 Técnicas de caracterização realizadas aos componentes orgânicos (Glomalinas e Substâncias Húmicas).....	15
3.4.3 Análises quimiométricas e estatísticas.....	16
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.5.1 Caracterização espectroscópica das glomalinas mediante CP MAS RMN 13C.....	17
3.5.2 Caracterização espectroscópica das glomalinas mediante infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	19
3.5.3 Caracterização morfológica das glomalinas mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	21
3.6 CONCLUSÕES	23
4. CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES HÚMICAS DE DIFERENTES ORIGENS. SOLOS ORGÂNICOS E MATERIAIS COMPOSTADOS	24
4.1 RESUMO	25
4.2 ABSTRACT	26
4.3 INTRODUÇÃO.....	27
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.4.1 Solos e materiais compostados utilizados para a obtenção das frações húmicas.....	28
4.4.2 Obtenção e purificação das frações húmicas.....	28
4.4.3 Quantificação de isótopos estáveis do 13C ($\delta^{13}C$).....	28
4.4.4 Composição elementar e relação E4/E6.....	28
4.4.5 Espectroscopia de infravermelho (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (13C-CP/MAS RMN).....	29
4.4.6 Tratamento quimiométrico e estatístico dos dados espectrais.....	29
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.5.1 Características estruturais das frações húmicas analisadas por espectroscopia de RMN de 13C.	30
4.5.2 Labilidade e recalitrância nas frações húmicas analisadas mediante espectroscopia 13C RMN aliada a MCR.....	35

4.5.3 As diferenças estruturais entre as frações húmicas das diferentes origens observadas mediante espectroscópica FTIR.....	37
4.6 CONCLUSÕES.....	44
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXO.....	57

1. INTRODUÇÃO GERAL

As substâncias húmicas (SH), que incluem o ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF), e humina (Hu) além da glomalina (Glo) compreendem a matéria orgânica do solo (MOs). As SH funcionam como reservatórios de micronutrientes disponíveis às plantas, podem se ligar a metais auxiliando as plantas em relação à toxicidade de metais pesados, às argilas e outras pequenas moléculas orgânicas para formar agregados, e agir como derivações de elétrons em processos microbianos e reações redox abióticas (Fan et al., 2000; Hayes & Clapp, 2001).

Técnicas analíticas tais como ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de cromatografia de massa têm sido aplicadas nas SH para identificar os grupos funcionais e diferentes estruturas químicas (Hatcher et al., 2001). Estas técnicas têm confirmado que outras moléculas, tais como aminoácidos, hidratos de carbono e lípidios são frequentemente co-extraídas nos processos de extração (Kingery et al., 2000; Hatcher et al., 2001).

A teoria ligno-proteica explica como moléculas de aminoácidos são capazes de reagir com a lignina no solo formando a base das moléculas húmicas, esta teoria explica como Hu são as primeiras frações a se formarem, seguidas dos AH e AF (Waksman 1932; Kononova 1961; Flaig 1975; Stevenson 1994). A teoria amino-açúcar sugere que moléculas de açúcar e aminoácidos formam moléculas polimerizadas que constituem as bases para a formação das SH (Nissenbaum & Kaplan, 1972; Hatcher et al., 1985; Ziechmann, 1994; Stevenson, 1994). A teoria dos polifenóis é talvez a mais aceita hoje pela comunidade científica e sugere a formação de compostos de características fenólicas realizadas em parte, pela oxidação de fragmentos estruturais da lignina pelos microrganismos, assim, as primeiras frações a se formarem seriam os AF e posteriormente os AH e Hu (Stevenson, 1994; Ziechmann 1994).

Da mesma forma, ainda não foi definido se os AH são uma mistura de moléculas de baixo peso molecular (Hayes & Clapp, 2001, MacCarthy, 2001) ou uma molécula complexa de elevado peso molecular (Schulten & Schnitzer, 1997). Alguns estudos sobre os AH começaram pela extração de SH do solo a partir de NaOH ou pirofosfato de sódio à temperatura ambiente (Swift, 1996).

Outras substâncias podem ser extraídas por processos similares como as proteínas de solo relacionadas às Glo, que são glicoproteínas relacionadas com os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) ou simplesmente glomalinas (Wright et al., 1996; Rillig et al., 2001; Rillig de 2004). Na comunidade científica existem discussões sobre os processos de extração e o isolamento destas substâncias (SH e Glo) devido à similaridade dos processos, entretanto Glo são diferentes de SH e tem sido possível seu isolamento apenas de substratos formados por areia onde foram cultivadas plantas micorrizadas em ausência total de matéria orgânica (Nichols, 2003; Nichols & Wright, 2005) relatam que a Glo e as SHs são frações coexistentes na MOS e mesmo havendo algumas similaridades entre ambas são frações distintas, mais ainda são necessários estudos para corroborar estes argumentos.

O protocolo de extração de Glo consiste em incubar o solo em 20 a 50 mM de citrato de sódio a um pH alcalino e 121 °C, durante intervalos de 1 hora (Wright & Upadhyaya, 1996). Isto está em contraste com o processo de extração de AH que é feito à temperatura ambiente (Swift, 1996). A glomalina precipita a partir da solução a pH 2,5-2,0 (Nichols, 2003), em um nível de pH, onde proteínas de elevado peso molecular podem ser isoladas a partir de AH (Hayes & Graham, 2000; Hayes & Clapp, 2001). Contudo a Glomalina parece

ter propriedades e funções semelhantes às hidrofobinas fúngicas (Wright & Upadhyaya, 1996; Nichols, 2003; Nichols e Wright, 2004), que são proteínas pequenas e hidrofóbicas encontradas em hifas de muitos tipos de fungos, incluindo os fungos ectomicorrízicos (Wessels, 1997). As Hidrofobinas protegem as hifas da perda de soluto, permitem às hifas crescer através do solo e manter a pressão de turgescência quando estas estão em contato com poros cheios de água e ou ar (Wessels, 1997) da mesma forma como acontece com as hifas de micorrizas onde a glomalina é abundante (Wright & Upadhyaya, 1996; Wright, 2000; Rillig et al, 2001; Nichols & Wright, 2005). Algumas pesquisas têm abordado que as Glo possuem um padrão glicoproteico estrutural próprio se comportando como um grupo de substâncias independente dentro da matéria orgânica do solo (Nichols, 2003).

Por este motivo, o primeiro capítulo deste estudo intitulado **RESPOSTA DO PADRÃO ESTRUTURAL DE GLOMALINAS EM ECOSSISTEMA NATURAL, AGRÍCOLA E PERTURBADO** a hipótese consiste em que a estrutura das Glo responde ao tipo de ecossistema em que se encontram utilizando técnicas de caracterização espectroscópicas (^{13}C RMN CP MAS, FTIR) e morfológicas (MEV) aliado ao tratamento quimiométrico dos dados.

E no segundo capítulo deste estudo intitulado **CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES HÚMICAS DE DIFERENTES ORIGENS. SOLOS ORGÂNICOS E MATERIAIS COMPOSTADOS** a hipótese consiste em que mediante a utilização de técnicas isotópicas e espectroscópicas é possível explicar a relação entre origem e estrutura de SH obtidas a partir de solos e materiais compostados.

2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 Glomalina (Glo).

Pesquisadores norte-americanos que buscavam identificar fungos micorrízicos arbusculares (FMA) através de anticorpos monoclonais, observaram que um destes anticorpos estudados reagia com uma substância presente nos FMA, a qual foi denominada de Glomalina (Wright & Upadhyaya, 1996).

A glomalina (Figura 1) foi considerada como uma glicoproteína hidrofóbica, termoestável e recalcitrante produzida pelos FMA (Wright, 1998). Tais características possivelmente implicam em altas quantidades desta proteína nos solos bem como reduzida taxa de decomposição (Rillig et al., 2001; Steinberg, 2003).

Foi também observado que as glomalina auxiliam na fixação das partículas do solo, favorecendo a formação de agregados estáveis, uma vez que esta substância é fortemente ligada dentro da parede das hifas de FMA, em vez de ser liberada ou segregada para o meio (Driver et al., 2005).



Figura 1. A glomalina observada por microscopia e fluorescência recobrendo raízes (www.ars.usda.gov).

Dentre as suas principais funções se encontram: a de agregação do solo, estando relacionada com uma maior produtividade do ecossistema como resultado da melhoria da aeração do solo, drenagem e da atividade microbiana. As glomalinas liberadas pelas hifas promovem efeito direto sobre a estabilidade dos agregados (Wu et al., 2014), principalmente na fração correspondente aos macroagregados (Kholler et al., 2010), o que por sua vez, melhora a estrutura do solo, facilita a passagem de ar e água e proporciona menor suscetibilidade à erosão (Haddad & Sarkar, 2003); e, assim, contribui para a estabilidade de

agregados na rizosfera, como observado em áreas com cultivo de citros (Wu et al., 2014). Preger et al., (2007) relata a capacidade das Glo em promover a agregação do solo, especialmente em solos arenosos com baixo aporte de biomassa e baixa capacidade de conservação da matéria orgânica do solo (MOS). Em solos submetidos ao manejo orgânico, as concentrações de glomalina no solo foram diretamente relacionadas com a estabilidade de agregados, devido ao aumento na proporção de macroagregados (Zhang et al., 2014).

A glomalina contribui para a estabilidade de agregados do solo (Gispert et al., 2013) existindo relação significativa entre a glomalina e agregados de tamanho entre 0,25 e 2,00 mm. A estabilidade de agregados foi maior em solos com FMAs em comparação aos solos com ausência da colonização micorrízica, em estudo do diâmetro médio ponderado de macroagregados (DMP) de 1-2 mm (Bedini et al., 2009).

Pode ser importante na determinação da patabilidade do micélio, exercendo assim função de proteção microbiana (Rillig et al., 2003; Purin & Rillig, 2008). Também auxilia o desenvolvimento de plantas em ambientes contaminados por metais pesados, evidenciado pela correlação entre a colonização micorrízica e o conteúdo de glomalina, onde as Glo desempenham papel de proteção à toxicidade causada por metais pesados nas raízes, pela mediação das interações dos metais e as raízes das plantas (Leyval et al., 1997). As Glo sequestram Cu e Zn e parecem ser um mecanismo altamente eficiente dos FMAs para mitigar o estresse, levando à estabilização dos solos altamente poluídos por atividades de mineração (Cornejo et al., 2008)

Portanto existe a necessidade de caracterizar a natureza bioquímica da Glo para compreender sua contribuição para o sequestro de metais pesados e os mecanismos químicos envolvidos. Outra contribuição, e não menos importante, é a potencialidade da Glo nos processos do ecossistema (Harner et al., 2004), em relação à estruturação do solo e fornecimento de nutrientes para as plantas.

A glomalina também pode ser usada como indicador associada a sedimentos marinhos para analisar padrões e processos em mudanças passadas na qualidade do solo (López-Merino et al., 2015). Logo, essa proteína bastante sensível às alterações no uso do solo pode ser utilizada como indicador (Lovelock et al., 2004). A concentração de glomalina no solo pode ser considerada importante indicador de qualidade para definir estratégias de manejo em áreas agrícolas (Bai et al., 2009; Khalili et al., 2011; Fokom et al., 2012; Reyna & Wall, 2014), destacando seu uso para monitorar a degradação do solo, com base em sua relação direta com a comunidade microbiana, ciclo de carbono e dinâmica de nutrientes do solo (He et al., 2010).

O método de obtenção de glomalina baseia-se na extração com citrato de sódio (20-50 mM; pH 7,0 ou 8,0) à temperatura de 121°C a partir de hifas ou de solo (Wright & Upadhyaya, 1998). Duas frações de glomalina são comumente extraídas: a denominada como glomalina facilmente extraível (GFE), que representa a fração recentemente depositada que ainda não sofreu transformações bioquímicas no solo e a glomalina total (GT), que já foi submetida às transformações bioquímicas, estando mais fortemente ligada às frações organominerais do solo. Apesar da maior dificuldade para a extração, pode ser obtida mediante sucessivos ciclos de extrações (Wright et al., 1996; Wright & Upadhyaya, 1998). Por outro lado, a quantificação é comumente realizada por métodos bioquímicos que permitem a dosagem de proteína (método Bradford, ver item 4.4) ou pode-se ainda fazer uso de técnicas imunológicas, como o método ELISA (Purin; Rillig, 2007). Assim, a purificação da glomalina é realizada seguindo o protocolo de precipitação e diálise (Wright et al., 1998), onde precipitação e diálise são usadas para purificar a glomalina liofilizada, e contribuem para concentrar a proteína para as análises subsequentes. Desde o ponto de vista das funções, o uso

da proteína do solo relacionada à glomalina (Glo) pode descrever o produto que resulta desta metodologia de extração (Rillig et al., 2004).

Com os avanços em biologia molecular, são relatadas limitações dos métodos utilizados atualmente para a extração e quantificação de PRSG em solos (Rillig et al., 2007). Com esta mesma abordagem, Schindler (2007) relata que os extratos de Glo resultantes dos procedimentos atuais são, na realidade, material protéico co-extraído com grande excesso de ácido húmico. Isto porque a relação entre glomalina e outras frações protéicas no solo (as quais ainda não estão claramente definidos), provavelmente ocasiona co-extração, tanto da glomalina como de substâncias húmicas, quando utilizadas as metodologias atuais.

Como observado por Schindler (2007) a Glo extraída de frações minerais e orgânicas dos solos exibem a mesma leitura em RMN, independentemente do método de precipitação utilizado e decorrente do processo de purificação. Os atuais protocolos de extração e purificação tais como o pré-tratamento dos solos com HCl e extração sequencial são falhos pois existe co-extração de frações da matéria orgânica como os AH (Nichols & Wright, 2005), devendo ocorrer aperfeiçoamentos para melhor compreensão da função e estrutura da matéria orgânica do solo, quando se comparam os solos agrícolas submetidos ao mesmo manejo (Reyna & Wall, 2014). Em situações de grande quantidade de MO, a utilização dos métodos de Bradford e ELISA podem ser inadequados por sofrerem interferência pela MOS e não expressar a quantidade precisa de glomalina. O ensaio ELISA pode ser propenso as polarizações de retenção e de interferência, dependendo da quantidade de MO contida na amostra de solo (Rosier et al., 2005).

As técnicas proteômicas permitem inferir que as Glo contêm grandes quantidades de proteínas termoestáveis e são relacionadas com proteínas que não possuem origem micorrízica (Gillespie et al., 2011), demonstrando que o procedimento de extração atual é falho e define a glomalina como originária de uma mistura de compostos e assim superestimando quando quantificada pelo ensaio de Bradford. Portanto, para melhor entendimento das características químicas e estruturais, devem ser exploradas técnicas cromatográficas específicas para glicoproteínas, uma vez que os procedimentos atuais mostram que a glomalina é um material proteico co-extraído com grande quantidade de AH (Schindler et al., 2007).

Apesar de alguns vestígios de glicoproteínas não estarem relacionadas à glomalina do solo, estes podem estar presentes na MOS, pois o componente protéico da Glo é predominantemente composto de única proteína glicosilada (Bolliger et al., 2008). O ensaio de Bradford é útil na detecção da glomalina (Koide & Peoples, 2013; Rosier et al., 2008) e o pirofosfato foi superior ao citrato ou borato na extração para o mesmo tipo de solo (Wright et al., 2006). As combinações de resultados por meio de diferentes metodologias em conjunto forneçam um argumento forte de que a glomalina é de fato, uma fração pura do *pool* proteico da MOS (Bolliger et al., 2008). Para melhor entendimento estrutural, técnicas cromatográficas específicas para glicoproteínas devem ser ainda exploradas.

Sabe-se que as características do solo, as condições climáticas, o sistema de uso do solo, as práticas de manejo agrícola, a presença e o tipo de vegetação, dentre outros fatores, influenciam na quantidade de glomalina produzida pelos FMA (Souza, 2012). É fração considerada crítica da MOS, que apesar de comprovada a sua existência, ainda não existe, de fato, definição sobre a sua estrutura e a sua função ambiental. As características do solo influenciam as concentrações e a distribuição espacial da glicoproteína e, em solos mais ácidos, as concentrações de glomalina tendem a aumentar. Entretanto, com o aumento do pH

ocorre diminuição das suas concentrações no solo, e o carbono total e a MOS são positivamente correlacionados com a glomalina (Haddad & Sarkar, 2003).

O conteúdo de glomalina nos solos está diretamente relacionado com a quantidade de C orgânico e argila (Nichols & Wright, 2005), e a sua concentração e distribuição variam no solo de acordo com o manejo (Wright et al., 2007). Em áreas de pastagens primárias, geralmente baixos teores de MOS e de Glo são constatados, bem como o uso intensivo destes solos contribuiu para a redução dos teores de Glo (Preger et al., 2007). A concentração de glomalina nos solos varia de 0,62 e 1,03 mg cm⁻³ para (GFE) e 1,17 e 2,14 mg cm⁻³ (GT), respectivamente (Zhang et al., 2015). Valores semelhantes foram encontrados em florestas tropicais, variando de 0,4 e 4,7 mg cm⁻³ (GFE) e 0,8 e 12,5 mg cm⁻³ respectivamente (GT) (Lovelock et al., 2004). Em áreas agrícolas, as concentrações de glomalina GFE e GT quantificadas foram em torno de 0,5 a 3 mg g⁻¹ solo, respectivamente (Sousa et al., 2012; Rillig et al., 2003b), e, em cultivo de citros, encontrados valores variando de 0,3 e 0,6 mg cm⁻³ (GFE) e 0,5 e 0,8 mg cm⁻³ (GT), respectivamente (Wu et al., 2012).

Contudo, ainda não se conhece muito sobre as diferenças entre as frações, pois a sua composição bioquímica, seu papel e a sua dinâmica no solo não são bem definidas (Rillig et al., 2001; 2003a). Em termos estruturais, a glomalina foi inicialmente classificada como uma glicoproteína, formada por 60% de carboidratos que se ligam à porção proteica por ligações glicosídicas do tipo N, apresentando aminoácidos alifáticos e aromáticos na cadeia peptídica. Foi também demonstrado que a molécula contém ferro fortemente ligado (0,04-8,8%), o que confere a cor vermelho-amarronzada dos extratos (Wright & Upadhyaya, 1998; Rillig et al., 2001; Nichols, 2003). Cerca de 28 e 45% da molécula de glomalina é constituída por carbono (C) e de 0,9 a 7,3% é nitrogênio (N), chegando a representar de 4 a 5% do C e do N totais do solo (Sousa et al., 2012). Como uma glicoproteína ligada a N insolúvel com 37% de C e 3 e 5% de azoto (N), a estrutura da glomalina contribui para a estabilização do solo e um reservatório de C (Wright & Upadhyaya, 1998; Lovelock et al., 2004; Wu et al., 2012).

