

**CRISTIANE PEREIRA DE ASSIS**

**MATÉRIA ORGÂNICA DE LATOSSOLOS HÚMICOS: ANÁLISES  
TÉRMICA E ESPECTROSCÓPICA, EFEITO DO USO E CORREÇÃO  
QUÍMICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

**CRISTIANE PEREIRA DE ASSIS**

**MATÉRIA ORGÂNICA DE LATOSSOLOS HÚMICOS: ANÁLISES  
TÉRMICA E ESPECTROSCÓPICA, EFEITO DO USO E CORREÇÃO  
QUÍMICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

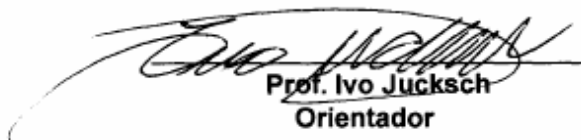
APROVADA: 27 de março de 2008

  
Prof. Carlos Alberto Silva

  
Prof. Luis Henrique Mendes da Silva

  
Prof. Eduardo de Sá Mendonça  
Co-Orientador

  
Prof. Júlio César Lima Neves  
Co-Orientador

  
Prof. Ivo Jucksch  
Orientador

*Ao Pai Superior e,  
àqueles que amo desde criança –Vandor e Luzenir – razões de meu viver  
DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

À Mãe Natureza que nos fornece o solo, grande sustentáculo da vida.

Ao povo brasileiro que pela força do trabalho gera todo esse movimento acadêmico.

À Universidade Federal de Viçosa, em seu Departamento de Solos, que por meio do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas propiciou a oportunidade de realização desta tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo auxílio Financeiro

Ao prof. Ivo Jucksch, amigo e orientador, deixo palavras de agradecimentos, não só por essa, mas pela já antiga caminhada, onde seus conselhos, sua orientação sempre foram e serão de grande valor.

Ao prof. Júlio César Lima Neves, expresse meus sinceros agradecimentos pelos conselhos como co-orientador e amigo, principalmente porque temos traçado um caminho de respeito e amizade.

Ao prof. Eduardo de Sá Mendonça pelos tantos conselhos acadêmicos, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho. Pelos incentivos de que, tudo que possa acontecer, é *vida*.

Ao prof. João Luiz Lani que desde o princípio incentivou a realização deste trabalho, fornecendo importantes idéias para o enriquecimento do mesmo. Agradeço também sua valiosa participação no exame de qualificação.

Ao prof. João Carlos Ker por disponibilizar as amostras provenientes da área de Cerrado, colaborando assim com a realização deste trabalho. A ele, também sou grata, pelos ensinamentos e pela amizade. Extendo meus agradecimentos à sua valiosa participação no exame de qualificação.

A todos os professores do DPS que contribuíram na minha formação acadêmica: meus sinceros agradecimentos.

Ao prof. Luis Henrique Mendes Silva do Departamento de Química da UFMG pela enriquecedora participação na banca examinadora desta tese e por toda atenção dispensada.

Ao prof. Carlos Alberto Silva do Departamento de Solos da Universidade Federal de Lavras pela disponibilidade em participar da banca examinadora desta tese, contribuindo com valorosas sugestões.

Ao CSIC/IRNAS de Sevilha, pela acolhida durante meu estágio de doutorado na Espanha. Principalmente aos pesquisadores Gonzalez-Vila, Gonzalez-Perez pela atenção dispensada durante toda minha estadia em terras Andaluzas. Especialmente ao prof. Gonzalez-Vila expressei palavras de agradecimento, por acreditar neste trabalho, dando suporte técnico-científico, entre equipes conveniadas na Alemanha e França, no sentido de enriquecer ainda mais nossos resultados. Também agradeço à Trinita Verdejo pelo excelente apoio técnico e pelos gratificantes momentos vividos. Agradeço também ao pesquisador Gonzalo Almendros e, toda sua equipe, pela atenção dispensada aos trabalhos que realizei junto ao CSIC/CCMA em Madri. *¡Muchas gracias por todo!*

Também expressei palavras de agradecimentos a todo corpo técnico-administrativo do DPS na UFV, pelo apoio em toda jornada laboral e em todos os momentos de descontração propiciados.

Aos agricultores de Sericita-MG pela acolhida em suas terras, permitindo a coleta de material de solo. Também agradeço à colega Julenice Rocha pela colaboração com as amostras provenientes de Mutum-MG.

Aos colegas que fizeram parte de toda minha trajetória pelo DPS, sou grata pelas contribuições de cunho profissional e pessoal.

Ao estudante Anderson Almeida Pacheco meus agradecimentos em virtude de sua dedicação, apoio e interesse pela conclusão deste trabalho.

A todos os meus familiares, em especial aos meus irmãos Vaniscley e Keila, expressei meus agradecimentos por acreditarem em meu trabalho e por me amarem de forma incondicional.

A todos meus irmãos de fé e de caminhada do Núcleo Recanto das Flores, pelos tantos espinhos retirados do caminho e, pelas belas flores plantadas em minha vida. Também extendo estes agradecimentos à irmandade do Pré-Núcleo Inmaculada Concepción: meus eternos agradecimentos.

Enfim, a todas as pessoas que com suas lições diárias contribuíram pela minha formação pessoal e profissional:

***AGRADEÇO!!***

## **BIOGRAFIA**

CRISTIANE PEREIRA DE ASSIS, filha de Vandor Francisco de Assis e Luzenir Pereira de Assis, nascida na primavera de 1979, em 30 de setembro, na cidade de Alto Araguaia, Estado do Mato Grosso. cursou o 1º e 2º graus em Alto Garças, Estado do Mato Grosso. Em 1997, ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa, Estado de Minas Gerais, graduando-se em maio de 2002. Em fevereiro de 2004, obteve o título de *Magister Scientiae* em Solos e Nutrição de Plantas pela mesma instituição. Em abril de 2004 ingressou no curso de Doutorado no mesmo programa de pós-graduação, vindo a defender o título de *Doctor Scientiae* nesta ocasião.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>I - Caracterização de Ácidos Húmicos e Fúlvicos em Horizontes A Húmicos de Latossolos de Minas Gerais.....</b>	<b>3</b>
RESUMO .....	3
SUMMARY: Characterization of humic and fulvic acids isolated from humic A horizon of Latosol (Oxisols) from Minas Gerais, Brazil.....	4
1 - INTRODUÇÃO.....	5
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3 – RESULTADOS.....	9
4 – DISCUSSÃO.....	16
4 – CONCLUSÕES.....	19
5 - AGRADECIMENTOS .....	19
6 - REFERÊNCIAS CITADAS .....	19
<b>II - Dessorção e pirólise de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob café e pastagem na Zona da Mata Mineira.....</b>	<b>24</b>
RESUMO .....	24
SUMMARY: Double-shot pyrolysis of the humic and fulvic acids isolated from a Subtropical Humic Latosol cultivated with coffee and pasture in the Atlantic Forest Zone, Minas Gerais - Brazil.....	25
1 - INTRODUÇÃO.....	26
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4 – CONCLUSÕES.....	42
5 - AGRADECIMENTOS .....	42
6 - REFERÊNCIAS CITADAS .....	42
<b>III- Content and molecular composition of total lipids extracts under pasture and coffee land use in a subtropical humic Latosol.....</b>	<b>46</b>
ABSTRACT .....	46
RESUMO: Teor e composição molecular de lipídios totais extraídos de um Latossolo húmico cultivado com café e pastagem .....	47
1. INTRODUCTION.....	48
2. MATERIALS AND METHODS .....	49
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	52
4. CONCLUSIONS.....	58
5. ACKNOWLEDGEMENTS .....	58
6. REFERENCES.....	59
<b>IV - Influência da Correção da Acidez, Adubação Fosfatada e Adição de Sacarose na Matéria Orgânica de um Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico.....</b>	<b>62</b>
RESUMO .....	62
SUMMARY: Influence of liming, phosphate fertization and sucrose addition in organic matter of Humic Latosol (Oxisol) .....	63
1 – INTRODUÇÃO .....	64
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	65
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4 - CONCLUSÕES .....	73
5 – AGRADECIMENTOS .....	73
6 - REFERÊNCIAS CITADAS .....	73
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## RESUMO

ASSIS, Cristiane Pereira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2008. **Matéria orgânica de Latossolos Húmicos: análises térmica e espectroscópica, efeito do uso e correção química.** Orientador: Ivo Jucksch. Co-orientadores: Eduardo de Sá Mendonça e Julio César Lima Neves.