Acredita-se que a glomalina tenha organização estrutural semelhante à de uma glicoproteína, onde há presença de oligossacarídeos se encontram ligados ao nitrogênio nas hifas do FMA (Wright & Upadhyaya, 1998; Wright et al., 1998). Estes aspectos estruturais explicam a metodologia usada para a extração de glomalina e suas implicações, onde segundo (Rosier et al., 2006), o citrato de sódio utilizado para a extração contribui não só para a extração da glomalina, mas também para a extração de uma amálgama de proteínas e, possivelmente, de outras espécies orgânicas.

2.2 Substâncias Húmicas (SH).

A matéria orgânica do solo (MOS) é resultado de um processo progressivo da decomposição de compostos orgânicos (transformações biológicas, físicas e químicas que convertem restos de material vegetal e animal aportados ao solo em produtos orgânicos formando complexas associações com minerais do solo) (Given, 1984) contendo carbono mais orgânico do que a vegetação global e a atmosfera (Lehmann & Thomas, 2010), uma parte mais estabilizada desta MOS, após as transformações existentes, resulta nas substâncias húmicas (SHs) que são conhecidas como a matéria orgânica natural mais amplamente distribuídos no planeta (Koivula & Hänninen, 1999; Timonhy & Thomas, 2010; Islam et al., 2010; Schmidt et al., 2011; Dong et al., 2015), originada de compostos inerentemente estáveis e quimicamente únicos são comumente relatadas como um *pool* de compostos orgânicos

complexos e heterogêneos, com diferentes grupos funcionais (Cabaniss et al., 2000; Sutton & Sposito, 2005; Bai et al., 2015); constituem cerca de 70 a 80% da MOS.

As SHs podem ser definidas como uma série de polímeros amorfos de coloração amarela, marrom a preta, de peso molecular relativamente alto e formado por reações de sínteses secundárias, bióticas e abióticas, usualmente classificados em relação a sua solubilidade em meio alcalino e ácido. Por apresentarem alta complexidade química e forte interação com a fração coloidal inorgânica do solo, essas substâncias decompõem-se lentamente e acumulam-se nos solos (Stevenson, 1994; Primo et al., 2011; Schmidt et al., 2011).

As SHs são formadas a partir do processo denominado humificação, este processo pode ser explicado por teorias desde mais clássicas como a que considera que são formadas a partir da lignina modificada até teorias mais atuais, conhecida como dos polifenóis (Silva et al., 2007); alguns estudos apontam que as primeiras pesquisas com base em um método de extração assumiram que um ocorre um processo de humificação resultado deste um produto chamado de SHs no entanto, com a utilização de técnicas analíticas modernas estas SH são questionadas por faltas de provas em relação ao processo de humificação (Brady & Weil, 2008; Horwath, 2015).

Com as transformações biológicas, físicas e químicas convertem restos de material vegetal e animal em produtos orgânicos formando complexas associações com minerais do solo, as SH possuem uma série de funções no meio ambiente, que incluem principalmente a fertilidade e a ciclagem de nutrientes e de carbono, proporcionando um aumento na capacidade produtiva dos solos, sendo estes solos produtivos fundamentais para o bem-estar humano uma vez que a agricultura gera a maior parte da base alimentar do planeta; as SHs são muito importantes para a agricultura, a indústria, ambiente, e da biomedicina (Dong et al., 2015).

Em sistemas terrestres e aquáticos SH afetam a química, a ciclagem e biodisponibilidade de elementos químicos, bem como o transporte e degradação de produtos químicos orgânicos xenobióticos e naturais (IHSS 2015); contribui para a fertilidade do solo através da retenção de água disponível para as plantas e nutrientes ou promovendo a formação da estrutura do solo (Janzen, 2015), em particular em solos tropicais alguns estudos relatam que as SHs têm efeitos potenciais sobre a biodisponibilidade e transporte de nutrientes, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros produtos químicos. (Gauthier et al., 1986; Croué et al., 2003; Chin et al., 2004; Dai et al., 2006; Yamashita & Jaffé, 2008; Bai et al., 2008; Bai et al., 2015).

Desde os primeiros estudos há mais de 200 anos, a técnica de extração alcalina passou por muitas alterações, mas o princípio se mantém. Na sua versão moderna (IHSS, 2015; Kleber et al., 2015) este método cria a necessidade de distinguir várias categorias ou frações dos constituintes da matéria orgânica do solo, o que culmina em falhas nesta metodologia, o entendimento destas frações estáveis, são denominadas substâncias húmicas (SHs), constituídas por AF, AH e Hu (Stevenson, 1994; Moreira & Siqueira, 2006).

As SHs podem ser definidas através de protocolos de extração em: ácido fúlvico (solúvel em todos os valores de pH), ácido húmico (solúvel em meio alcalino e insolúvel em pH1.0) e Humina (insolúvel em todos os valores de pH) (Dai et al., 2006; IHSS, 2014). A fonte de origem e o tempo de humificação contribuem diretamente para a variação das características estruturais das frações das SH, como exemplo entre estas três frações (Tabela 1), os AFs possuem menor massa molecular e são a fração mais móvel de substâncias húmicas (Cabaniss et al., 2000).

Tabela 1. Alguns estudos do isolamento de frações húmicas a partir de diferentes fontes, sua caracterização mediante diferentes técnicas químico-físicas e as principais informações obtidas por meio da análise estrutural. (Modificado de Garcia, 2013).

Fração da SH	Origem	Técnica de caracterização	Características principais	Principais estudos
AH / FA	Solos	¹ H-RMN ¹³ C-RMN	AH são + aromáticos, contem - quantidade de C-carboidratos e H alifáticos que os AF.	Zu-Yi et al., 1999
AH / FA	Solos	Composição Elemental. UV-vis FTIR ¹³ C-RMN	↑ Condensação aromática quando ↑ a profundidade no solo. ↓ de O-alkuil-C quando ↑ a profundidade no solo.	Gondar et al., 2005
AH / FA	Solos	Composição Elemental. UV-vis FTIR ¹ H-RMN	AF com ↓ teor de C, ↑ teor de O, ↓ relação E ₄ /E ₆ , ↓ grau de aromaticidade que os AH	Dobbss et al., 2009
SH	Solos	DRIFT ¹ H-RMN	Mudanças em grupos funcionais com o uso de adubos. ↑ de aminoácidos aromáticos, ligninas e ácidos graxos/ésteres em solo adubados com esterco.	Ferrari et al., 2011

Mesmo com uso de novas técnicas, o que proporcionou um avanço na abordagem das SHs no meio ambiente, ainda não está bem consolidada a questão da origem e a formação (processo de humificação), pois a complexidade da estrutura destas substâncias é uma incógnita e grandes esforços têm sido feitos para elucidar as suas estruturas moleculares. Estudos que caracterizam as frações húmicas de diferentes origens são abundantes na literatura, a alta variabilidade nas características estruturais da SHs faz da estrutura molecular

um referencial para avaliar a qualidade da matéria orgânica e para monitorar mudanças nas SHs que ocorrem durante o manejo do solo ou compostagem (Berbara & García, 2014).

Em geral, SH são considerados como sendo compostos orgânicos de elevado peso molecular, e várias estruturas moleculares têm sido propostas para descrever as suas estruturas (Kujawinski et al., 2002). Neste sentido para melhor compreensão das SHs são utilizadas metodologias de extração, fracionamento e purificação, mais especificamente fazendo uso da espectroscópica e da quimiometria, de maneira geral são comumente usados os seguintes protocolos:

Extração e fracionamento - Kononova, Schnitzer, Swift, Benites.

Purificação - ácido fluorídrico (HF), resina DAX-8, diálise e liofilização segundo a IHSS.

Caracterização - são feitos por técnicas espectroscópicas como, por exemplo, ultravioleta-visível (UV), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) principalmente (Primo et al., 2011).

Embora existam alguns avanços sobre aspectos estruturais da glomalina e as substâncias húmicas, ainda são escassos os estudos que descrevem as suas diferenças estruturais utilizando abordagem espectroscópica e quimiométrica. Este estudo visa encontrar respostas a estes questionamentos, assumindo como base de estudo a relação ambiental e ecológica existente nos solos encontrando uma resposta para o padrão estrutural das glomalinas isoladas em função do tipo de ecossistema e encontrar uma organização estrutural das substâncias húmicas comparando características estruturais das frações húmicas, semelhantes entre si.

3. CAPÍTULO I

RESPOSTA DO PADRÃO ESTRUTURAL DE GLOMALINAS EM ECOSSISTEMA NATURAL, AGRÍCOLA E PERTURBADO*

3.1 RESUMO

As glomalinas (Glo) relacionadas às proteínas do solo são substâncias de estrutura glicoprotéica produzidas a partir da colonização micorrízica dos fungos. As informações sobre a relação entre a estrutura das Glo com as suas propriedades e funções nos solos são ainda escassas. Como parte da matéria orgânica do solo as Glo podem apresentar características estruturais distintas de acordo com o tipo de ecossistema em que se encontram. Para testar a hipótese, este estudo objetivou caracterizar as Glo de três ecossistemas (agrícola, natural e contaminado por metais pesados) utilizando técnicas espectroscópicas e microscópicas aliadas ao tratamento quimiométrico dos dados. As Glo possuem um padrão glicoprotéico estrutural próprio. Em ecossistemas naturais as Glo possuíram maior aromaticidade, enquanto que, em ecossistemas sob manejo agrícola houve enriquecimento de C-anoméricos (carboidrato) e no contaminado houve predomínio de estruturas carbonílicas e carboxílicas. Por primeira vez é relatado que o padrão glicoproteico das Glo é estruturalmente diferente de acordo com o tipo de ecossistema. Novos estudos estão sendo realizados para detectar as estruturas nas Glo que caracterizam cada tipo de perturbação ou estresse nos solos.

Palavras-chave: Glomalinas. Glicoproteínas. Matéria orgânica. Quimiometria.

3.2 ABSTRACT

The glomalin (Glo) related to soil proteins are glycoprotein structure of substances produced from the mycorrhizal fungi. Information on the relationship between the structure of Glo to their properties and functions in soils are still scarce. As part of the soil organic matter the Glo can have distinctive structural characteristics according to the type of ecosystem in which they are. To test the hypothesis, this study aimed to characterize the Glo three ecosystems (agricultural, natural and contaminated by heavy metals) using spectroscopic and microscopic techniques allied to chemometric data processing. The Glo have a structural glycoprotein own pattern. In natural ecosystems the Glo contained higher aromaticity, while in ecosystems under agricultural management there was enrichment of C-anomeric (carbohydrate) and contaminated predominated carbonílicas and carboxylic structures. For the first time it is reported that the pattern of glicopreico Glo is structurally different depending on the type of ecosystem. Further studies are being conducted to detect the structures Glo characterizing any kind of disturbance or stress in soils.

Key words: Glomalin. Glycoproteins. Organic matter. Chemometrics.

3.3 INTRODUÇÃO

Os conhecimentos sobre as características estruturais das Glomalinas (Glo) em função do tipo de ecossistema são hoje praticamente inexistentes. Porém sabe-se que os conteúdos de Glo no solo respondem de forma específica a cada tipo de ambiente (Rillig & Steiberg, 2002; Rillig et al., 2003) e podem atuar como indicadores do solo diante de eventos de queima (Lozano et al., 2015), também ocorrendo mudanças em seu conteúdo diante de variações de CO₂ e N no solo (Zhang et al., 2015), quando realizadas práticas de adubação orgânica (Zhang et al., 2014) e quando há ocorrência de contaminação por metais pesados (Wu et al., 2014).

As funções que as Glo desempenham no solo ainda são controversas. Acredita-se que as Glo exerçam como papel principal a melhoria das características físicas do solo através do aumento na estabilidade dos agregados (Wright & Upadhyaya, 1996). Por outro lado, estudos relatam um papel mais direcionado para os processos biológicos no solo onde as Glo poderiam estar regulando a palatabilidade do micélio nos fungos (Purin & Rillig, 2007).

No que diz respeito à estrutura das Glo, os estudos também se encontram fragmentados. Segundo (Wright & Upadhyaya, 1998), as Glo apresentam uma estrutura tipo glicoproteínas, o que foi comprovado mediante eletroforese SDS-PAGE. Rillig et al., (2001) confirma essas características estruturais mediante RMN-¹H. Outros autores relatam que as Glo, por apresentarem semelhança espectral (¹³C RMN) com ácidos húmicos não possuem organização estrutural glicoprotéica (Schindler et al., 2007).

Diante deste cenário, se detectam hoje vários pontos em obscuro a respeito dos conhecimentos sobre as Glo, o que torna imprescindíveis os estudos que forneçam informações sobre a variabilidade estrutural das Glo em função do tipo de ambiente e como estas estruturas respondem a diferentes ecossistemas. Com estes elementos, este estudo baseia-se na hipótese de que a estrutura das Glo responde de acordo com o tipo de ecossistema em que se encontram.

Para comprovar esta hipótese, este capítulo caracterizou as Glo de ecossistemas pertencentes a diferentes países utilizando uma bateria de técnicas de caracterização espectroscópica (¹³C RMN CP MAS, FTIR) e morfológicas (MEV) aliada ao tratamento quimiométrico dos dados.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

As Glo do Brasil foram obtidas a partir de um Latossolo Vermelho-Amarelo (Santos et al., 2013), equivalente ao Oxisols da classificação Americana (Soil Taxonomy, 1999) coletado na região da Floresta Nacional do Araripe em três tipos de fitofisionomias: Carrasco (G1), Cerradão (G2) e Floresta Estacional Semidecidual Submontana, localmente conhecida como Brejo altitude (G3) (39°28'W-39°32'W e 7°14'S-7°17'S) (Nobre et al., 2015). A Glo de Cuba (G4) foi obtida a partir de um Latossolo Vermelho-Amarelo (Santos et al., 2013), equivalente ao Oxisols da classificação Americana (Soil Taxonomy, 1999) contaminado por metais pesados (22°58'29.81''N e 82°09'57.65''O). A Glo de Argentina (G5) foi obtida de um Chernossolo Háplico (Embrapa, 2013), equivalente ao Typic Hapludoll da classificação Americana (Soil Taxonomy, 1999) sob monocultura de soja durante cinco anos coletado em Buenos Aires (34°52'27.47"S e 62°45'31.95"W) (Figura 2). Algumas características dos solos são mostradas na (Anexo - Tabela 1).

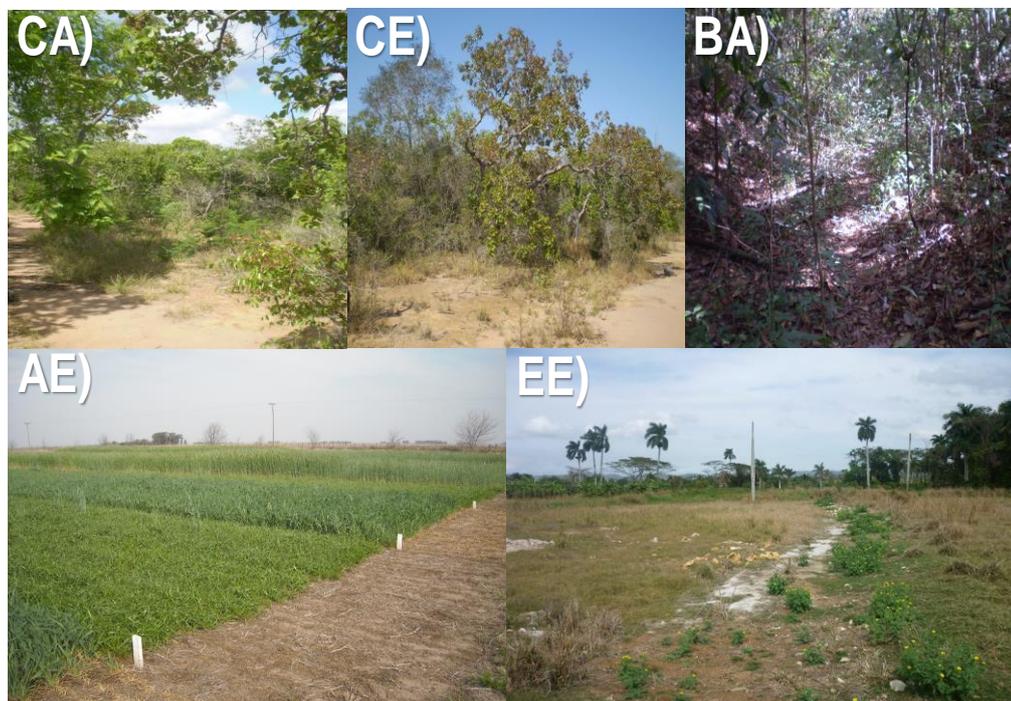


Figura 2. Imagens dos ecossistemas onde foram obtidas as Glo objeto de estudo. CA: Carrasco, CE: Cerradão, BA: Brejo altitude, AE: Ecosystem agrícola, EE: Ecosystem estressado (contaminado).

Foto de F. VARELA.

3.4.1 Extração e purificação das glomalinas

A extração da Glo foi realizada segundo metodologia de (Wright & Upadhyaya, 1998). Foi estimada a fração da glomalina total (GT). Para cada fração 1g de terra fina seca ao ar (TFSA) foi pesada. A GT foi obtida adicionando-se 8 mL de citrato de sódio 50 μ M, pH 8,0 a 121°C, por 60 min. Essa etapa foi repetida até que as amostras apresentassem coloração amarelo-claro. A fração GT sofreu centrifugação, por 10 min a 5000 rpm.

Após essa etapa, os sobrenadantes foram coletados e quantificados o teor de proteína através do método de (Bradford, 1976) modificado por (Wright & Upadhyaya, 1996), usando como padrão soro-albumina bovina. As concentrações de Glo foram corrigidas para mg g⁻¹ de solo, considerando o volume total de sobrenadante e o peso seco do solo. Após a extração foi realizada a purificação da GT, pelo método da precipitação e diálise segundo (Wright, 1998).

3.4.2 Técnicas de caracterização realizadas aos componentes orgânicos (Glomalinas e Substâncias Húmicas).

3.4.2.1 Caracterização mediante ressonância magnética nuclear em estado sólido (CP MAS ¹³C- RMN).

A caracterização RMN em estado sólido (CP MAS RMN ¹³C) das Glo foi realizada utilizando um equipamento Bruker AVANCE II RMN a 500 MHz equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ¹³C a 100.163 MHz para a obtenção de espectros a 6000 Hz e 8000 Hz de velocidade de rotação. Os espectros foram divididos em desvios químicos; as áreas foram determinadas após a integração de cada região e expressas em percentagem da área total. As regiões foram designadas como se segue: 10-20 ppm (alifático, CH₃), 38-50 ppm (alifático, -CH₂-), 50-60 ppm (O- CH₃), 70-75 ppm (C₂ - OH), 90-100 ppm (C - anomérico), 110-130 ppm (C - aromático), 170-177 ppm (-C = O), 178-181 ppm (COOH).