Este estudo teve por objetivo principal contribuir na elucidação de vários aspectos relacionados com o comportamento da matéria orgânica (MO) em solos altamente intemperizados. Foram coletadas seis amostras de Latossolos com horizonte A húmicos em três regiões de Minas Gerais: i) Sericita, (sob café, pastagem, samambaias e fragmento de Mata Atlântica); ii) Mutum (sob fragmento de Mata Atlântica); e iii) Araçuaí (sob Cerrado). Amostras compostas foram obtidas para as camadas entre 0-10 e 60-100 cm de profundidade no horizonte A. Para a região de Sericita também foram coletadas amostras da serapilheira produzida sob café, pastagem e fragmento de Mata Atlântica para a análise comparativa da composição lipídica. Os lipídios (do solo e da serapilheira) foram extraídos com diclometano/metanol (3:1, v/v) utilizando sistema Soxhlet e analisados por cromatografia a gás e espectrometria de massa. As amostras de solo, coletadas em todas as regiões foram submetidas ao procedimento de extração e purificação dos ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF), os quais foram caracterizados por análise elementar; espectroscopia no UV-visível e no infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$ -RMN) e termodegradação por dessorção (280 °C) e pirólise (610 °C). Em Sericita na camada de 0-10 cm, o solo sob mata natural apresentou maior teor de lipídios que o solo cultivado. Houve preservação seletiva no horizonte húmico de biopolímeros alifáticos originados da serapilheira, com acúmulo entre 60-100 cm. Detectou-se também maior preservação de compostos alcanos de cadeia curta em solo sob vegetação natural. A composição lipídica sobre diferentes agroecossistemas permitiu avaliar mudanças relacionadas com o uso da terra. As técnicas aplicadas no estudo dos AH e AF foram eficientes para elucidar as diferenças estruturais entre essas frações, assim como suas modificações no perfil do solo. Por meio do UV-visível foi possível evidenciar a contribuição de pigmentos melânicos de origem fúngica como explicação do escurecimento observado em subsuperfície do horizonte A húmico. Os espectros no FTIR revelaram que os AH extraídos da região de Cerrado apresentaram menor processo de descarboxilação, desidratação, condensação e aromatização que aqueles extraídos em regiões de Mata Atlântica. A caracterização dos AH através do  $^{13}\text{C}$ -RMN indicou uma rota de humificação no sentido da diminuição de grupamentos alquílicos e aumentos na região de sinal do C-aromático. Os resultados da termodegradação mostraram que AH e AF extraídos na superfície



são estruturalmente mais ricos que aqueles de subsuperfície e, que sob vegetação natural há maior proporção de compostos nitrogenados na estrutura húmica da MO. Os resultados também indicaram que o aumento no sinal do C-aromático foi devido à presença de benzenos e tolueno. Detectou-se maior proporção de estruturas ricas em polissacarídeos nos AF extraídos entre 60-100 cm de profundidade, revelando importantes movimentações desses ácidos no perfil. Nos primeiros 10 cm, o uso agrícola do solo promoveu reduções nos compostos alifáticos e nitrogenados na estrutura dos AH e, de compostos fenólicos, de lignina, ácidos graxos e nitrogenados na estrutura dos AF. A termodegradação por dessorção e pirólise revelou que o aumento do grau de aromaticidade (~20%) verificado por  $^{13}\text{C}$ -RMN para os AH extraídos entre 60-100 cm, correspondeu principalmente à incorporação estrutural de compostos nitrogenados heterocíclicos. Os processos que conduziram à estabilização estrutural envolveram acúmulos de compostos nitrogenados, aromáticos e alifáticos em AH e de compostos aromáticos e fenólicos em AF. As características carboxílicas e fenólicas dos AF os tornam componentes chaves nos processos de complexação e translocação de Fe e Al nesses horizontes tropicais húmicos. Em razão da intensa utilização dos Latossolos Húmicos com cultivos de café e pastagem na região de Sericita, avaliou-se, paralelamente, o impacto de práticas agrícolas como calagem, adubação fosfatada e adição de fonte de carbono (sacarose) lábil na decomposição da MO. Para tanto, foi montado um experimento em delineamento inteiramente casualizado num esquema fatorial 5x2x2, sendo cinco níveis de calagem (0; 0,5; 1; 2 e 3 vezes a quantidade necessária para elevar a saturação de bases do solo a 60%), dois níveis de adubação fosfatada (com e sem) e dois níveis de fonte de C lábil na forma de sacarose (com e sem). Curvas de respiração foram estabelecidas a partir das quantidades acumuladas de C-CO<sub>2</sub> liberado durante 136 dias e ajustadas ao modelo de cinética de primeira ordem. Após o período de incubação foram avaliados o C total do solo e das frações humificadas (humina, húmico e fúlvico). A produção total de C-CO<sub>2</sub> acumulado no tempo foi afetada positivamente pela presença de sacarose. A fração fúlvica do solo tendeu a aumentar com a adição de sacarose e reduzir com a presença de fosfato. Observou-se também, com a calagem, redução do C da fração ácido húmico, e incremento no C da fração humina. Os resultados indicam que práticas agrícolas como calagem, adubações fosfatadas e adições de resíduos na forma de C-lábil alteram a dinâmica do C da matéria orgânica de Latossolos com horizontes A húmicos.

## ABSTRACT

ASSIS, Cristiane Pereira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2008. **Organic matter of humic Latosol (Oxisol): thermal and spectroscopic analyses, land use and chemical correction.** Adviser: Ivo Jucksch. Co-advisers: Eduardo de Sá Mendonça and Julio César Lima Neves.

The objective of this study was to contribute to the clarification of several aspects related to the behavior of organic matter (OM) in highly weathered tropical soils. Six samples of humic A horizon Latosol were collected from three sites in Minas Gerais: i) Sericita, (under coffee crop, pasture, ferns and Atlantic Forest fragment); ii) Mutum (under Atlantic Forest fragment); and iii) Araçuaí (under Savanna). Composed samples were obtained for the 0-10 and 60-100 cm deep layers in the A horizon. At the Sericita site, samples of litter under coffee crop, pasture and Atlantic Forest fragment were collected for comparative analyses of lipid composition. Lipids (from litter and soil) were Soxhlet-extracted with dichloromethane/methanol (3:1 v/v) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Soil samples collected from all the sites were processed for extraction and purification of humic (HA) and fulvic (FA) acids, which were characterized by elemental analysis; UV-visible and infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance ( $^{13}\text{C}$ -NMR) and thermal desorption (280 °C) and true pyrolysis (610 °C). In Sericita, the soil under the forest, in the 0-10 cm layer, showed higher lipid content than the soil under cultivation. There was selective preservation of aliphatic biopolymers from the litter, accumulating in the 60-100 cm layer. It was also detected a greater preservation of short chain alkanes in soils under forest. The lipid composition under different agroecosystems allowed the evaluation of changes related to land use. The techniques used for analyzing HA and FA were efficient to elucidate the structural differences between these fractions, as well as the changes in the soil profile. The UV-visible spectroscopy showed the contribution of fungal melanin pigments as the most probable cause for the darker color of the humic subsurface A horizon. FTIR spectra revealed that HA extracted from the Savanna site showed less decarboxylation, dehydration, condensation and aromatization than the ones from Atlantic Forest sites. HA characterization through  $^{13}\text{C}$  - RMN indicated a humification pathway tending to decrease alkyl groups and increase the C-aromatic signal region. Thermodegradation showed that HA and FA extracted from topsoil were structurally more diverse than those from the subsurface and under natural vegetation there was more N-compounds in the humic structure. The results also indicated that the increase in the C-aromatic signal was caused by benzenes and toluenes. Higher proportion of polysaccharides was detected in FA from the 60-100 cm layer, revealing

important movements of these acids in the soil profile. In the topsoil, the agricultural use of the soil caused reduction in aliphatics and N-compounds at the HA structure, and phenolic, lignin, fatty acids and N-compounds at the FA structure. Thermodegradation by desorption and pyrolysis showed that the increase in aromatic level (~20%) verified by <sup>13</sup>C-NMR for HA extracted between 60-100 cm corresponded mainly to the structural incorporation of heterocyclic N-compounds. The structural stabilization involved accumulation of N-compounds, aromatic and aliphatic compounds in HA, and aromatic and phenolic compounds in FA. The carboxylic and phenolic attributes of FA are key components in complexation and translocation of Fe and Al in tropical humic horizons. Because the intense use of humic Latosols with coffee crop and pasture in Sericita, the impact of agricultural practices such as liming, fertilization and incorporation of labile carbon sources (C) on OM decomposition was evaluated in parallel. The experiment arranged in a complete randomized design, in a 5x2x2 factorial scheme, with five liming levels (0; 0.5; 1; 2 and 3 times the amount needed to increase base saturation to 60%), two levels of phosphate (with and without) and two levels of labile C source as sucrose (with and without). Respiration curves were established from the accumulated CO<sub>2</sub> liberated during 136 days and then fitted to the first order kinetic model. Following the incubation period, C total in the soil and humic fractions (fulvic, humic and humin) were evaluated. The total C-CO<sub>2</sub> production accumulated over time was positively affected by the sucrose. The fulvic acid fraction in the soil tended to increase with sucrose addition, but reduced in presence of phosphate. Liming caused reduction in C of the humic acid fraction but increased C of the humin fraction. Results indicated that agricultural practices such as liming, phosphate fertilizations and addition of residues in the form of labile C changed the C dynamics in organic matter of humic Latosols.