3.4.2.2 Caracterização mediante espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR).

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 Glo liofilizada + 200 mg de KBr).

3.4.2.3 Caracterização mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A caracterização morfológica da Glo foi realizada através da obtenção de imagens microscópicas por varredura de superfície. As amostras foram cobertas com fina camada de ouro (5 nm de espessura) com um tempo de deposição de ouro de 120 segundos. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura modelo Carl Zeiss EVO MA10 sob vácuo elevado usando uma voltagem de 10 kV.

3.4.3 Análises quimiométricas e estatísticas.

As análises quimiométricas de componentes principais (PCA) envolvendo os dados espectrais de ^{13}C -CP/MAS RMN e FTIR das Glo foram realizadas utilizando o programa Unscrambler® X 10.3 package (Camo Software AS Inc., Oslo, Norway). As análises estatísticas foram realizadas no programa Statgraphic plus v.5.5 e os gráficos feitos no programa Sigmaplot 10.0 ou Microsoft Excel 2010, quando conveniente.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Caracterização espectroscópica das glomalinas mediante CP MAS RMN ¹³C.

As Glo isoladas dos diferentes ecossistemas apresentaram padrão espectral comum em RMN ¹³C (Figura 3). Os espectros apresentaram picos atribuíveis a estruturas de carboidratos e aminoácidos coincidindo com o padrão glicoproteico relatado na literatura (Wright & Uphadyaya, 1998; Rillig & Steiberg, 2002; González-Chávez, 2004) (Anexo - Tabela 2). Os picos que registraram a presença de aminoácidos foram: 10-20 ppm: metilas (-CH₃); 38-45 ppm: metilenos (-CH₂-); 113-130 ppm: carbonos aromáticos; 173-177 ppm: carbonílas (-C=O) e 178-181 ppm: Carboxilas (-COOH) (<http://triton.iqfr.csic.es>). Os picos que registraram a presença de carboidratos foram: picos entorno a 71,7 ppm: C₂-OH (carbono contíguo ao anomérico em estrutura piranósica de monossacarídeos); entre 90-94 ppm: C_α/C_βanoméricos de estruturas de monossacarídeos (<http://csdb.glycoscience.ru>). Outros picos foram detectados nos espectros entre 54-57 ppm: atribuíveis a metoxilas (-OCH₃) e em 150 ppm: Carbono aromático ligado a O/N. Estas características comprovam a existência de padrão estrutural semelhante nas Glo mesmo quando extraídas de ecossistemas diferentes. Isto constitui mais uma evidência da existência das Glo como componente independente dentro da matéria orgânica do solo.

A análise de componentes principais (ACP) (PC1+PC2=84%) agrupou as Glo extraídas do ecossistema natural como as mais semelhantes em termos estruturais (tipo de carbono) e separou as do ecossistema agrícola e perturbado, sendo esta última a mais diferente entre todas (Figura 4A). Estes resultados mostram que as Glo possuem particularidades estruturais que são responsivas ao tipo de ecossistema.

As Glo do ecossistema natural (G1, G2 e G3) possuem maior caráter aromático, o que pode indicar que em ecossistemas sem perturbações as Glo possuem maior estabilidade estrutural. As Glo do ecossistema perturbado (G4) possuem enriquecimento de estruturas oxigenadas (-C=O e -COOH). Isto poderia indicar a ocorrência de preservação de estruturas com estas características para a interação com os metais pesados no solo contaminado, um mecanismo de defesa na interação solo-planta-microrganismo (González-Chávez, 2004; Wu et al., 2014).

As Glo do ecossistema agrícola (G5) possuem enriquecimento em carbonos anoméricos presentes nas estruturas de carboidratos. Este resultado indica a necessidade de estudos mais detalhados sobre as potencialidades das estruturas das Glo como indicadores ambientais. Os estudos sobre este predomínio estrutural em função do tipo de ecossistemas são relatados de modo inédito no presente estudo (Figura 4B).

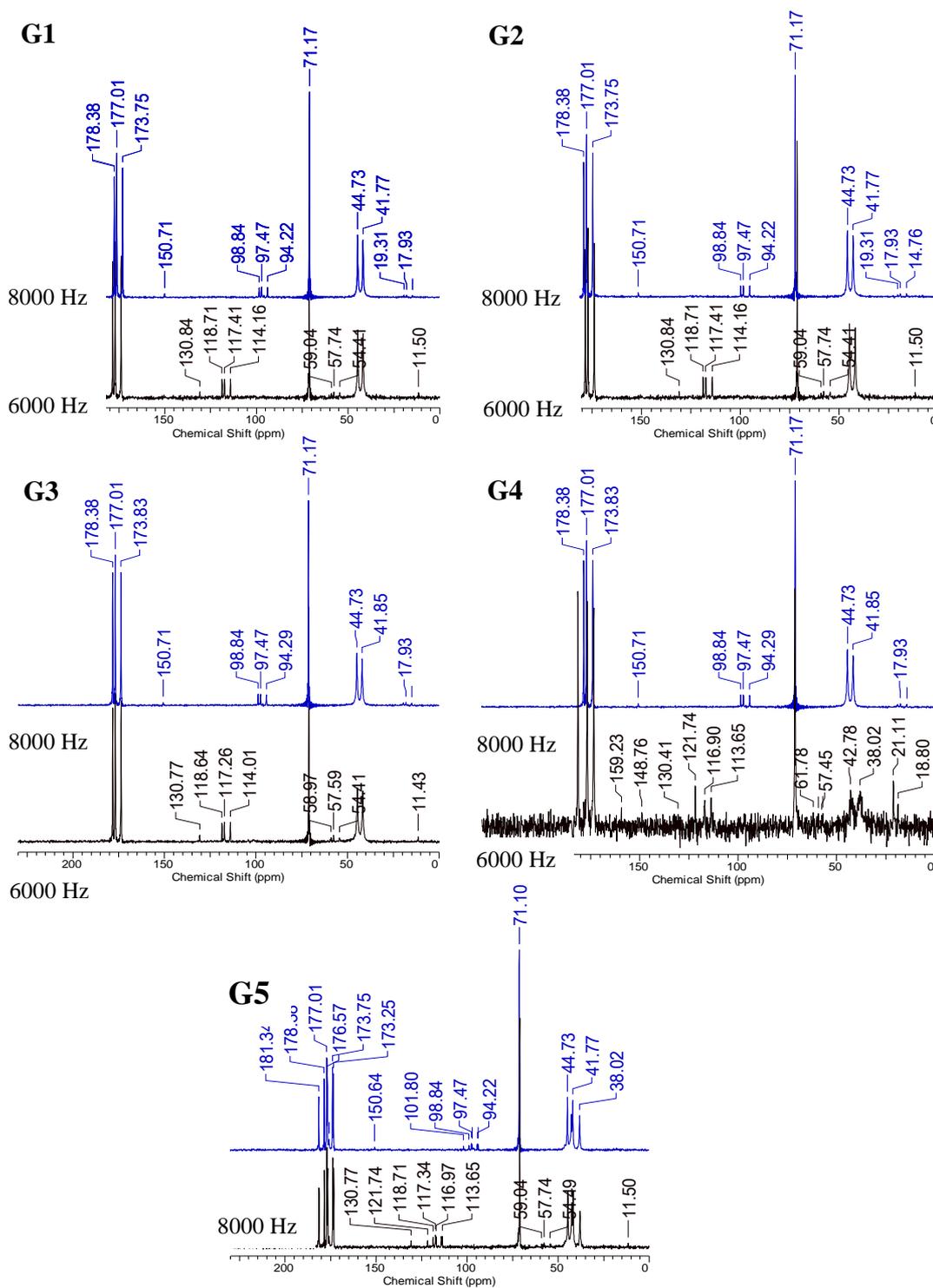


Figura 3. Espectros ^{13}C RMN das glomalinas extraídas dos diferentes ecossistemas. G1: Ecossistema natural (Carrasco-Brasil), G2: Ecossistema natural (Cerradão-Brasil), G3: Ecossistema natural (Brejo altitude-Brasil), G4: Ecossistema Estressado (Contaminado-Cuba), G5: Ecossistema Agrícola (Cultura de soja-Argentina).

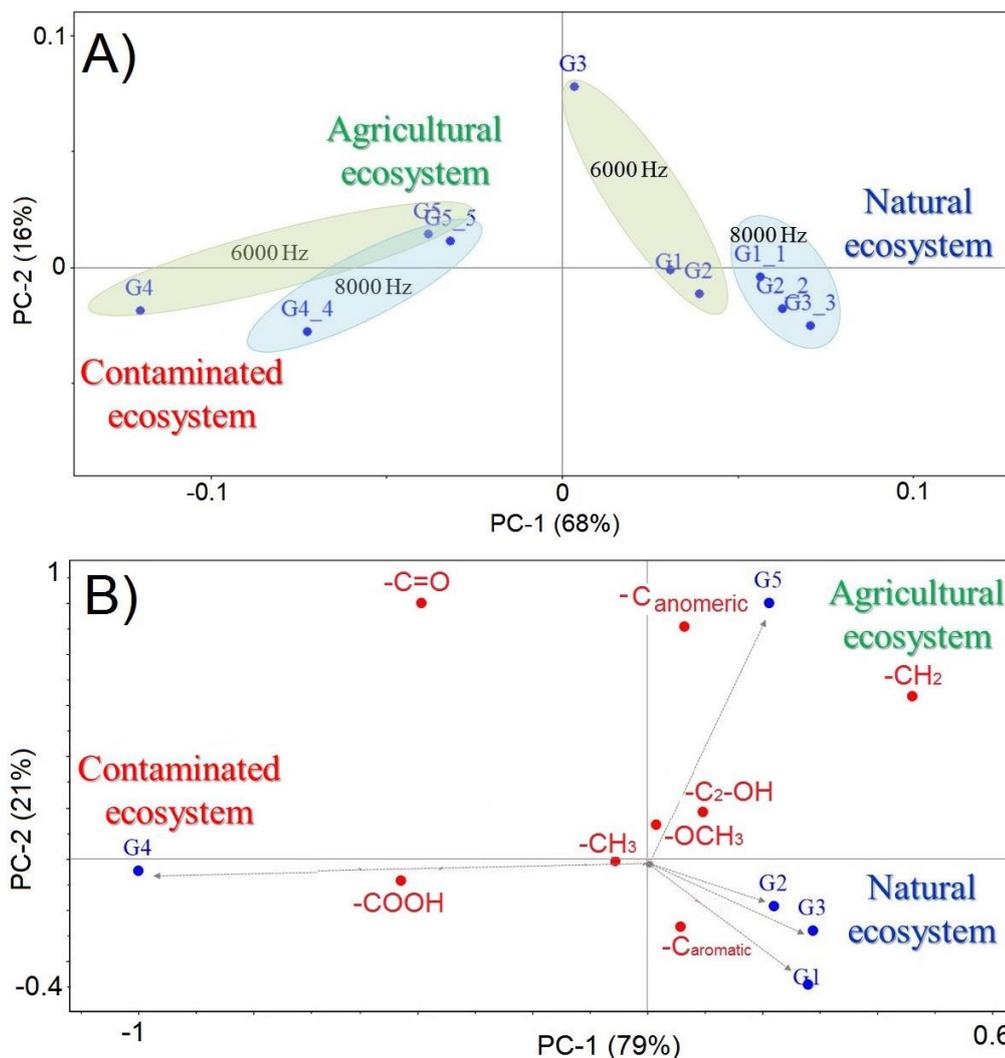


Figura 4. Análise multivariada de ACP realizada a partir dos dados espectrais de CP MAS ^{13}C RMN.

3.5.2 Caracterização espectroscópica das glomalinas mediante infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros FTIR confirmam o padrão estrutural observado mediante ^{13}C RMN e, assim, reafirmam a presença de estruturas glicoprotéicas nas Glo (Figura 5). As Glo possuem bandas entre $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ pertencentes à vibrações $-\text{NH}$ e $-\text{OH}$ de carboidratos e proteínas. As bandas entre $2910\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ pertencem aos grupamentos $-\text{CH}_2$ de proteínas e carboidratos.

Nas Glo G1, G2, G3 e G5 se registraram bandas bem resolvidas entre $1650\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ pertencentes aos grupamentos $-\text{C}=\text{O}$ (amida I) de proteínas. A Glo G5 possui uma banda bem resolvida em 1575 cm^{-1} e atribuída a grupamentos $-\text{CN}$ (amida II) de proteína. Todas as Glo possuem bandas entre $1415\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$ pertencentes a $-\text{CH}$ ou $-\text{CH}_2$ de carboidratos e proteínas. Bandas entre $1200\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ pertencem aos grupamentos $-\text{CN}$ (amida III) de

proteína e as bandas entre 1070-1080 cm^{-1} pertencem a grupamentos $-\text{CO}$ de carboidratos (Schindler et al., 2007; Mecozzi et al., 2009).

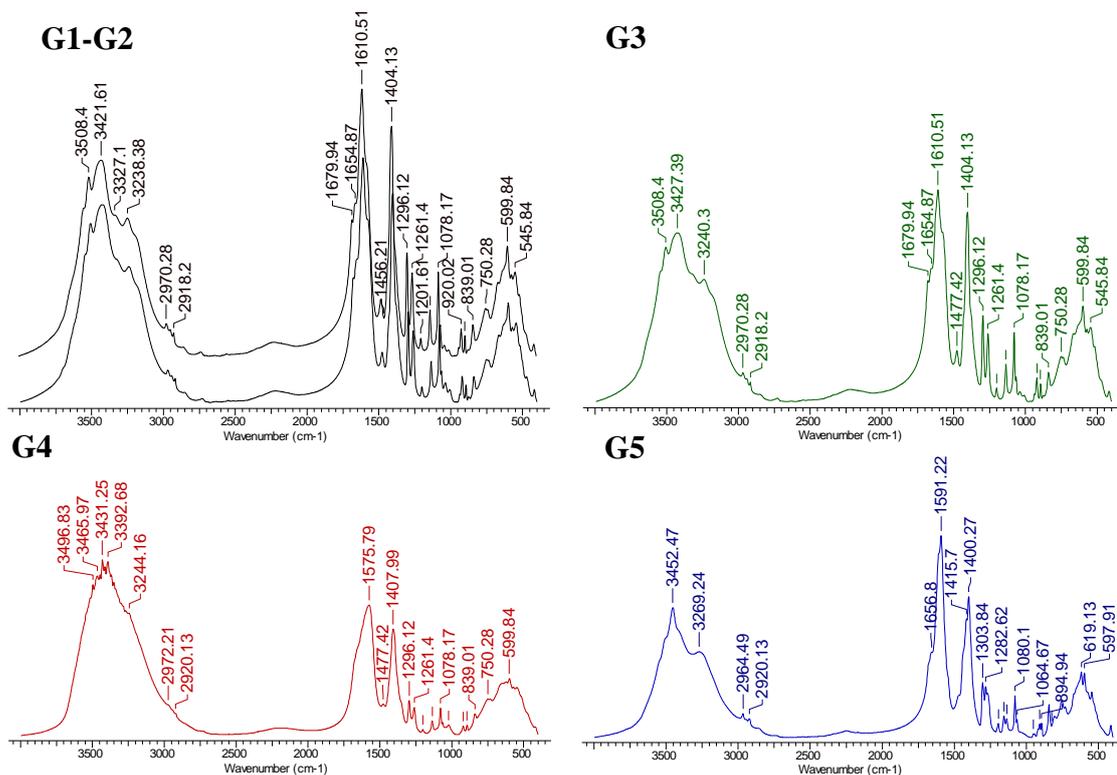


Figura 5. Espectros FTIR das glomalinas extraídas dos diferentes ecossistemas. G1: Ecossistema natural (Carrasco-Brasil), G2: Ecossistema natural (Cerradão-Brasil), G3: Ecossistema natural (Brejo altitude-Brasil), G4: Ecossistema Estressado (Contaminado-Cuba), G5: Ecossistema Agrícola (Cultura de soja-Argentina).

A análise de componentes principais (ACP) ($\text{PC1}+\text{PC2}=97\%$) também confirmou a resposta das estruturas ao tipo de ecossistema (Figura 6), como verificado na análise de ACP-RMN ^{13}C . Este resultado indica que o padrão estrutural das Glo também respondeu ao tipo de ecossistema, em termos grupamentos funcionais. Este fato permite entender que a resposta estrutural das Glo em função do ecossistema é também em nível molecular e não só limitado à presença de estruturas específicas.

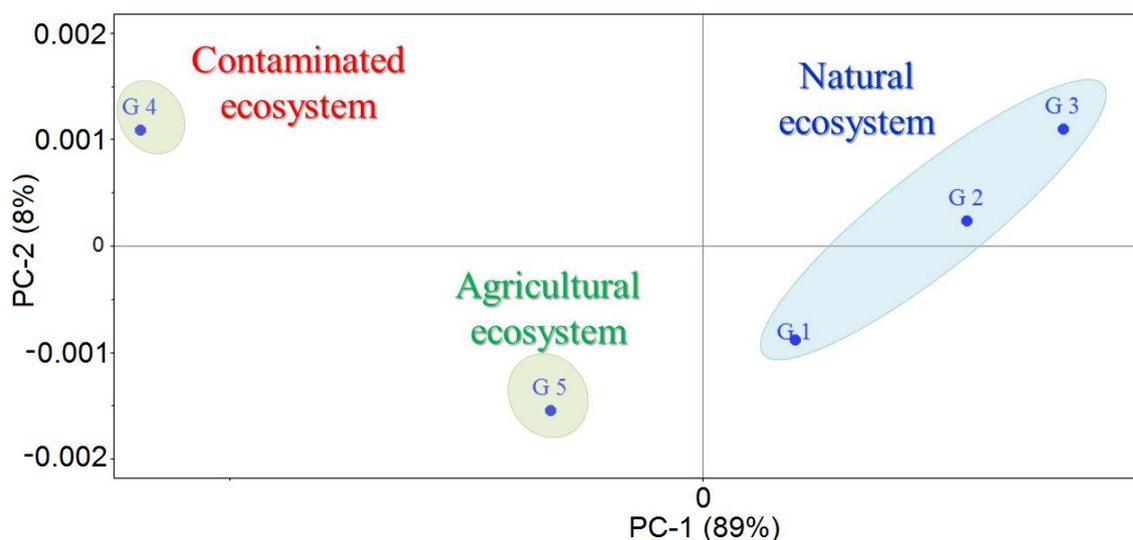


Figura 6. Análise multivariada de ACP realizada a partir dos dados espectrais de FTIR.

3.5.3 Caracterização morfológica das glomalinas mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para visualizar estas respostas em nível morfológico, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura das Glo liofilizadas (Figura 7). As Glo G1, G2 e G3 apresentaram morfologias superficiais (2 μm) e granulométrica semelhante (10 μm). De outro modo, as Glo G4 e G5 mostraram morfologias diferentes. A morfologia granular da Glo G4 tem aspecto menos amorfo, enquanto que a morfologia superficial da Glo G5 foi mais compacta (menos irregular).

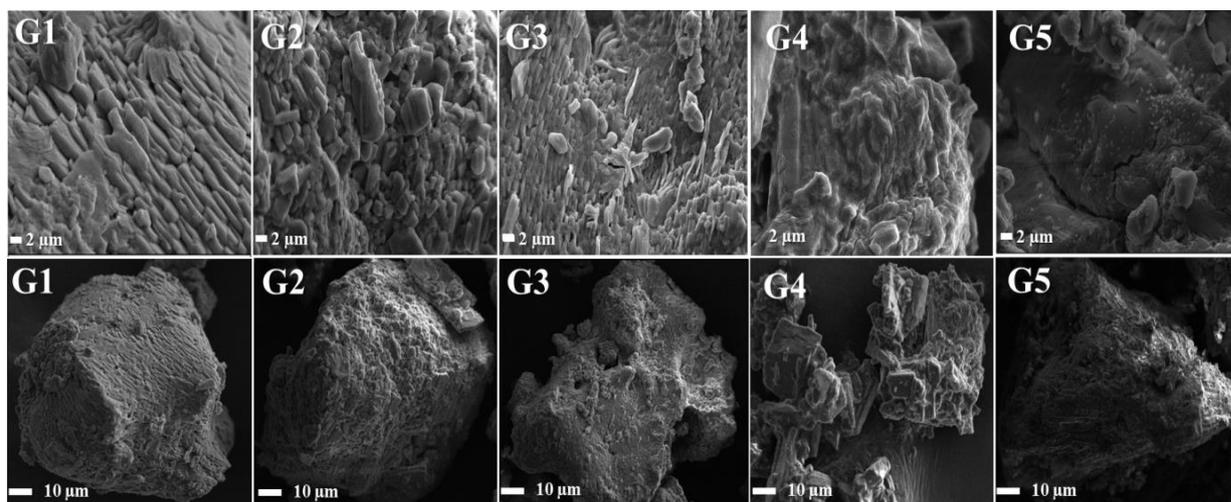


Figura 7. Imagens de MEV obtidas a duas magnificações das glomalinas dos ecossistemas. G1: Ecossistema natural (Carrasco-Brasil), G2: Ecossistema natural (Cerradão-Brasil), G3: Ecossistema natural (Brejo altitude-Brasil), G4: Ecossistema Estressado (Contaminado-Cuba), G5: Ecossistema Agrícola (Cultura de soja-Argentina).

Finalmente, a caracterização estrutural RMN ^{13}C CP MAS e FTIR aliada com o tratamento estatístico dos dados espectrais permitiram encontrar resposta do padrão estrutural das Glo isoladas em função do tipo de ecossistema. Os dados espectrais apontam para enriquecimento estrutural das Glo responsivas ao tipo de ecossistema, o que também foi refletido em suas características morfológicas.

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados confirmam a hipótese em estudo. Foi comprovado que as Glo possuem padrão glicoprotéico estrutural próprio que permite seu reconhecimento como um componente independente dentro da matéria orgânica do solo.

O padrão estrutural glicoprotéico responde ao tipo de ecossistema em que a Glo é produzida. Assim, ecossistemas menos perturbados podem possuir Glo com características estruturais mais estáveis (maior aromaticidade), ao mesmo tempo em que, ecossistemas sob manejo agrícola e perturbados apresentam Glo com características estruturais que contribuem para o equilíbrio no solo.

Estes estudos são inéditos na literatura e resultam particularmente em grande importância ao demonstrar que perturbações ocorridas nos ecossistemas refletem no equilíbrio biológico-físico e químico dos solos. As particularidades estruturais das Glo (-COOH, -C=O, C-Aromáticos e C-Anoméricos) atuam como indicadores ambientais de perturbações ou manejos dos solos.

Novos estudos estão sendo realizados para conhecer se existem determinadas estruturas nas Glo que caracterizam cada tipo de perturbação ou estresse nos ecossistemas.

4. CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES HÚMICAS DE DIFERENTES ORIGENS. SOLOS ORGÂNICOS E MATERIAIS COMPOSTADOS*

*Capítulo publicado na revista **Scientific Reports - Nature** (doi:10.1038/srep20798) tendo como autores: Garcia, A.C.; de Souza, L.G.A.; Pereira, M.G., Castro, R. N., García-Mina, J.M., Zonta, E., Lisboa, F.J.G. & Berbara, R.L.L.

4.1 RESUMO

O conhecimento da relação da propriedade em função da estrutura de substâncias húmicas (SHs) é a chave para a compreensão de seu papel no solo. Apesar dos progressos, os estudos sobre este tema ainda estão em discussão. Neste capítulo foram analisados 37 frações húmicas no que diz respeito à sua composição isotópica e características estruturais. Mostrámos que, independentemente da fonte de origem do carbono (C_3 ou C_4) extraído do solo, as SHs e ácidos húmicos (AHs) são estruturalmente semelhantes uns aos outros. A fração SH mais lábil e funcionalizada, enquanto que a fracção AH é mais recalcitrante e menos funcionalizada. Assim, pode-se concluir que suas diferenças relevantes estão em sua organização estrutural, o que pode ser entendido como supramolecularidade. Em resumo, as comparações das frações húmicas permitiram uma melhor compreensão da relação entre a fonte de carbono de origem vegetal e a estrutura. Neste estudo, os conceitos científicos são unificados e a base para o uso agrônômico de SHs é estabelecida.

Palavras-chave: Supramoléculas. Frações húmicas. Caracterização estrutural.

4.2 ABSTRACT

The knowledge of the relationship of the knowledge of the property relationship of humic structure function (HSs) is the key to the understanding of their role on the ground. Despite the progress, the studies on this topic are still under discussion. In this chapter 37 humic fractions were analyzed with respect to their isotopic composition and structural features. We have shown that, irrespective of the origin of the carbon source (C_3 or C_4) extracted soil, (HS) and humic acids (HAs) are structurally similar to each other. The HS more labile fraction and functionalized, while the HA fraction is most recalcitrant and less functionalized. Thus can conclude that their relevant differences are in their structural organization, which may be understood as supramolecularidade. In summary, the comparisons of the humic fractions allowed a better understanding of the relationship between the carbon source and plant structure. In this study, the scientific concepts are unified and the basis for agronomic use of HSs established.

Key words: Supramolecules. Humic fractions. Structural characterization.

4.3 INTRODUÇÃO

As funções da matéria orgânica dissolvida (MOD) no solo, especificamente das substâncias húmicas (MOD-SH), são bem estabelecidas (Senesi et al., 2001; Pinton et al., 2009; Tachibana et al., 2013; Tan, 2014).

Os estudos sobre a relação estrutura-propriedade das SH são de grande importância para o entendimento de seus modos de ação e a sua utilização prática. Devido às características estruturais heterogêneas e diversas fontes de origem da SH, é muito importante que os estudos desta natureza que abordem a relação estrutura-propriedade com sistemas naturais, devam incluir a caracterização estrutural das SHs como premissa (García, 2013).

A estrutura das SH tem sido descrita a partir de diferentes modelos estruturais. O objetivo de propor um modelo de estrutura consiste em poder explicar o comportamento e funções destas substâncias no ambiente (Wershaw, 1994).

Este capítulo teve como objetivo estudar a relação entre a estrutura de frações húmicas de solos e materiais compostados. Foram caracterizados um total de 37 frações húmicas (SH, AH e Hu) provenientes de solos orgânicos de distintas origens e materiais compostados mediante técnicas isotópicas, químicas e espectroscópicas (composição elementar, UV-vis, FTIR e CP MAS ¹³C RMN) bem como técnicas quimiométricas foram utilizadas para analisar características estruturais e as suas propriedades de recalcitrância e labilidade.

A fonte de material vegetal (C3 ou C4) não exerce uma clara influência nas características estruturais das frações húmicas, semelhantes entre si. Porém, as propriedades geradas a partir destas estruturas são diferentes. Assim, pode-se concluir que suas diferenças relevantes estão em sua organização estrutural, o que pode ser entendido como supramolecularidade.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Solos e materiais compostados utilizados para a obtenção das frações húmicas.

Os solos selecionados para a obtenção das frações húmicas são classificados como Histosolos (Santos et al., 2006). As amostras de solos foram coletadas em sete estados do Brasil (Rio de Janeiro, Brasília-DF, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará) com variação quanto à temperatura, umidade e precipitação (Ebeling et al., 2006; Santos, 2005). As frações húmicas foram obtidas a partir de materiais compostados, obtidos de um vermicomposto produzido com utilização de esterco bovino e capim de elefante (*Pennisetum purpureum*) como matérias primas. As propriedades dos solos e materiais compostados ver Anexo - Tabela 3 e 4 respectivamente.

Para melhor compreensão no trabalho com as frações húmicas, utilizou-se a seguinte nomenclatura: Substâncias húmicas: (Rio de Janeiro: HS_RJ, HS_RJ2, HS_RJ3 e HS_RJ4; Brasília-DF: HS_DF; Mato Grosso do Sul: HS_MS; São Paulo: HS_SP; Paraíba: HS_PB; Rio Grande do Norte: HS_RN; Ceará: HS_CE, HS_C2; Vermicomposto: HS_VCF; Composto: HS_CCF). Para os Ácidos húmicos: (Rio de Janeiro: HA_RJ, HA_RJ2, HA_RJ3 e HA_RJ4; Brasília-DF: HA_DF; Mato Grosso do Sul: HA_MS; São Paulo: HA_SP; Paraíba: HA_PB; Rio Grande do Norte: HA_RN; Ceará: HA_CE, HA_C2; Vermicomposto: HA_VCF; Composto: HA_CCF). Para as Húminas: (Rio de Janeiro: Hu_RJ, Hu_RJ2, Hu_RJ3 e Hu_RJ4; Brasília-DF: Hu_DF; Mato Grosso do Sul: Hu_MS; São Paulo: Hu_SP; Paraíba: Hu_PB; Rio Grande do Norte: Hu_RN; Ceará: Hu_CE, Hu_C2).

4.4.2 Obtenção e purificação das frações húmicas.

A extração e purificação das frações húmicas - substâncias húmicas (SH) e ácidos húmicos (AH) - foram realizadas seguindo a metodologia da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e de acordo com o protocolo descrito por Swift (Swift, 1996). Uma modificação inicial foi adotada realizando um pré-tratamento das amostras de solo com uma solução de HCl (0.1 mol L^{-1}), pH 1.0-2.0 (Schnitzer, 1982; Novotny, 2002).

4.4.3 Quantificação de isótopos estáveis do ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$).

A abundância isotópica de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) foi determinada nas amostras de frações húmicas extraídas de solos e de materiais compostados a partir de 200-400 μg usando um analisador Carlo Erba automatic C-N analyzer (EA 1108, Milan, Italy) acoplado a espectrômetro de massas continuous-flow isotope ratio-mass spectrometer (Finnigan Mat, Bremen, Germany). Os resultados foram expressos em $\delta^{13}\text{C}$ (‰) utilizando PDB como referência para o carbono.

4.4.4 Composição elementar e relação E_4/E_6 .

A composição elementar foi realizada utilizando um analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN. As análises foram realizadas utilizando-se $1,1 \pm 0.1 \text{ mg}$ de amostras pesadas em micro balança acoplada ao aparelho. O padrão de referência utilizado foi a

acetanilide (C: 71.09%; H: 6.71%; N: 10,36%). O grau de oxidação interna (Wi) e a densidade das frações húmicas foi determinado conforme Orlov (Orlov, 1985). A análise das SH e AH foi realizada por espectroscopia Ultravioleta visível (UV-vis) e a obtenção dos espectros realizados conforme Canellas (Swift, 1996). Os espectros de UV-vis foram obtidos numa faixa espectral de 200 a 800 nm. Para determinação da relação coeficiente E_4/E_6 , foi dividido o valor de absorbância em 465 nm pelo obtido em 665 nm.

4.4.5 Espectroscopia de infravermelho (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico (^{13}C -CP/MAS RMN).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos na faixa de $4.000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, 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 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. Os espectros foram divididos em desvios químicos; as áreas foram determinadas após a integração de cada região e expressas em percentagem da área total. As regiões foram atribuídos como se segue: alquilo C (CAIq-H, R): 0-45 ppm; metoxilo e N - alquilo C (CAIq-O, N): 45-60 ppm; O-alquilo C (CAIq - O): 60-91 ppm; di-O - alquilo C (anomérico) (CAIq - di-O): 91-110 ppm; aromático C (carro -H, R) : 110-142 ppm; O- aromático C (CAR- O) : 142-156 ppm; carboxilo C (CCOO - H , R) : 156-186 ppm e carbonilo C (CC = O) : 186-230 ppm .

4.4.6 Tratamento quimiométrico e estatístico dos dados espectrais.

As análises quimiométricas de componentes principais (ACP) e curvas de resolução multivariada (CRM) envolvendo os dados espectrais de ^{13}C -CP/MAS RMN e FTIR de todas as frações húmicas foram realizadas utilizando o programa Unscrambler® X 10.3 package (Camo Software AS Inc., Oslo, Norway). Os espectros ^{13}C -RMN e FTIR das frações húmicas foram carregados a partir do software e normalizados segundo a normalização por área (*aerea normalization*). A faixa selecionada para conformar as matrizes de dados espectrais ^{13}C -RMN foi de -20 ppm até 240 ppm. Os valores fora desta faixa foram descartados para evitar falsas contribuições nas análises. Nas análises ACP de cada fração húmica foram realizadas utilizando um algoritmo NIPALS, método de validação CROSS VALIDATION com um número máximo de sete componentes. Para as análises ACP FTIR, foi selecionada uma faixa entre 400 cm^{-1} e 3800 cm^{-1} . Foram utilizadas as mesmas condições de análises que as utilizadas para ^{13}C -RMN. A quantificação da labilidade e a recalitrância expressos em percentagem (%), foi realizada a partir da concentração dos componentes.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Características estruturais das frações húmicas analisadas por espectroscopia de RMN de ^{13}C .

Os picos presentes em ~ 24 ppm e ~ 32 ppm nas frações SH e AH correspondem a CH_3 ($^*\text{CH}_3\text{-R}$, $\text{R}=\text{alkyl}$) e CH_2 ($\text{R-}^*\text{CH}_2\text{-R}'$, $\text{RR}'=\text{alkyl}$) átomos de carbono, respectivamente. Nas frações Hu, o pico representando estas estruturas foi registrado em ~ 29 ppm. As três frações de picos registadas em ~ 55 ppm representando CH_3 ($^*\text{CH}_3\text{-O-R}$, $\text{R}=\text{alkyl}$) carbonos. Os picos a ~ 71 ppm representam CH_2 ($\text{R-}^*\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{R}=\text{monossacárido}$) átomos de carbono, e os picos a ~ 102 ppm correspondem a átomos de carbono anoméricos de unidades de monossacáridos. Os picos a ~ 129 ppm representam átomos de carbono de anel aromático (fenil-R, $\text{R}=\text{H}$). Picos a $\sim 172\text{-}175$ ppm são atribuídos a COO ($\text{RO-}^*\text{CO-R}'$, $\text{R}=\text{H}$ e $\text{R}'=\text{arilo}$), e aqueles em $\sim 206\text{-}209$ ppm são atribuídos a $\text{C}=\text{O}$ ($\text{R-}^*\text{CO- R}'$, $\text{RR}'=\text{alkyl}$) (Figura 8).

As frações húmicas de solos apresentaram a seguinte ordem de aromaticidade: $\text{AH} > \text{SH} > \text{Hu}$. As assinaturas espectrais das frações húmicas correspondem à presença de carbonos sp^3 e sp^2 . As características estruturais das frações húmicas de solo mostram que os AH possuem maior predomínio de C-alifáticos e C-aromático não substituído quando comparada com as frações de SH e Hu. Dentre as frações húmicas extraídas de materiais compostados (AH e SH), os AH possuem predomínio de C-aromático não substituído e propriedades aromáticas mais marcantes.

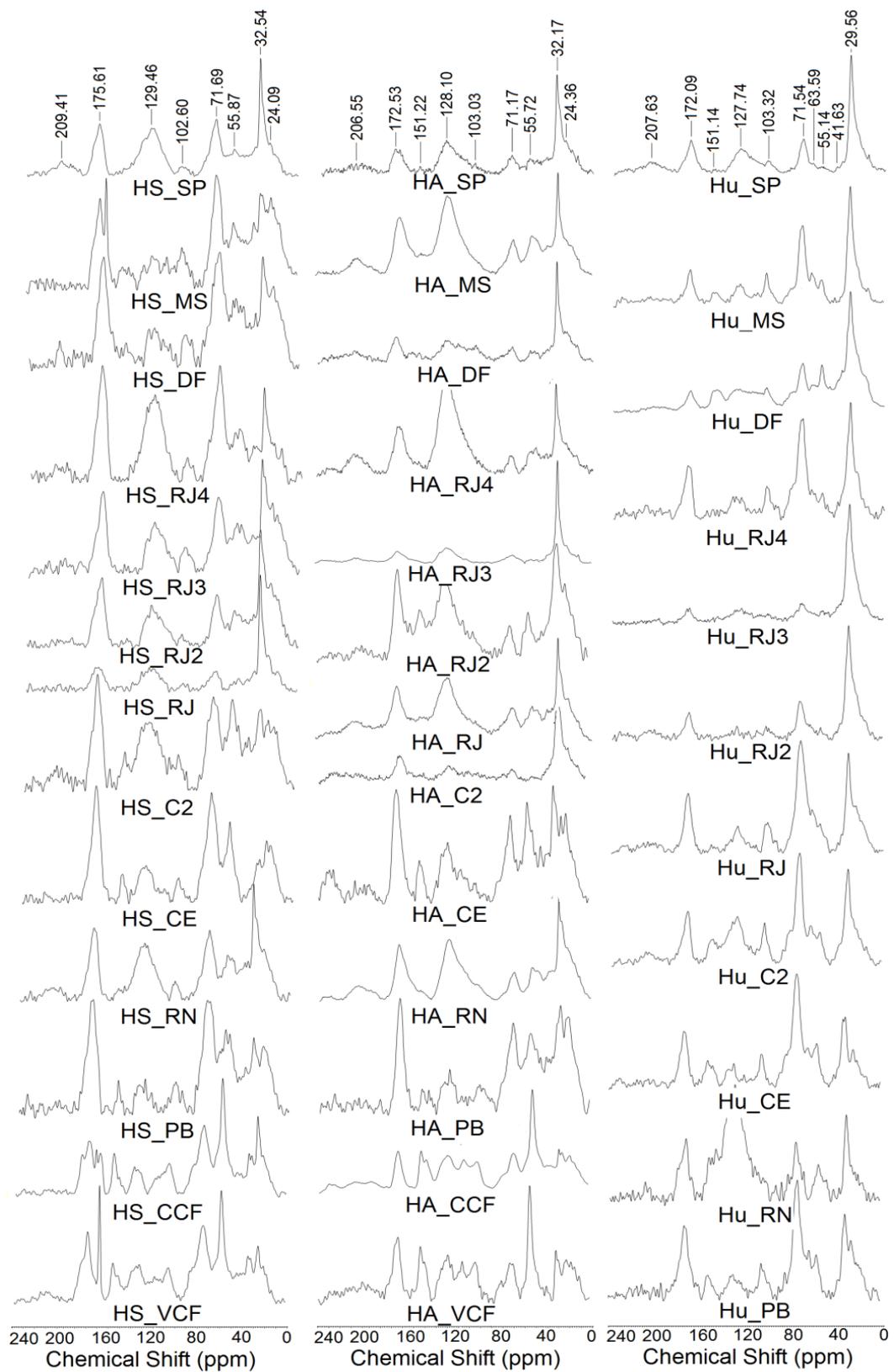


Figura 8. Espectros de ^{13}C CP MAS RMN das diferentes frações húmicas extraídas de solos orgânicos e materiais compostados.