## INTRODUÇÃO GERAL

A matéria orgânica do solo (MOS) tem papel fundamental no controle biogeoquímico do C no ecossistema global. Nos solos tropicais, onde a taxa de mineralização da MOS é maior, o conhecimento estrutural dos componentes da MOS que regem o ciclo do C é essencial.

Latossolos húmicos são caracterizados por apresentarem grande quantidade de matéria orgânica em seu horizonte A, tendo a mesma como caráter diagnóstico na classificação destes solos. Contudo, até onde sabemos, essa matéria orgânica raramente tem sido “estruturalmente caracterizada”. Dada a importância da matéria orgânica no manejo e classificação destes Latossolos, o conhecimento estrutural da mesma é fundamental no entendimento dos processos de formação, assim como a própria evolução da fração orgânica nos espessos horizontes A desta unidade de solo. As mudanças estruturais induzidas por fatores antrópicos, como por exemplo, pela ocupação agrícola destes solos, necessitam ser mais investigadas. Com o objetivo de caracterizar a matéria orgânica presente em horizontes A húmico de Latossolos e avaliar o impacto do uso do solo na constituição da mesma foram elaborados quatro capítulos para esta tese.

O componente húmico do solo solúvel em álcali (ácidos húmicos e fúlvicos), os quais nesta tese foram extraídos com NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>, pode ser caracterizado através de várias ferramentas analíticas: análise elementar do teor de C, N, H e O; técnicas espectroscópicas (infravermelho, uv-visível, ressonância magnética nuclear,...); e técnicas termodegradativas (termogravimetria, dessorção térmica e pirólise). No geral, a maioria dos trabalhos utiliza combinações entre diferentes técnicas, complementando os resultados obtidos de forma a elucidar a rede macromolecular complexa das substâncias húmicas. Para o Capítulo I desta tese, intitulado “**Caracterização de ácidos húmicos e fúlvicos em horizontes A húmicos de Latossolos de Minas Gerais**”, foram extraídos e purificados ácidos húmicos e fúlvicos de Latossolos Húmicos de diferentes regiões de Minas Gerais. Na purificação dos ácidos fúlvicos, a fração não retida em XAD-8 também foi analisada. Com o objetivo de caracterizar e avaliar a participação dessas frações no processo de humificação utilizou-se de técnicas analíticas como a análise elementar (CNHO), espectroscopia no uv-visível e no infravermelho e ressonância magnética nuclear do <sup>13</sup>C.

Dando continuidade no estudo da caracterização da matéria orgânica, no sentido de seu desvencilhamento estrutural, elaborou-se o II capítulo desta tese, intitulado “**Dessorção e pirólise de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo**”.

**húmico sob café e pastagem na Zona da Mata Mineira**". Os fragmentos gerados durante a dessorção (280 °C) e pirólise (610 °C) dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos, foram separados por cromatografia gasosa e identificados por espectrometria de massa. A obtenção da "impressão digital" da estrutura desses ácidos foi utilizada para avaliar a composição e origem dessas frações, sua evolução no perfil, assim como as transformações promovidas pelas mudanças no uso da terra.