As características estruturais das frações húmicas extraídas de solos e as extraídas a partir de materiais compostados, indicam que nos AH de solos há predomínio de C-alifáticos e aromáticos não substituídos. No entanto, AH de vermicomposto apresentaram características aromáticas mais marcantes que os extraídos de solos. Para as frações de SH de solos destaca-se um predomínio médio de C-alifáticos não substituído (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuições relativas (percentuais) de tipos de carbono dos espectros de ^{13}C -CP / MAS-RMN.

Fração Húmica	CAlk-H,R	CAlk-O,N	C Alk-O	CAlk-di-O	CAR-H,R	CAR-O,N	COO-H,R	C=O	Arom ^a	Aliph ^b
HS_RJ	3913	6,52	10,87	3,26	17,39	4,35	13,04	5,43	21,74	78,26
HS_RJ2	36,84	11,58	11,58	2,11	15,79	2,11	15,79	4,21	17,89	82,11
HS_RJ3	31,58	12,63	14,74	4,21	15,79	2,11	13,68	5,26	17,89	82,11
HS_RJ4	17,89	11,58	18,95	3,16	21,05	5,26	16,84	5,26	26,32	73,68
HS_DF	28,42	14,74	21,05	4,21	8,42	3,16	14,74	5,26	11,58	88,42
HS_MS	32,98	12,77	17,02	5,32	9,57	4,26	14,89	3,19	13,83	86,17
HS_SP	26,53	10,20	15,31	2,04	23,47	3,06	12,24	7,14	26,53	73,47
HS_PB	24,21	16,84	21,05	4,21	7,37	4,21	17,89	4,21	11,58	88,42
HS_RN	27,37	11,58	15,79	3,16	20,00	3,16	13,68	5,26	23,16	76,84
HS_CE	20,00	13,68	22,11	3,16	11,58	4,21	21,05	4,21	15,79	84,21
HS_C2	23,40	13,83	14,89	4,26	18,09	5,32	13,83	6,38	23,40	76,60
Média	27,30	12,06	16,27	3,42	14,35	3,58	15,07	4,97	18,30	80,76
SD	6,35	2,53	3,60	0,95	5,15	1,06	2,43	1,05	5,26	5,26
HS_VC	18,37	16,33	18,37	6,12	13,27	6,12	17,35	4,08	19,39	80,61
F										
HS_CC	21,43	19,39	18,37	6,12	9,18	5,10	17,35	3,06	14,29	85,71
H̃A_RJ	30,68	5,68	5,68	5,68	25,00	6,82	15,91	4,55	31,82	68,18
ĤA_RJ	48,89	2,22	7,78	1,11	18,89	1,11	12,22	7,78	20,00	80,00
ḢA_RJ	21,43	6,12	3,06	5,10	39,80	3,06	13,27	8,16	42,86	57,14
ḦA_DF	38,54	4,17	6,25	8,33	18,75	2,08	12,50	9,38	20,83	79,17
HA_MS	22,22	10,10	7,07	5,05	29,29	5,05	15,15	6,06	34,34	65,66
HA_SP	37,89	6,32	7,37	4,21	22,11	2,11	11,58	8,42	24,21	75,79
HA_PB	34,74	12,63	16,84	5,26	8,42	3,16	13,68	5,26	11,58	88,42
HA_RN	31,63	8,16	7,14	5,10	25,51	1,02	15,31	6,12	26,53	73,47
HA_CE	30,00	12,22	14,44	3,33	13,33	4,44	15,56	6,67	17,78	82,22
HA_C2	51,09	1,09	6,52	5,43	10,87	2,17	14,13	8,70	13,04	86,96
HA_RJ	24,24	7,07	9,09	5,05	25,25	5,05	15,15	9,09	30,30	69,70
Média	32,49	5,68	7,55	4,46	19,76	2,79	13,97	7,11	23,14	74,59
SD	9,41	3,55	3,78	1,66	8,55	1,76	1,42	1,56	9,05	9,05
HA_VC	20,00	13,68	9,47	9,47	15,79	9,47	12,63	9,47	25,26	74,74
H̃A_CC	22,45	18,37	14,29	7,14	18,37	8,16	7,14	4,08	26,53	73,47
Ĥu_RJ	23,96	5,21	33,33	6,25	9,38	2,08	13,54	6,25	11,46	88,54
Hu_RJ2	46,81	3,19	17,02	5,32	6,38	2,13	12,77	6,38	8,51	91,49
Hu_RJ3	62,11	2,11	10,53	3,16	7,37	1,05	7,37	6,32	8,42	91,58

Hu_RJ4	27,47	5,49	31,87	4,40	6,59	2,20	15,38	6,59	8,79	91,21
Hu_DF	50,52	4,12	12,37	5,15	10,31	5,15	7,22	5,15	15,46	84,54
Hu_MS	30,21	5,21	29,17	7,29	10,42	3,13	10,42	4,17	13,54	86,46
Hu_SP	40,21	2,06	13,40	5,15	16,49	1,03	13,40	8,25	17,53	82,47
Hu_PB	23,08	6,59	27,47	6,59	8,79	4,40	17,58	5,49	13,19	86,81
Hu_RN	15,38	5,49	12,09	4,40	32,97	9,89	9,89	9,89	42,86	57,14
Hu_CE	17,71	8,33	37,50	4,17	6,25	6,25	14,58	5,21	12,50	87,50
Hu_C2	17,89	6,32	34,74	5,26	12,63	4,21	12,63	6,32	16,84	83,16
Média	29,21	4,52	21,25	5,07	10,15	3,03	11,83	6,21	13,68	84,02
SD	14,72	1,83	10,01	1,13	7,36	2,51	3,9	1,49	9,21	9,21

^(a)Aromaticidade: **Arom** = $([\text{CAr-H,R (110-142 ppm)} + \text{CAr-O,N (142-156 ppm)}]/\text{total peak area (0-230 ppm)}) * 100$

^(b)Alifaticidade: **Aliph** = $(100 - \text{Arom})$

Os dados espectrais ^{13}C CP MAS RMN mediante análise multivariada confirmam esta observação (Figura 9). O gráfico de ACP (73% da variância total explicada) (Figura 9-A) indica um agrupamento em valores negativos na PC1 (57%) de dez dos treze AH estudados, onde se incluem os AH extraídos de materiais compostados. A ACP (Figura 9-A1) apresenta com 92% da variância total explicada relacionada à quantidade relativa de tipos de carbonos de cada AH. Na PC1 (60%) ficaram agrupados seis AH de solos devido ao predomínio em estruturas C-alquil-O e C-alquil enquanto outros cinco AH foram agrupados a valores negativos devido ao predomínio de C-aromático. Os AH extraídos de materiais compostados apresentaram maior relação com C-aromático e alifático substituídos.

As frações de SH distribuíram-se em dois grupos na ACP (76% da variância total explicada) dos espectros puros (Figura 9-1B). Ao contrário do comportamento apresentado pelas frações de AH, seis frações de SH apresentaram maior relação com C-aromático e C-alifático não substituído na PC1 (72%). As frações restantes de SH, incluídas as pertencentes a materiais compostados, apresentaram estreita relação com C-aromático e C-alifático substituído (Figura 9-B1).

A fração Hu apresentou uma distribuição na ACP com 86% da variância total com PC1 (72%) semelhante ao apresentado pelos AH (Figura 9-1C). Cinco frações de Hu se agruparam e relacionaram a C-alifático (valores positivos) enquanto que as restantes estiveram agrupadas e relacionadas (valores negativos) ao C-aromático e alifático (PC1 72%).

aromático não substituído, enquanto que as SH de solos, SH e AH de materiais compostados se relacionam com os C-alifático e aromáticos mais funcionalizados.

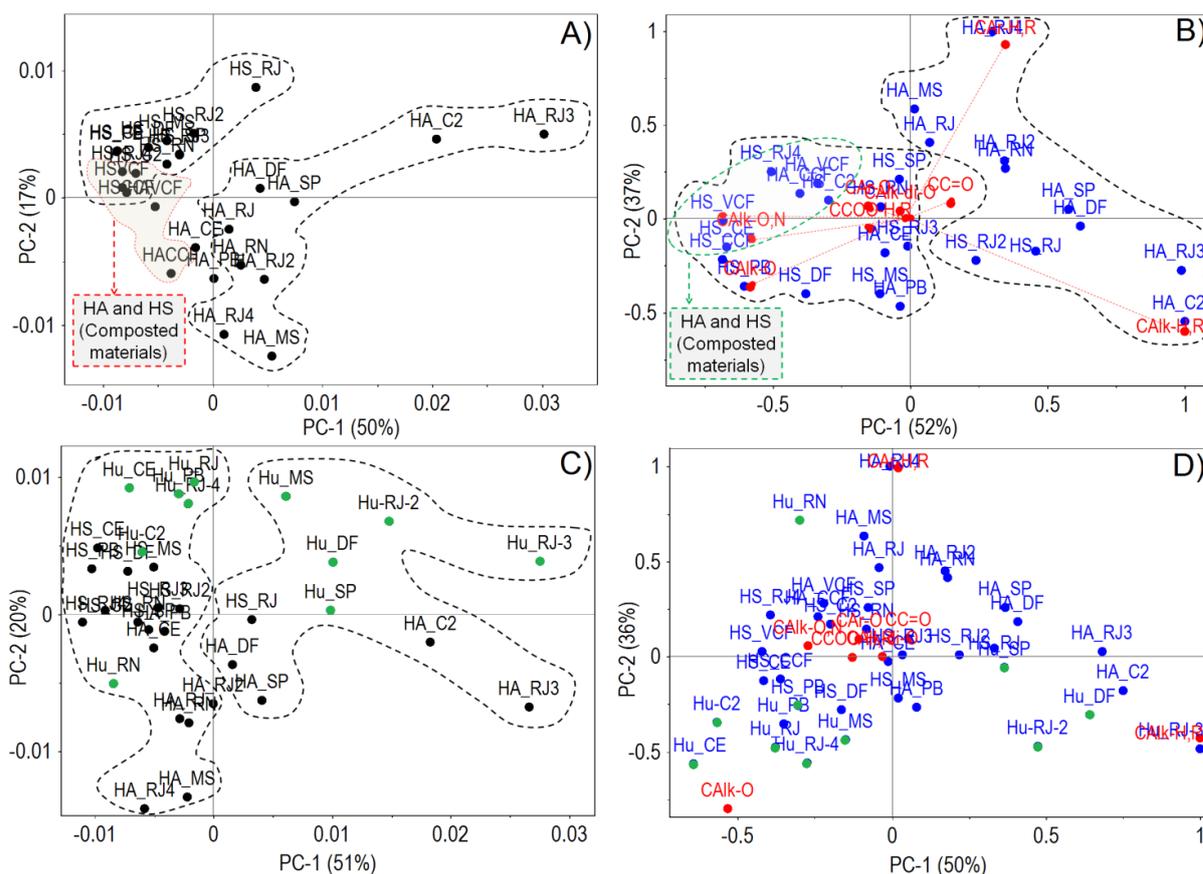


Figura 10. Análises de ACP para os dados obtidos a partir do carregamento dos espectros de ^{13}C CP MAS RMN para as SH dos solos orgânicos e materiais compostados. A e C) ACP realizado a partir dos espectros puros. B e D) ACP realizado a partir da integração por regiões nos espectros puros.

A ACP (71% da variância total explicada) na Figura 10-C mostra as três frações estudadas. Em valores positivos da PC1 (51%) foram agrupadas cinco frações Hu e três de AH enquanto que, em valores negativos, aparecem relacionadas as três frações (SH, AH e Hu). A Figura 10-D mostra na ACP (86% da variância total explicada) um agrupamento com valores positivos da PC1 (50%) de Hu e AH com a mesma origem e estreitamente relacionados com C-alifático não substituído. Outro grupo de Hu esteve agrupado com as SH a valores positivos da PC1 e estreitamente relacionado com C-funcionalizados.

4.5.2 Labilidade e recalitrância nas frações húmicas analisadas mediante espectroscópica ^{13}C RMN aliada a CRM.

As SH apresentam um padrão de recalitrância resultante do C-aromático e C-alifático não substituído e uma labilidade resultante fundamentalmente do C-alifático substituído (C-

alquil O, N e C-alquil-O) e C de carboxilas (Figura 11-A). Por outro lado, a recalitrância nos AH além de ser resultado do C-aromático e C-alifático não substituído, também apresentou contribuição dos C pertencentes a carboxilas, enquanto que a labilidade foi o resultado de C-alifático não substituído assim como o de C-aromático (Figura 11-B). Já nas Hu os padrões de recalitrâncias e labilidade foram bem menos evidentes, isto porque a maior contribuição para a recalitrância foi devida tanto ao C-aromático como também por estruturas alifáticas substituídas e C carboxílicos. A labilidade por sua vez teve a maior contribuição do C-alifático substituído e não substituídos e dos C carboxílicos (Figura 11-C).

A quantificação da labilidade e a recalitrância (%) reafirmam as diferenças observadas nas CRM das frações húmicas (Figuras 11-D, 11-E e 11-F). As HS extraídas de solos apresentaram ~56% de labilidade e ~24% de recalitrância, enquanto que os HA apresentaram ~47% de labilidade e ~39% de recalitrância. As Hu apresentam 67% de labilidade e 32% de recalitrância. A ordem de recalitrância que as frações apresentam foi: AH>Hu>SH.

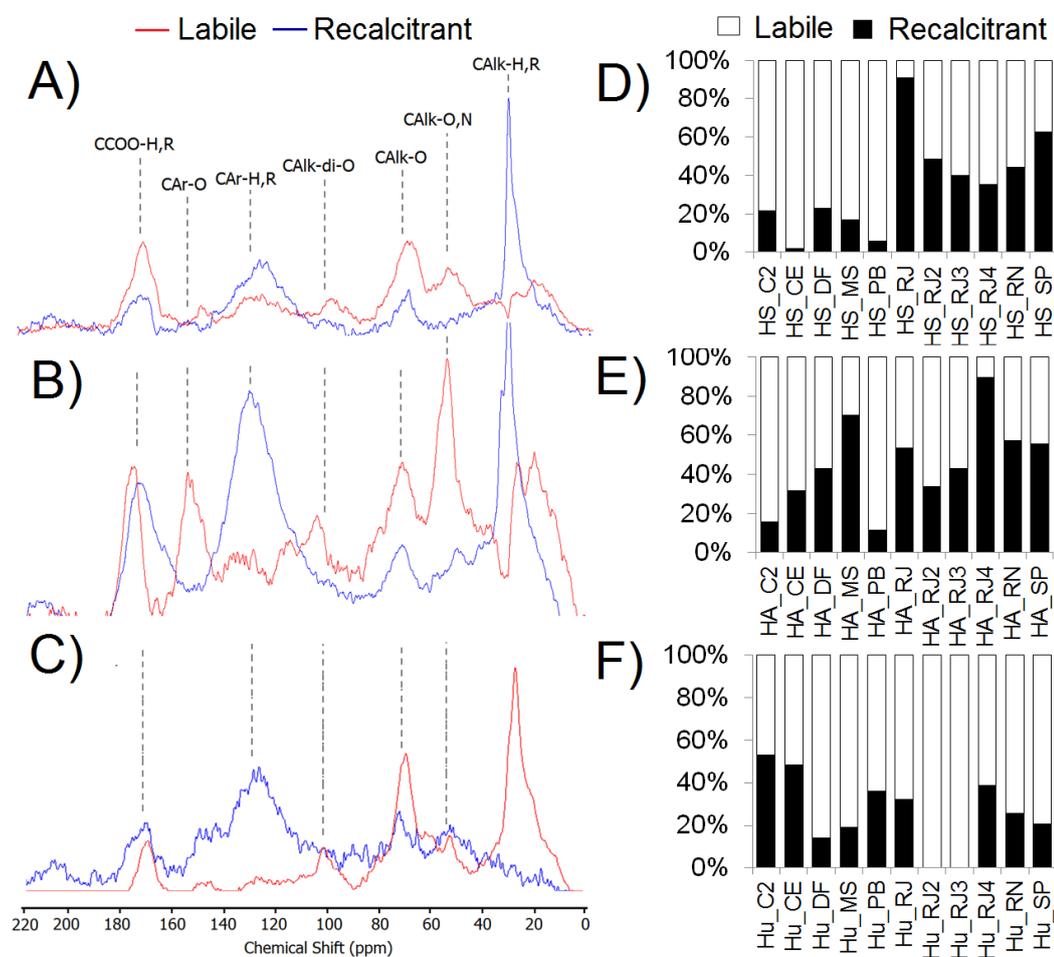


Figura 11. Curva de resolução multivariada (CRM) realizada a partir do carregamento dos espectros ¹³C CP MAS RMN para as SH dos solos orgânicos e materiais compostados. A) CRM das SH, B) CRM dos AH e C) CRM das Hu.

4.5.3 As diferenças estruturais entre as frações húmicas das diferentes origens observadas mediante espectroscópica FTIR.

As características espectrais nas frações húmicas mostram a presença de grupamentos funcionais de diferente natureza química. As bandas de absorção a $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ indicam a presença de vibrações de alongamento (\square) -OH e / ou -NH (álcoois, ácidos carboxílicos e amidas). As bandas a $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ e 2800 cm^{-1} correspondem a simétrica e assimétrica \square -CH, respectivamente (CH₃) alifático. Uma banda intensa destaca-se nas frações do SH em $\sim 1593 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a C vibrações = C de estruturas aromáticas e simétricas e assimétricas \square -COO-. Nas fracções AH, a banda de absorção a $\sim 1715 \text{ cm}^{-1}$ atribuídos a \square COOH dos ácidos carboxílicos foi mais visível. Bandas visíveis entre 1617 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} nas fracções de Hu e AH, respectivamente, são bandas correspondentes aos complexos \square C = C aromático, \square C = O da amida I, -COO- e simétrica \square (na AH o -COO- \square assimétrica era visível em 1407 cm^{-1}). Bandas complexas em 1388 cm^{-1} e 1378 cm^{-1} visível na SHs e tem correspondência a \square OH, -CH₂ e -CH₃ deformações e \square CO de fenóis. As bandas a $\sim 1035 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1097 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a -OH \square de álcoois alifáticos e polissacáridos (Figura 12).