A MOS pode ser dividida em componentes húmicos e não-húmicos. Dentro deste último existe a fração extraível com solventes orgânicos, conhecida como fração lipídica do solo. A composição lipídica de solos tropicais tem sido raramente documentada. O estudo dessa fração permite avaliar a contribuição da biomassa vegetal (serapilheira e raízes) e do solo (microrganismos), sendo que modificações na mesma podem ser percebidas em diferentes situações de uso e manejo do solo. Diante do exposto, o Capítulo III intitulado **"Status of total lipids extracts in a subtropical Humic Latosol under grassland and coffee land use"** objetivou avaliar as diferenças na composição lipídica entre a superfície e subsuperfície de um horizonte A húmico, assim como as alterações em função do uso com café e pastagem.

O cultivo do solo geralmente aumenta o fluxo de CO<sub>2</sub> para a atmosfera, principalmente em solos tropicais onde as taxas de ciclagem da MOS são mais elevadas. O uso intensivo dos Latossolos húmicos com cafezais e pastagem na Zona da Mata Mineira, e a importância destes solos no estoque de C regional justificou a realização do trabalho descrito no Capítulo IV, o qual tratou da **"Influência da Correção da Acidez, Adubação Fosfatada e Adição de Sacarose na Matéria Orgânica de um Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico"**. Devido à baixa atividade microbiana destes solos, o estímulo da mesma acarreta importantes mudanças na dinâmica da MOS. Por outro lado, a influência das práticas agrícolas sobre a fração humificada do solo é de extrema importância, uma vez que as mesmas respondem por mais de 80% do C no horizonte A destes Latossolos. Para tanto foi conduzido ensaio de respirometria em fatorial completo com cinco níveis de calagem, dois níveis de adubação fosfatada e dois níveis de sacarose. Avaliou-se a evolução de C-CO<sub>2</sub> durante 136 dias, com subsequente análise da atividade microbiana (respiração), C do solo e das frações humificadas (fúlvico, húmico e humina).

# I - Caracterização de Ácidos Húmicos e Fúlvicos em Horizontes A Húmicos de Latossolos de Minas Gerais.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar as mudanças estruturais de substâncias húmicas envolvidas no processo de humificação em Latossolos com horizonte A húmico. Para tanto, ácidos húmicos e fúlvicos (fração não adsorvida e adsorvida em resina XAD-8) foram isolados de seis Latossolos Húmicos de Minas Gerais sob diferentes coberturas vegetais. Foram coletadas amostras superficiais (0-10 cm) e subsuperficiais (60-100 cm) dentro do horizonte A húmico. As amostras purificadas foram caracterizadas através da análise elementar, espectroscopia no visível, espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR) e dos estudos do  $^{13}\text{C}$ - NMR em polarização cruzada (CP) e *spinning* do ângulo mágico (MAS). Estruturalmente, a fração fúlvica não adsorvida em resina XAD-8 (AF-1) diferenciou-se dos ácidos fúlvicos retidos nesta resina (AF-2), apresentando maiores teores de H e O e, maior razão  $E_4/E_6$ . Ácidos húmicos (AH) possivelmente apresentam diferentes graus de pigmentações no perfil, sendo que na camada de solo entre 60-100 cm, os pigmentos melânicos podem ser de origem fúngica. Espectros de FTIR revelaram que AF-1 está composta principalmente por polissacarídeos e compostos de lignina. Os AH extraídos da região de cerrado apresentaram menor processo de descarboxilação, desidratação, condensação e aromatização que aqueles extraídos em regiões de mata atlântica. Diferenças estruturais em função da textura do solo foram observadas nos espectros de FTIR e  $^{13}\text{C}$  NMR. Os AH apresentaram rota de humificação no sentido da diminuição de grupamentos alquílicos e aumentos em aromáticos. As técnicas de caracterização utilizadas permitiram detectar importantes alterações estruturais no compartimento humificado no perfil de Latossolos Húmicos.

**Palavras Chaves:** Substâncias húmicas, solos tropicais, FTIR,  $^{13}\text{C}$ , humificação

## **SUMMARY: Characterization of humic and fulvic acids isolated from humic A horizon of Latosol (Oxisols) from Minas Gerais, Brazil**