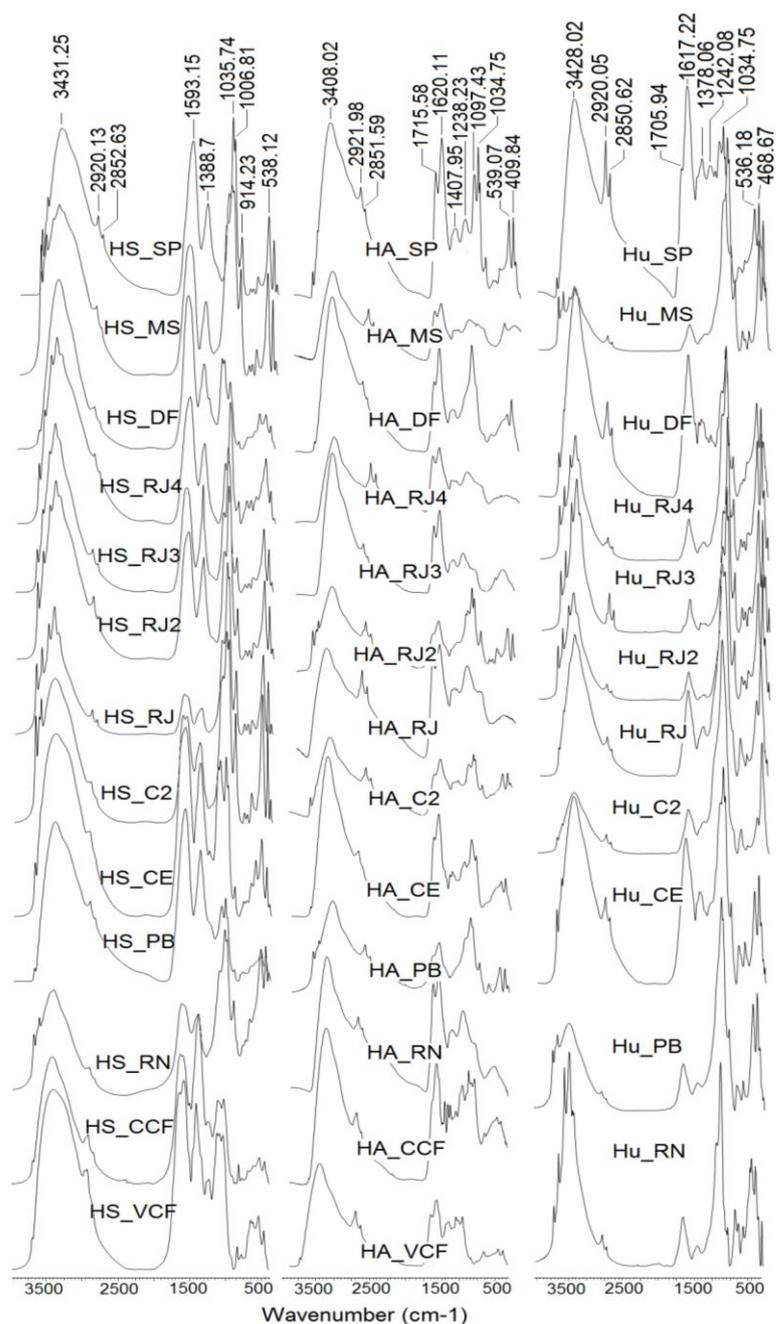


Figura. 12. Espectros de FTIR das SH extraídas de solos orgânicos e materiais compostados.

A Figura 13 mostra a ACP (89% da variância total explicada) para as frações de AH. Nove AH se agruparam em valores positivos da PC1 (79%) e quatro em valores negativos. Diferente das ACPs realizadas a partir dos espectros ^{13}C RMN, nesta análise os AH originários de materiais compostados não mostraram semelhanças em termos de grupamentos funcionais (Figura 13-A). A ACP (75% da variância total explicada) para as frações de SH mostrou uma clara separação destas frações em dois grupos: sete frações de SH se agrupando a valores positivos da PC1 (56%) e seis a valores negativos. As SH originárias de materiais compostados também não mostraram semelhança em termos de grupamentos funcionais (Figura 13-B). A ACP (86% da variância total explicada) também mostrou que as Hu se

distribuem em dois grupos na PC1 (65%). Seis Hu se agruparam em valores positivos e cinco em valores negativos (Figura 13-C).

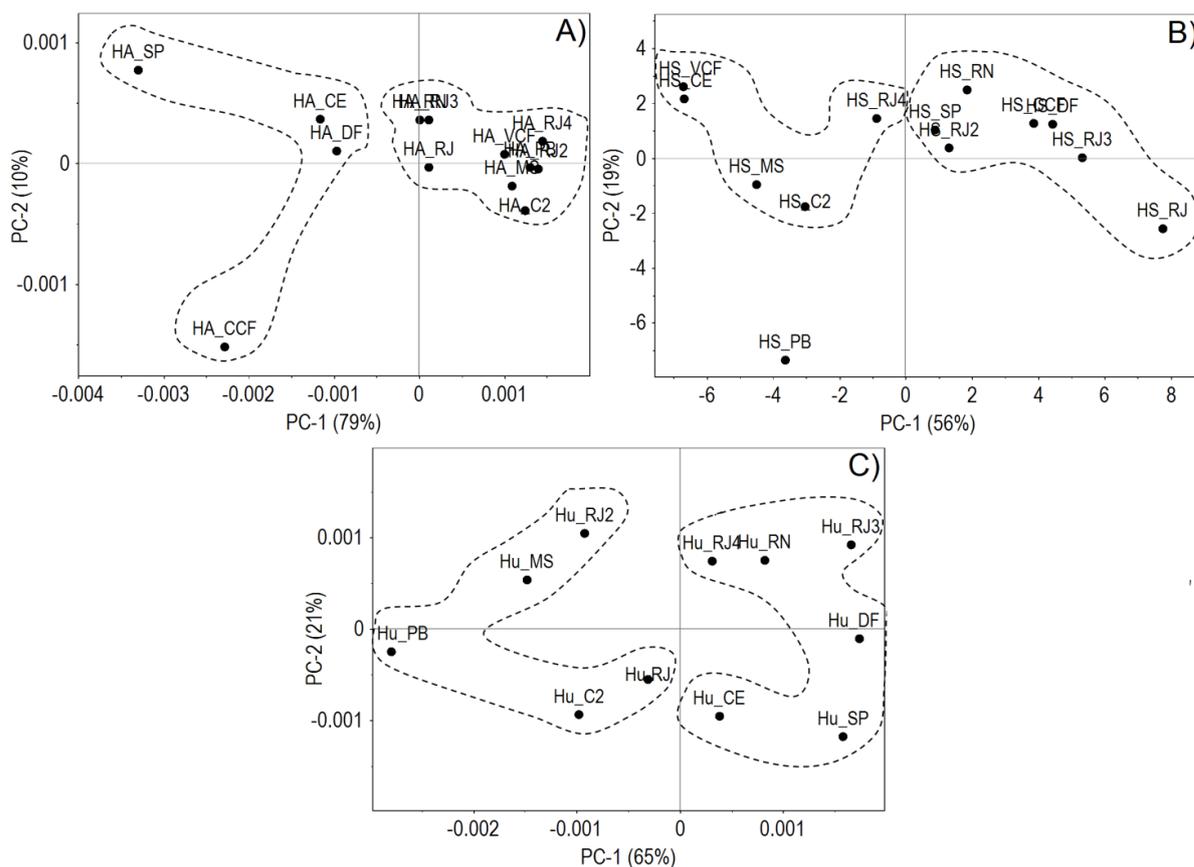


Figura 13. ACP para os dados obtidos dos espectros FTIR de SHs extraído dos solos orgânicos e materiais compostados.

A comparação entre as frações de AH e SH na ACP (92% da variância total explicada) mostra uma clara separação destas frações na PC1 (85%) (Figura 14-A). As SH e os AH apresentaram fortes diferenças em termos de grupamentos funcionais. As SH se agruparam em valores positivos da PC1 enquanto os AH se agruparam em valores negativos. A ACP das três frações (80% da variância total explicada) mostrou que as Hu são semelhantes aos AH em termos de grupamento funcional, se agrupando em estreita relação na PC1 (50%).

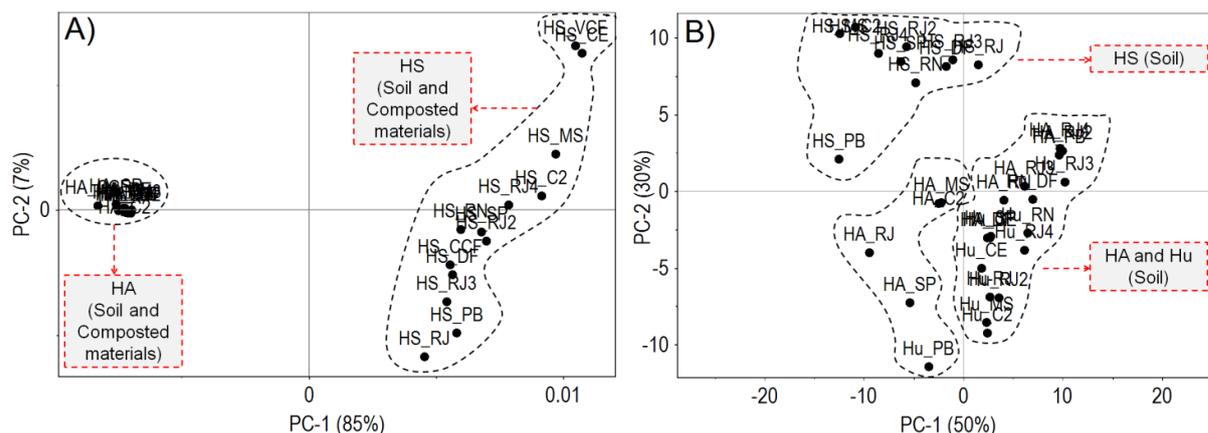


Figura 14. Análises de ACP para os dados obtidos a partir do carregamento dos espectros de FTIR para as SH dos solos orgânicos e materiais compostados.

As diferenças estruturais entre as frações húmicas das diferentes origens foram também observadas mediante composição isotópica e elementar. A composição isotópica $\delta^{13}\text{C}$ foi semelhante nas três frações húmicas isoladas de solo (Tabela 3). De maneira geral, estas frações húmicas apresentaram uma composição isotópica entre -20 ‰ e -30 ‰ enquanto que, as frações isoladas de materiais compostados possuem uma composição entre -14 ‰ e -16 ‰. Esta composição isotópica mostra que o carbono vegetal nas frações húmicas de solos pode ter origem em plantas de ciclo fotossintético C_3 enquanto que o carbono nas frações húmicas de materiais compostados é originário de plantas C_4 (Alves et al., 2005) (Tabela 3).

Tabela 3. Composições elementares, isotópicas, parâmetros de oxidação, volumes aparentes, densidades aparentes, e relação E4 / E6 de SHs.

SH	C H N O				H/C	C/N	O/C	ω	ν	δ	E ₄ /E ₆	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
	-----%-----											
HS_RJ	48,17	4,75	2,27	44,35	1,18	24,76	0,69	1,74	0,61	1,64	5,87	-22,687
HS_RJ2	49,26	4,86	3,68	41,72	1,18	15,62	0,64	1,60	0,62	1,61	6,01	-22,153
HS_RJ3	49,07	4,92	4,49	39,58	1,20	12,75	0,60	1,51	0,62	1,62	6,11	-22,192
HS_RJ4	47,26	4,33	3,12	41,81	1,10	17,67	0,66	1,68	0,59	1,70	5,92	-18,623
HS_DF	49,74	4,16	1,40	44,18	1,00	41,45	0,67	1,69	0,60	1,65	5,67	-25,401
HS_SP	47,60	4,52	3,62	42,46	1,14	15,34	0,67	1,69	0,60	1,67	6,21	-17,411
HS_MS	49,19	4,43	3,26	40,50	1,08	17,60	0,62	1,56	0,60	1,65	6,02	-24,937
HS_PB	49,40	3,44	2,52	43,44	0,84	22,87	0,66	1,69	0,58	1,73	5,44	-19,118
HS_RN	49,62	4,14	2,42	43,06	1,00	23,92	0,65	1,65	0,60	1,66	5,77	-25,210
HS_CE	50,23	4,18	3,45	39,60	1,00	16,99	0,59	1,49	0,60	1,65	5,81	-24,552
HS_C2	49,01	4,42	4,37	40,22	1,08	13,08	0,62	1,55	0,60	1,66	6,13	-20,732
HS_CC	53,95	4,05	2,03	40,67	0,90	31,01	0,57	1,43	0,63	1,58	4,35	-14,684
HS_VC	50,06	3,77	4,17	41,72	0,90	14,01	0,63	1,59	0,59	1,68	5,01	-15,005
Média	49,40	4,29	2,99	41,76	1,04	19,30	0,63	1,62	0,60	1,66	5,90	
SD	1,56	0,40	0,92	1,7	0,11	7,95	0,03	0,08	0,01	0,03	0,22	
HA_RJ	52,40	3,35	3,71	45,34	0,77	16,48	0,65	1,67	0,61	1,65	4,12	-22,483

HA_RJ2	49,49	3,66	2,80	43,03	0,89	20,62	0,65	1,66	0,59	1,70	4,33	-25,124
HA_RJ3	49,68	3,55	2,49	43,64	0,86	23,28	0,66	1,69	0,59	1,71	3,96	-23,595
HA_RJ4	53,10	4,06	2,68	46,36	0,92	23,12	0,65	1,67	0,63	1,58	3,93	-21,948
HA_DF	47,64	4,31	1,98	41,35	1,09	28,07	0,65	1,65	0,59	1,70	4,76	-21,056
HA_MS	52,34	3,12	3,20	46,02	0,72	19,08	0,66	1,70	0,60	1,67	4,66	-25,179
HA_SP	51,40	3,28	2,20	45,92	0,77	27,26	0,67	1,72	0,59	1,68	4,71	-16,604
HA_PB	50,98	3,47	2,26	45,25	0,82	26,32	0,67	1,71	0,60	1,68	4,88	-21,963
HA_RN	51,23	3,44	3,78	44,01	0,81	15,81	0,64	1,65	0,60	1,68	4,49	-24,850
HA_CE	49,92	4,08	4,33	41,51	0,98	13,45	0,62	1,58	0,60	1,66	3,90	-24,101
HA_C2	50,24	3,40	2,60	44,24	0,81	22,54	0,66	1,69	0,59	1,71	4,07	-22,500
HA_CC	52,76	3,04	3,58	46,14	0,69	17,19	0,66	1,69	0,60	1,67	4,23	-14,857
HA_VC	51,25	3,30	3,89	44,06	0,77	15,37	0,64	1,66	0,59	1,69	4,41	-16,108
Média	50,93	3,52	2,95	44,34	0,83	20,13	0,65	1,67	0,60	1,67	4,33	
SD	1,48	0,37	0,72	1,61	0,11	4,66	0,01	0,04	0,01	0,04	0,35	
Hu_RJ	37,90	3,82	1,91	32,18	1,21	23,21	0,64	1,60	0,48	2,09	---	-18,575
Hu_RJ2	38,36	3,25	1,37	33,74	1,02	32,78	0,66	1,67	0,47	2,14	---	-23,654
Hu_RJ3	31,20	3,38	1,72	26,10	1,30	21,13	0,63	1,56	0,40	2,49	---	-22,787
Hu_RJ4	36,59	3,47	1,24	31,88	1,14	34,30	0,65	1,65	0,46	2,19	---	-26,163
Hu_MS	39,35	3,78	1,47	34,10	1,15	31,32	0,65	1,64	0,49	2,03	---	-26,487
Hu_DF	39,10	4,97	1,54	32,59	1,53	29,70	0,63	1,54	0,53	1,90	---	-26,831
Hu_C2	30,30	3,27	1,46	25,57	1,30	24,29	0,63	1,58	0,39	2,57	---	-22,116
Hu_SP	33,90	4,37	1,36	28,17	1,55	29,02	0,62	1,53	0,46	2,19	---	-27,600
Hu_PB	38,45	3,07	1,57	33,81	0,96	28,63	0,66	1,68	0,46	2,16	---	-20,949
Hu_RN	35,40	3,38	1,83	30,19	1,15	22,59	0,64	1,61	0,44	2,26	---	-25,354
Hu_CE	38,10	4,11	2,11	31,88	1,29	21,05	0,63	1,57	0,49	2,04	---	-23,970
Média	36,11	3,68	1,58	30,79	1,22	26,70	0,64	1,60	0,46	2,18	---	
SD	3,02	0,55	0,25	2,90	0,18	4,58	0,01	0,05	0,04	0,19	---	

As frações húmicas SH extraídas dos materiais compostados mostraram maiores valores de C do que o apresentado pelas SH extraídas de solos orgânicos enquanto HS_VCF apresentou quantidades superiores de N. A relação H/C foi inferior nas SH extraídas de materiais compostados, o v nas HS_CCF foi levemente superior e a δ em HS_VCF foi ligeiramente superior quando comparadas com as SH extraídas de solos. As frações HS_CCF e HS_VCF apresentaram menores relações E_4/E_6 .

Quando comparados com os AH extraídos de solos, os extraídos de materiais compostados apresentaram maiores conteúdos de C e N. A fração HA_CCF apresentaram os maiores conteúdos de O, maior relação O/C e maior valor ω , enquanto HA_VCF apresentaram os maiores valores de δ e relação E_4/E_6 .

A Figura 15 mostra como se relacionaram os elementos com cada fração húmica solúvel (Figura 15-A) e entre as três frações húmicas (Figura 15-B). A PCA (67,02% da variância total explicada) realizada para as frações SH e AH mostrou que existe uma relação à valores positivos da ACP (41.25%) entre as SH e os parâmetros associados com a

oxigenação/funcionalização (O, O/C e ω) e também com os parâmetros de relação C/N, E4/E6, C e δ . Por outro lado, os AH mostraram uma relação com os parâmetros relacionados com a saturação das ligações (H, H/C), ν e conteúdo de N.

A ACP (79,41% da variância total explicada) realizada para as três frações (Figura 15-B), mostrou que as frações solúveis SH e AH estão relacionados a valores positivos na PC1 (54,96%) com todos os elementos presentes (C, H, N, O), assim como também com os parâmetros de ω , ν e E4/E6. As Hu se agruparam de forma independente a valores negativos da PC1 mostrando uma relação com os parâmetros C/N, H/C e δ .

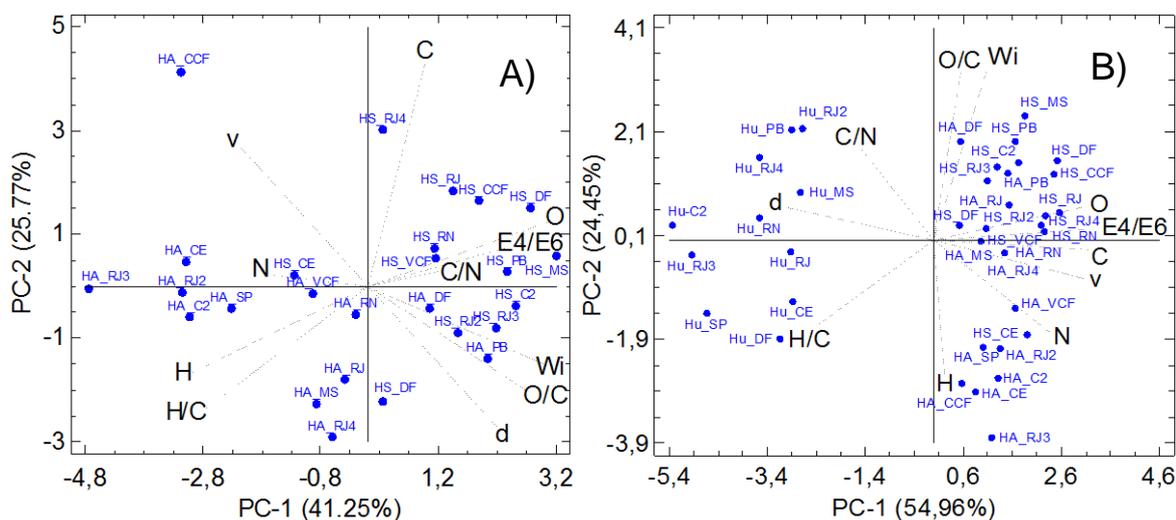


Figura 15. Análises de ACP para os dados obtidos a partir da composição elemental das SH dos solos orgânicos e materiais compostados.

O tipo de material vegetal que deu origem às frações húmicas não influenciou o tipo de estrutura. As SH de solos provenientes de carbono de plantas C_3 desenvolvem estrutura semelhante com as SH de materiais compostados provenientes de carbono de plantas C_4 , sendo o mesmo comportamento observado para a fração de AH.

A fração de AH obtida a partir de solos orgânicos e de materiais compostados é predominantemente aromática e alifática com baixa funcionalização química (substituição por O e N), enquanto que a fração (SH) está constituída predominantemente por estruturas funcionalizadas (Figura 15-B e Tabela 3). Estas características estruturais indicam que o húmus em sua forma íntegra é mais lábil que a fração de AH, e que a fração de AH apresenta compostos fundamentalmente recalcitrantes (Figura 11). A fração humina (Hu) não apresentou características estruturais próprias que as diferenciem dos AH. As análises de ACP-FTIR mostraram uma estreita relação desta fração com os AH indicando que suas propriedades de labilidade e recalcitrância resultaram menos evidentes. Estes resultados confirmam os estudos sobre a relação das Hu com os AH (Russell et al., 1983; Hayes et al., 2010).

Tanto as SH extraídas de solos quanto as de materiais compostados mostraram semelhanças em suas características estruturais. Isto indica que as SH, independente da fonte de origem, produzem estruturas húmicas semelhantes. Isto não foi observado para os AH. Eles, extraídos de materiais compostados, apresentam maior semelhança estrutural com as frações de SH do que com as extraídas dos solos. Estes resultados indicam que as maiores

variações estruturais acontecem quando se realiza o fracionamento químico a partir das SH íntegras. Em resumo, as diferenças estruturais entre o húmus (SH) e a fração de AH (frações solúveis) não se encontram na presença das suas estruturas (Figura 12) mas sim na sua conformação e/ou organização estrutural. Estes resultados reforçam os trabalhos de interpretação estrutural das frações húmicas como supramoleculas, descrita por Nebbioso & Piccolo (Nebbioso & Piccolo, 2011; Nebbioso & Piccolo, 2012). Na fração Hu resultou menos evidente sua interpretação clássica como uma fração independente. Ao contrário, as Hu apresentaram menor característica aromática e complexidade estrutural como enunciado em estudos (Hayes et al., 2010; Nebbioso et al., 2015). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a fração Hu é semelhante aos AH mas que estabeleceu ligações com a fração mineral nos solos o que justificaria sua baixa solubilidade (Nebbioso et al., 2015).

4.6 CONCLUSÕES

A fonte de material vegetal (C_3 ou C_4) não exerce uma clara influência nas características estruturais das frações húmicas, semelhantes entre si. Porém, as propriedades geradas a partir destas estruturas são diferentes.

Assim, pode-se concluir que suas diferenças relevantes estão em sua organização estrutural, o que pode ser entendido como supramolecularidade. A supramolecularidade das frações húmicas, que envolve a interação entre moléculas e reorganização espacial, constitui uma característica da estrutura das frações húmicas que é capaz de definir propriedades como recalcitrância e labilidade.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O padrão estrutural glicoprotéico responde ao tipo de ecossistema em que a Glo é produzida. Assim, ecossistemas menos perturbados podem possuir Glo com características estruturais mais estáveis (maior aromaticidade), ao mesmo tempo em que, ecossistemas sob manejo agrícola e perturbados apresentam Glo com características estruturais que contribuem para o equilíbrio no solo. Estes estudos são inéditos na literatura e resultam particularmente em grande importância ao demonstrar que perturbações ocorridas nos ecossistemas refletem no equilíbrio biológico-físico e químico dos solos. As particularidades estruturais das Glo atuam como indicadores ambientais de perturbações ou manejos dos solos.

A fonte de material vegetal (C_3 ou C_4) não exerce uma clara influência nas características estruturais das frações húmicas, semelhantes entre si. Porém, as propriedades geradas a partir destas estruturas são diferentes. Assim, pode-se concluir que suas diferenças relevantes estão em sua organização estrutural, o que pode ser entendido como supramolecularidade. A supramolecularidade das frações húmicas, que envolve a interação entre moléculas e reorganização espacial, constitui uma característica da estrutura das frações húmicas que é capaz definir propriedades como recalcitrância e labilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N.O., OLIVARES, F.L., NOVOTNY, E.H., DOBBSS, L.B., BALMORI, D.M., SANTOS-JÚNIOR, L.G., CHAGAS, J.G., FAÇANHA, A.R., CANELLAS, L.P. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant Soil* v.362, 161-174, 2012.
- AGHABABAEI, F., RAIESI, F., HOSSEINPUR, A. The combined effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on microbial biomass and enzyme activities in a calcareous soil spiked with cadmium. *Applied Soil Ecology* (75) 33-42, 2014.
- AGUILERA, P., BORIE, F., SEGUEL, A., CORNEJO, P. Fluorescence detection of aluminum in arbuscular mycorrhizal fungal structures and glomalin using confocal laser scanning microscopy. *Soil Biology & Biochemistry* (43) 2427-2431, 2011.
- ALVES, B. J. R., ZOTARELLI, L., JANTALIA, C. P., BODDEY, R. M., URQUIAGA, S., AQUINO, A., & ASSIS, R. Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e do nitrogênio no sistema solo-planta. *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, Embrapa-SCT, 343-350, 2005.
- ASLI, S., NEUMANN, P.M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant Soil*, v. 336, p.313-322, 2010.
- BAI, Y. Interaction between carbamazepine and humic substances: a fluorescence spectroscopy study. *Environ. Toxicol. Chem.* (27), 95-102, 2008.
- BAI, C., HE, X., TANG, H., SHAN, B., ZHAO, L. Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sandland, China. *Soil Biology & Biochemistry* (41), 941-947, 2009.
- BALMORI, D.M.; OLIVARES, FL.; SPACCINI, R.; AGUIAR, K.P.; ARAÚJO, M.F.; AGUIAR, N.O.; GURIDI, F.; CANELLAS, L.P. Molecular characteristics of vermicompost and their relationship to preservation of inoculated nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, DOI: p.2013.05.015, 2013.
- BEDINI, S., PELLEGRINO, E., AVIO, L., PELLEGRINI, S., BAZZOFFI, P., ARGESE, E., GIOVANNETTI, M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology & Biochemistry* (41), 1491-1496, 2009.
- BERBARA, R. L. & GARCÍA, A. C. In *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*, 1st edn Vol.1 (Eds Parvaiz, A., Rafiq, W. M.). Springer Verlag Science, Ch. 11, p. 297–319, 2014.

BRADFORD, M.M. A rapid a sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing of principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.

BRADY, N. C. & WEIL, R. R. *The Nature and Properties of Soils* 14th ed. Ch. 12 (Prentice Hall), 2008.

BOLLIGER, A., NALLA, A., MAGID, J., NEERGAARD, A., NALLA, A. D., BØGHANSEN, T. C. Re-examining the glomalin-purity of glomalin-related soil protein fractions through immunochemical, lectin-affinity and soil labelling experiments. *Soil Biology & Biochemistry* (40), 887-893, 2008.

CANELLAS, L. P., SANTOS, G. A., MORAES, A. A., RUMJANEK, V. M., & OLIVARES, F. L. Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. Métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN 13C-CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura. *Revista brasileira de ciência do solo*, 24(4), 741-750, 2000.

CANELLAS, L.P., DOBBSS, L.B., OLIVEIRA, A.L., CHAGAS, J.G., AGUIAR, N.O., RUMJANEKC, V.M., NOVOTNY, E.H., OLIVARES, F.L. SPACCINI, R., PICCOLO. A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*, (63), 315-324, 2012.

CHIN, Y. P., MILLER, P. L., ZENG, L., CAWLEY, K. & WEAVERS, L. K. Photosensitized degradation of bisphenol A by dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* (38), 5888-5894, 2004.

CORNEJO, P., MEIER, S., BORIE, G., RILLIG, M. C., BORIE, F. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science Of The Total Environment* (406), 154-160, (2008).

CROUE´, J. P., BENEDETTI, M. F., VIOLLEAU, D., LEENHEER, J. A. Characterization and copper binding of humic and non humic organic matter isolated from the south platte river: evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environ. Sci. Technol.* (37), 328-336, 2003.

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.

DANIELS-HETRICK, B. A.; BLOOM, J. The influence of host plant on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia*, New York, v. 78, n. 1, p. 32-36, 1986.

DAI, J., RAN, W., XING, B., GU, M. & WANG, L. Characterization of fulvic acid fractions obtained by sequential extractions with pH buffers, water, and ethanol from paddy soils. *Geoderma* (135), 284-295, 2006.

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.

DONG, Y., WAN, L., CAI, J., FANG, Q., CHI, Y., CHEN, G. Natural carbon-based dots from humic substances. Scientific Reports. DOI: 10.1038/srep10037.

DRIVER, J. D.; HOLBEN, W. E.; RILLIG, M. C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 37, n. 1, p. 101-106, 2005.

EBELING, A. G. Caracterização analítica da acidez em Organossolos. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo), Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia - Departamento de Solos. Seropédica RJ, 97f., 2006.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3º ed., Embrapa. Brasília, Brasil. 353pp, 2013.

FAN L., HARRIS J.L., RODDICK F.A., BOOKER N. A. Fouling performance during microfiltration of aquatic dissolved organic matter. Proceedings of Chemeca, Perth, WA. 2000.

FLAIG W, BEUTELSACHER H, RIETZ E. Chemical composition and physical properties of humic substances. In: Soil components: Gieseking JE, ed. Organic components, vol 1. New York: Springer-Verlag; 1-211, 1975.

FOKOM, R.; ADAMOU, S.; TEUGWA, M. C.; BEGOUDE BOYOGUENO, A. D.; NANA, W. L.; NEGONKEU, M. E. L.; TECHAMENI, N. S.; NWAGA, D.; TSALA NDZOMA, G.; AMVAM ZOLLO, P. H. Glomalin related soil protein, carbon nitrogen and soil aggregate stability as affected by land use variation in the humid forest zone south Cameroon. Soil & Tillage Research (120), 69-75, 2012.

GARCIA, A. C. Frações sólidas humificadas de vermicomposto: seus efeitos em plantas e capacidade para a retenção de metais pesados. 130 f.: il. Doutorado - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2013.

GAUTHIER, T. D., SHANE, E. C., GUERIN, W. F., SEITZ, W. R. & GRANT, C. L. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. Environ. Sci. Technol. (20), 1162-1166, 1986.

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.

GHABBOUR, E.A., DAVIES, G. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 OW, UK Registered Charity No. 207890, 2001.

GILLESPIE, A. W., FARRELL, R. E., WALLEY, F. L., ROSS, A. R. S., LEINWEBER, P., ECKHARDT, KAI-UWE, REGIER, T. Z., BLYTH, R. I. R. Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biology & Biochemistry* (43), 766-777, 2011.

GISPERT, M., EMRAN, M., PARDINI, G., DONI, S., CECCANTI, B. The impact of land management and abandonment on soil enzymatic activity, glomalin content and aggregate stability. *Geoderma* (202–203), 51-61, 2013.

GIVEN, P. H. In *Coal Science* (eds Gorbaty, M. L., J.W. Larsen and I. Wender) Orlando Academic press Vol. 3, 63-252, 1984.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C., CARRILLO-GONZÁLEZ, R., WRIGHT, S.F., NICHOLS, K.A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*. (130), 317-323, 2004.

HADDAD & D. SARKAR. Glomalin in Soil Organic Matter as a Function of Soil Properties. *Environmental Geosciences*, v. 10, no. 3, pp. 99-106, 2003.

HAYES, M. H. B., SWIFT, R. S., BYRNE, C. M., SONG, G., & SIMPSON, A. J. Humin: the simplest of the humic substances. In *Advances in natural organic matter and humic substances research. Proceeding the 15th meeting of the IHSS*, pp. 64-68. Puerto de la Cruz, Tenerife, 2010.

HAYES, M.H.B., CLAPP, C.E. Humic Substances: Considerations of Compositions, Aspects of Structure, and Environmental Influences. *Soil Science*, (166), 723-737, 2001.

HAYES, M.H.B., GRAHAM, C.L. Procedures for the isolation and fractionation of humic substances. In: GHABBOUR, E.A.; DAVIES, G. (Eds.) *Humic Substances Versatile Components of Plants, Soil and Water*, Royal Society of Chemistry, Cornwall, pp.91-110, 2000.

HARNER, M. J., RAMSEY, P. W., RILLIG, M. C. Protein accumulation and distribution in flood plain soils and river foam. *Ecology Letters*. (7), 829-836, 2004.

HATCHER, P.G., BREGER, I.A., MACIEL, G.E., SZEVERENYI, N.M. Geochemistry of humin. In: AIKEN, G.R.; McKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L., MAcCARTHY, P., (Eds.) *Humic substances in soil, sediments, and water*. New York, John Wiley & Sons. p. 275-302, 1985.

HE, X.; LI, Y.; ZHAO, L. Dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in the rhizosphere of *Artemisia ordosica* Krasch. in Mu Ussandland, China. *Soil Biology and Biochemistry* (42), 1313-1319, 2010.

HORWATH, W. R. in *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* 4th ed. (ed. Paul, E.) 339-382 (Academic Press), 2015.

ISLAM, K. M. S., SCHUHMACHER, A. & GROPP, J. M. Humic acid substances in animal agriculture. *Pak. J. Nutr.* 4, 126-134, 2005.

JANZEN, H. H. Beyond carbon sequestration: soil as conduit of solar energy. *Eur. J. Soil Sci.* (66), 19-32, 2015.

KHALILI, B., NILI, N., NOURBAKHS, F., SHARIFNABI, B., KHADEMI, H. Does cultivation influence the content and pattern of soil proteins? *Soil & Tillage Research* (111), 162-167, 2011.

KINGERY, W.L., SIMPSON, A.J., HAYES, M.H.B., LOCKE, M.A., HICKS, R. P. The application of multidimensional RMN to the study of soil humic substances. *Soil Science* 165 (6), 483-494, 2000.

KLEBER, M. Mineral-organic associations: formation, properties, and relevance in soil environments. *Adv. Agron.* (130), 1-140 2015.

KOHLER, J., CARAVACA, F., ROLDÁN, A. An AM fungus and a PGPR intensify the adverse effects of salinity on the stability of rhizosphere soil aggregates of *Lactuca sativa*. *Soil Biology & Biochemistry* (42), 429-434, 2010.

KOIDE, R. T., PEOPLES, M. S. Behavior of Bradford-reactive substances is consistent with predictions for glomalin. *Applied Soil Ecology* (63), 8-14, 2013.

KOIVULA, N. & HÄNNINEN, K. Biodeterioration of cardboard-based liquid containers collected for fibre reuse. *Chemosphere* (38), 1873-1887, 1999.

KONONOVA, M.M. *Soil organic matter*, Pergamon Press, Oxford, England. pp.49, (51) 295, 1961.

KULIKOVA, N.A., ABROSKIN, D.P., BEER, A.S., BADUN, G.A., CHERNYSHEVA, M.G., KOROBKOV, V.I., PERMINOVA, I.V. The Endodermis Is the Major Control Point for Radial Transport of Humic Substances into the Vascular System of Plants. *Em: Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment* p. 873-876, 2013.

LEHMANN, J., KLEBER, M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* Vol. 528, 3, 60-68, 2015.

LÓPEZ-MERINO, L., SERRANO, O., ADAME, M. F., MATEO, M. Á., CORTIZAS, A. M. Glomalin accumulated in seagrass sediments reveals past alterations in soil quality due to land-use change. *Global and Planetary Change* (133), 87-95, 2015.

LOUREIRO, D.C. Biomassa microbiana e constituintes lábeis da matéria orgânica do solo sob diferentes sistemas de manejo fitotécnico e cobertura vegetal. Seropédica, RJ, Tese (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 194 p., 2008.

LOVELOCK, C.E., WRIGHT, S.F., CLARK, D.A., RUESS, R.W. Soilstocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology* (92), 278-287, 2004.

LOZANO, E., JIMENÉZ-PINILLA, P., MATAIX-SOLERA, J., ARCENEGUI, V., MATAIX-BENEYTO, J. Sensitivity of glomalin-related soil protein to wildfires: Immediate and medium-term changes. *Sci Total Environ.* XX, XXX, 2015.

MACCARTHY, P. The principles of humic substances. *Soil Science.* 166 (11), 738-751, 2001.

MECOZZI, M., PIETRANTONIO, E., PIETROLETTI, M. The roles of carbohydrates, proteins and lipids in the process of aggregation of natural marine organic matter investigated by means of 2D correlation spectroscopy applied to infrared spectra. *Spectrochimica Acta Part A.* (71), 1877-1884, 2009.

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

MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, v. 37, p. 471-491, 1990.

NEBBIOSO, A., & PICCOLO, A. Basis of a humeomics science: chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules*, 12(4), 1187-1199, 2011.

NEBBIOSO, A., & PICCOLO, A. Advances in humeomics: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica chimica acta*, (720), 77-90, 2012.

NEBBIOSO, A., VINCI, G., DROSOS, M., SPACCINI, R., & PICCOLO, A. Unveiling the molecular composition of the unextractable soil organic fraction (humins) by humeomics. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4), 443-451, 2015.

NICHOLS, K. A. Characterization of glomalin – a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. Thesis (Ph.D.) – University of Maryland, College Park, MD; 2003.

NICHOLS, K. A., UPADHYAYA, A. Comparison of glomalin and humic acid in eight native u.s. soils. *Soil Science* (170), 985-997, 2005.

NISSENBAUM A., KAPLAN, I.R. Chemical and isotopic evidence for the in situ origin of marine humic substances *Limnol. Oceanogr.*, 17 (4), 570-582, 1972.

NOBRE, C.P., LAZARO, M.L., ESPÍRITO-SANTO, M.M., PEREIRA, M.G., BERBARA, R.L.L. Agregação, glomalina e carbono orgânico na Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. *Revista Caatinga (UFERSA. Impresso).* (38), 138-147, 2015.

NOVOTNY, E. H. Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de Solos Sob diferentes sistemas de preparo. Tese de Doutorado, (2002).

ORLOV, D. S. In Humus acids of soils, 1st edn, Vol. 1 (Ed. Orlov, D. S.) (A.A. Balkema, 300-378, 1985).

PINTON, R., CESCO, S., & VARANINI, Z. Role of humic substances in the rhizosphere. Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems, 341, 2009.

PREGER, A. C., RILLIG, M. C., JOHNS, A. R., PREEZ, C. C. D, LOBE, I., AMELUNG, W. Losses of glomalin-related soil protein under prolonged arable cropping: A chronosequence study in sandy soils of the South African Highveld. *Soil Biology & Biochemistry* (39), 445-453, 2007.

PRIMO, D. C., MENEZES, R. S., DA SILVA, C., T. O. *Scientia Plena* (7), 1-13, 2011.

PURIN, S., RILLIG, M.C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* (51), 123-130, 2007.

REYNA & WALL. Revision of two colorimetric methods to quantify glomalin-related compounds in soils subjected to different managements. *Biol Fertil Soils* (50), 395-400, 2014.

RILLIG, M.C., STEINBERG, P.D. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biology & Biochemistry* (34), 1371–1374, 2002.

RILLIG, M.C., Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil quality. *Canadian Journal of Soil Science* 84, 355–363, 2004.

RILLIG, M. C.; MAESTRE, F. T.; LAMIT, L. J. Microsite differences in fungal hyphal length, glomalin, and soil aggregate stability in semiarid Mediterranean steppes. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 35, n. 9, p. 1257-1260, 2003a.

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.

ROSIER, C. L., PIOTROWSKI, J. S., HOYE, A. T., RILLIG, M. C. Intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization. *Pedobiologia* (52), 41-50, 2008.

ROSIER, C.L., HOYE, A.T., RILLIG, M.C. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools (online). *Soil Biology and Biochemistry* (38), 2205-2211, 2006.

RUSSELL, J. D., VAUGHAN, D., JONES, D., & FRASER, A. R. An IR spectroscopic study of soil humin and its relationship to other soil humic substances and fungal pigments. *Geoderma*, 29(1), 1-12, 1983.

SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A O. (editores). *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Ed. Genesis, Porto Alegre, Brasil. 508p., 1999.

SANTOS, R. D., LEMOS, R. C., SANTOS, H. G., KER, J. C., ANJOS, L. H. C. *Manual de descrição e coleta de solo no campo*. 5a ed. (revisada e ampliada) Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa. 92p., 2005.

SANDERS, I.R.; FITTER, A.H. The ecology and functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species I. seasonal patterns of mycorrhizal occurrence and morphology. *New Phytologist* (120), 517-524. 1992.

SCHINDLER, F. V.; MERCER, E. J.; JAMES, A. R. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biology & Biochemistry* (39), 320-329, 2007.

SCHMIDT, M. W. I., TORN, M. S., ABIVEN, S., DITTMAR, T., GUGGENBERGER G., JANSSENS, I. A., KLEBER, M., KÖGEL-KNABNER, I., LEHMANN, J., MANNING, D. A. C., NANNIPIERI, P., RASSE, D. P., WEINER, S., TRUMBORE, S. E. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*. (478), 49-56, 2011 DOI:10.1038/nature10386.

SCHMEIDE, K. Uranium (VI) sorption onto phyllite and selected minerals in the presence of humic acid. *Radiochim. Acta* (88), 723-728, 2000.

SCHNITZER, M. In *Methods of soil analysis* 2nd edn, Vol. 2. (Eds Page, A. L. et al.) Ch. 30, 581-594 (Madison, Wisconsin USA, 1982).

SCHNITZER, M. Humic substances: chemistry and reactions. In: Schnitzer, M., Khan, S.U. (Eds.), *Soil Organic Matter*. Elsevier, Amsterdam. 1978.

SCHULTEN HR, SCHNITZER M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.* (162), 115-30, 1997.

SENESI, N., & LOFFREDO, E. Soil humic substances. *Biopolymers Online*, 2005.

SILVA, I.R., MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J. C.L. *Fertilidade do solo*. Viçosa: SBCS, 2007.

SOUZA, C. S.; Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, suplemento 1, p. 3033-3044, 2012.

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

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

SYLVIA, D. M.; JARSEFER, A. G. Sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 58, p. 229-232, 1992.

SWIFT, R. S. Method for extraction of IHSS soil fulvic and humic acids. SPARKS, DL; PAGE, AL; HELMKE, PA; LOEPPERT, RH, 1018-1020, 1996.

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

TIMOTHY, K. H. & THOMAS, G. B. Humic substances generally ineffective in improving vegetable crop nutrient uptake or productivity. *Hort Science* (45), 906-910, 2010.

TREVISAN, S., BOTTON, A., VACCARO, S., VEZZARO, A., QUAGGIOTTI, S., & MUSCOLO, S. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany* (74), 45-55, 2011.

VAUGHAN, D., ORD, B.G. Uptake and Incorporation of ¹⁴C-labelled Soil Organic Matter by Roots of *Pisum sativum* L. *Journal Experimental Botany* v.32, p.679-687, 1981.

VAUGHAM, D., LINEHAN, D.J. The growth of wheat plants in humic acid solutions under axenic conditions. *Plant Soil* v.44, p.445-9, 1976.

VODNIK, D., GRČMANA, H., MAČEK, I., ELTEREN, J.T. V., KOVAČEVIČ, M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science Of The Total Environment* (392), 130-136, (2008).

WAKSMAN, S.A., IYER, K.R.N. Contribution to our knowledge of the chemical nature and origin of humus: IV. Fixation of the proteins by lignins and formation of complexes resistant to microbial decomposition. *Soil. Sci.* (36), 69-82, 1932.

WERSHAW, R.L. Membrane-micelle model for humus in soils and sediments and its relation to humification / by Robert L. Wershaw. p. cm. (U.S. Geological Survey water-supply paper; 2410) Includes bibliographical references. Supt. of Docs, no.: I 19.13:W2410 1. Humification. 2. Micelles. 3. Membranes (Biology). 4. Plant polymers Biodegradation. (1994).

WESSELS, J. G. H. HYDROPHOBINS. Proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microbial Physiol.* (38), 1-45, 1997.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, v.198 p. 97-107, 1998.

WRIGHT, S.F.; FRANKE-SNYDER, M.; MORTON, J.B.; UPADHYAYA, A. Timecourse study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil*, v.181, p.193-203, 1996.

WRIGHT, S.F., UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* (161), 575-586, 1996.

WU Q.S., HE, X.H., ZOU, Y.N. Spatial distribution of glomalin-related soil protein and its relationships with root mycorrhization, soil aggregates, carbohydrates, activity of protease and β -glucosidase in the rhizosphere of *Citrus unshiu*. *Soil Biol Biochem* (45), 181-183, 2012.

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.

XU, J., WU, J., & HE, Y. (Eds.). *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment*. Springer Science & Business Media, 2013.

YAMASHITA, Y. & JAFFE', R. Characterizing the interactions between trace metals and dissolved organic matter using excitation-emission matrix and parallel factor analysis. *Environ. Sci. Technol.* (42), 7374-7379, 2008.

ZHANG, J., TANG, X., HE, X., LIU, J. Glomalin-related soil protein responses to elevated CO₂ and nitrogen addition in a subtropical forest: Potential consequences for soil carbon accumulation. *Soil Biology & Biochemistry*. (83), 142-149, 2015.

ZHANG, X., WU, X., ZHANG, S., XING, Y., WANG, R., LIANG, W. Organic amendment effects on aggregate-associated organic C, microbial biomass C and glomalin in agricultural soils. *Catena*. (123), 188-194, 2014.

ZIECHMANN, W. *Humic Substances*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1994.

ARS, Agricultural Research Service
<http://www.ba.ars.usda.gov/sasl/research/glomalin/precip.pdf>. Acesso em: 2015.

CSDB, Carbohydrate Structure Database <http://csdb.glycoscience.ru>. Acesso em: 2015.

IQFR, Instituto de Química Física Rocasolano <http://triton.iqfr.csic.es>. Acesso em: 2015.

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

IHSS, 2015. International Humic Substances Society. Isolation of IHSS Soil Fulvic and Humic Acids. <http://www.humicsubstances.org/soilhafa.html> Acesso em: 2015

IHSS, 2015. International Humic Substances Society (IHSS). What are Humic Substances? <http://www.humicsubstances.org/whatarehs.html>. Acesso em: 2015

SOIL TAXONOMY, 1999. USDA, Natural Resources Conservation Service http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_051232.pdf. Acesso em: 2015.

WRIGHT, S.F. 1998. Glomalin purification precipitation and dialysis. [Online]. Available at <http://www.ba.ars.usda.gov/sasl/research/glomalin/precip.pdf>. Acesso em: 2014

7. ANEXO

Tabela 1. Características dos solos presentes nos ecossistemas em estudo

	Ecossistema Agrícola	Ecossistema Perturbado	Ecossistema Natural		
	Argentina	Cuba	Brasil-CA	Brasil-BA	Brasil-CE
Propriedades dos solos (0,00-0,10 m)					
SOC (mg g ⁻¹)	15,7	20,3	20,0	47,2	20,8
POC (mg g ⁻¹)	4,6	2,2	6,4	16,1	9,7
P (Bray I) (mg g ⁻¹)	41,1	140,8	91	77	98
pH (H ₂ O)	5,8	7,9	5,1	4,45	5,1
Argila (g kg ⁻¹)	133	150	642	587	616
Silte (g kg ⁻¹)	450	73	96	36	19
Areia (g kg ⁻¹)	471	12	262	377	262
GFE (mg g ⁻¹)	1,5	1,1	0,02	0,03	0,01
GT (mg g ⁻¹)	6,2	3,7	0,05	0,06	0,05

Tabela 2. Características das Glomalinas presentes nos ecossistemas em estudo

Glo	10-20	38-50	54-60	70-73	90-100	113-130	173-177	178-181
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
	CH₃	CH₂	OCH₃	C₂OH	C- anomérico	C-Arom	-C=O	-COOH
	Aminoácidos			Carboidratos		Aminoácidos	Aminoácidos	Aminoácidos
G1	0,83	35,12	0,41	21,90	1,24	3,31	23,97	13,22
G2	0,78	34,11	0,78	21,32	1,16	3,49	25,58	12,79
G3	0,78	34,51	0,78	22,75	1,18	3,14	24,31	12,55
G4	2,19	20,44	0,36	17,88	0,73	1,09	34,31	22,99
G5	0,67	32,66	1,35	19,53	6,73	1,01	27,27	10,77

Tabela 3. Propriedades químicas do Organossolo utilizado neste estudo. Os valores médios de 3 réplicas.

Organossolo (*)	pH (water)	pH (KCl)	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺	H ⁺	H+Al	CEC	
RJ	4,84±0,05	4,32±0,12	0,50±0,12	1,13±0,03	0,27±0,014	0,36±0,01	0,90±0,012	14,28±1,21	15,18±0,324	17,50±1,25	
RJ2	3,95±0,32	3,50±0,17	1,00±0,15	1,53±0,12	0,21±0,011	0,67±0,02	3,80±0,034	28,21±1,54	32,01±0,854	35,40±1,52	
RJ3	5,04±0,11	4,40±0,36	6,60±0,24	3,90±0,21	0,34±0,012	0,97±0,02	0,87±0,058	16,29±1,32	17,16±0,924	29,00±2,13	
RJ4	5,50±0,54	4,30±0,45	2,50±0,31	4,70±0,15	0,12±0,051	0,26±0,03	0,10±0,01	20,20±1,62	20,30±0,963	27,90±3,01	
DF	5,90±0,18	4,70±0,85	8,60±1,02	10,2±0,72	0,27±0,034	2,02±0,01	0,00	12,21±1,27	12,20±0,945	33,30±3,11	
SP	5,20±0,44	3,20±0,71	0,60±0,02	1,50±0,01	0,45±0,028	0,61±0,04	0,40±0,018	57,85±1,98	58,20±0,932	61,40±2,14	
MS	7,50±0,27	4,50±0,84	42,70±2,01	4,30±0,13	0,39±0,034	0,24±0,01	0,00	1,60±0,12	1,60±0,002	49,20±1,65	
PB	6,00±0,09	5,60±0,09	53,80±1,45	4,40±0,19	0,13±0,039	1,55±0,05	0,00	4,60±0,14	4,60±0,023	64,50±1,84	
RN	7,60±0,71	7,10±0,75	47,20±1,98	15,30±0,97	0,24±0,022	1,41±0,02	0,00	0,20±0,01	0,20±0,001	64,40±2,51	
CE	6,10±0,62	5,70±0,43	24,00±1,11	25,10±1,02	0,70±0,047	9,46±0,95	0,20±0,017	6,20±0,12	6,40±0,001	65,60±3,22	
C2	5,20±0,50	4,60±0,55	10,80±1,06	2,90±0,21	0,04±0,001	0,48±0,03	0,10±0,02	6,20±0,25	6,30±0,234	20,60±3,41	
Organossolo (*)	S	V	P	OM	C	N	C/N	C-HA	C-FA	C-Hu	AH/AF
RJ	230±0,12	13,00±2,15	37,00±2,14	148,8±21,4	66,20±11,5	7,40±1,02	9,00±1,03	15,80±0,21	16,17±0,55	31,46±1,03	1,02±0,02
RJ2	3,40±0,24	10,00±1,24	3,00±0,35	745,8±10,4	368,0±10,3	16,30±1,1	23,00±1,21	88,10±0,35	10,80±0,84	253,82±9	11,61±1,02
RJ3	11,80±1,02	41,00±1,47	38,00±1,55	222,6±44,5	116,0±14,3	8,50±0,54	14,00±2,03	35,75±0,85	16,22±0,95	60,11±7,11	2,33±0,03
RJ4	7,60±0,13	27,00±1,18	23,00±1,24	186,0±31,5	168,3±10,6	5,20±0,98	18,00±1,55	30,50±0,42	15,60±0,92	20,90±3,21	1,95±0,056
DF	21,00±1,21	63,00±1,16	25,00±1,31	187,0±33,8	145,8±9,54	5,80±0,58	18,00±1,63	37,80±0,62	11,80±0,89	38,60±3,22	3,21±0,04
SP	3,20±0,34	5,00±1,14	4,00±0,15	391,0±27,9	231,4±21,3	9,40±0,32	22,00±1,31	112,80±0,34	23,70±0,99	53,70±2,45	4,76±0,24
MS	47,60±2,15	97,00±2,31	77,00±1,84	254,0±26,4	95,40±17,1	6,89±0,74	13,78±2,3	1,40±0,55	2,80±0,12	62,80±9,87	0,50±0,11
PB	59,90±2,35	93,00±2,47	17,00±1,47	211,0±20,1	85,41±10,9	7,86±0,24	10,05±2,14	10,58±0,84	4,43±0,11	74,70±4,56	2,39±0,36

RN	64,20±2,54	100,0±3,55	15,00±1,63	174,5±20,6	69,81±11,8	4,81±0,65	15,83±2,51	2,94±0,27	2,17±0,2	71,17±8,36	1,19±0,24
CE	59,20±3,65	90,00±3,64	8,00±1,42	504,0±19,5	257,6±23,6	17,1±0,88	14,39±2,22	36,00±0,51	14,82±2,01	212,82±10,1	2,43±0,17
C2	14,30±2,44	69,00±3,19	69,00±3,94	118,0±16,9	42,52±11,9	4,13±0,11	12,01±2,33	11,89±0,56	5,24±1,03	38,75±6,66	2,27±0,61

pH H₂O (1:2,5)
pH KCl (1:2,5)
Ca²⁺: (cmolc.kg⁻¹)
Mg²⁺: (cmolc.kg⁻¹)
K⁺: (cmolc.kg⁻¹)
Na⁺: (cmolc.kg⁻¹)
Al³⁺: (cmolc.kg⁻¹)

H⁺: (cmolc.kg⁻¹)
H+Al: (cmolc.kg⁻¹)
CEC: (cmolc.kg⁻¹)
S: (cmolc.kg⁻¹)
V: (%)
P: (mg.kg⁻¹) (Fósforo avaliado)
MO: (g.kg⁻¹) (Matéria orgânica)

TOC: (g.kg⁻¹) (Carbono orgânico total)
N: (g.kg⁻¹)
C-AH: (g.kg⁻¹) (carbono de ácido húmico)
C-AF: (g.kg⁻¹) (carbono de ácido fúlvico)
C-Hu (g.kg⁻¹) (carbono de humina)
(*): Como carbono orgânico é predominante nesses solos, estudos de tamanho de partículas não são comumente realizados

Tabela 4. Propriedades do vermicomposto e do material compostado. Os valores médios de 4 réplicas.

	Vermicomposto	Material Compostado
pH	6,46±0,14	6,8±0,14
C.E (μS .cm ⁻¹)	254,00±10,58	196,00±8,12
N (g.kg ⁻¹)	5,70±1,03	4,80±0,98
Ca ²⁺ (g.kg ⁻¹)	2,02±0,21	11,40±1,02
Mg ²⁺ (g.kg ⁻¹)	4,45±0,69	8,30±0,89
P (g.kg ⁻¹)	1,51±0,01	5,12±1,03
K ⁺ (g.kg ⁻¹)	5,00±1,03	14,00±1,84
COT (g.kg ⁻¹)	62,44±2,87	57,47±7,22
C:N	10,95±0,87	11,97±1,54
AH (g.kg ⁻¹)	15,71±0,64	12,10±1,62
AF (g.kg ⁻¹)	9,90±0,77	11,42±1,11
AH/AF	1,58±0,03	1,05±0,02