The objective of this work was to study structural changes in humic substances involved in humification of humic A horizon Latosols. Humic and fulvic acids (adsorbed and non-adsorbed fraction in XAD-8 resin) were isolated from six humic Latosols from Minas Gerais under different vegetation covers. Topsoil samples (0-10 cm) and subsurface soil (60-100 cm) were collected from the humic A horizon. The purified samples were characterized through elemental analysis, UV-visible spectroscopy, Fourier transform infrared (FTIR) and studies of  $^{13}\text{C}$  nuclear resonance in cross polarization and magic angle spinning ( $^{13}\text{C}$  – NMR). Structurally, the fulvic fraction, non-adsorbed in XAD-8 (FAs-1) was different from the fulvic acids adsorbed in the same resin (FAs-2), presenting higher contents of H and O, and larger  $E_4/E_6$  ratio. Humic acids (HAs) possibly present different levels of pigmentation in the profile, and at 60-100 cm melanin pigments can have fungal origin. FTIR spectra showed that FAs-1 consisted mainly of polysaccharides and lignin compounds. HAs extracted from the Savanna presented less decarboxylation, dehydration, condensation and aromatization, than those extracted from the Atlantic Forest site. Structural differences as a function of soil texture were found in FTIR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. HAs showed a humification pathway toward the decrease of alkylic groups and increase of aromatic groups. The characterization techniques used in this study allowed the detection of important structural changes in the humified compartment in the profile of humic Latosols.

**Key words:** Humic substances , tropical soils, FTIR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, humification

## 1 - INTRODUÇÃO

Em solos tropicais, há necessidade de se conhecer melhor as mudanças estruturais da matéria orgânica do solo (MOS) decorrentes dos processos de humificação. Latossolos Húmicos são solos altamente intemperizados que apresentam horizonte A espesso (de até 200 cm), ricos em matéria orgânica, sendo encontrados principalmente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (Ker, 1999). A ocorrência desses solos está quase sempre relacionada a ambientes distróficos, álicos, áreas de relevo movimentado e de altitude. O horizonte A desses solos estoca em média  $30,26 \text{ kg m}^{-2}$  de C (Andrade et al. 2004), sendo que, se forem consideradas as variações na profundidade desse horizonte entre 60-200 cm, os mesmos podem ser considerados importantes reservas de C nos trópicos. A hipótese de serem solos remanescentes de superfícies estáveis e antigas, submetidos a vários ciclos de intemperismo, de pedogênese, de ação da fauna do solo e de cobertura vegetal, é suportada por Silva & Vidal-Torrado (1999). Esses mesmos autores concluíram que o espessamento desses horizontes húmicos resulta da adição, transformação e a translocação de materiais orgânicos no perfil do solo pela ação da fauna. Assim, por se tratarem de solos profundos, intemperizados e ricos em C, são relictos chaves para o conhecimento das rotas de humificação em ecossistemas tropicais.

A natureza do húmus e a distribuição das frações humificadas variam com o clima, cobertura vegetal, acidez, presença ou ausência de bases, drenagem e textura do solo (Zech et al., 1997; Volkoff et al., 1984), fatores esses que influenciarão um conjunto de reações de descarboxilação, desidratação, oxidação e hidrólise em diferentes fases do processo de humificação. Essas fases podem ser estudadas através das observações das modificações estruturais do húmus ao longo do perfil no solo, principalmente com relação às distintas distribuições das espécies de carbono (C) (Zech et al., 1997). O entendimento desses processos em Latossolo Húmicos poderia contribuir para elucidar vários aspectos relacionados com a humificação da MOS nos trópicos.

O avanço das análises instrumentais, principalmente os métodos espectroscópicos, tem possibilitado caracterizações mais definidas da estrutura da MOS. A técnica  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR (ressonância magnética nuclear do  $^{13}\text{C}$  com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico) tem sido amplamente usada nos estudos das substâncias húmicas, permitindo avanços consideráveis na compreensão da composição estrutural de ácidos húmicos e fúlvicos (González-Vila et al., 1976; Preston, 1996; Knicker et al., 2006). Em complementação aos



dados por  $^{13}\text{C}$  NMR, as análises de FTIR têm contribuído para a identificação de grupos funcionais, como carboxílicos, hidroxílicos, polissacarídeos, aminas e outros (Piccolo & Stevenson 1982; Stevenson 1994). Nos estudos de FTIR, recentemente tem sido usado a análise de cluster para identificação e diferenciação de grupos de compostos (Pappas et al., 2008). Van Dijk & Van Hulle apud Krier et al. (2007) propuseram o uso de agrupamentos hierárquicos em função da similaridade mútua entre as variáveis espectrais. Muitos autores têm utilizados índices derivativos provenientes da espectroscopia do UV-Visível para avaliar o grau de humificação de substâncias húmicas extraídas de materiais orgânicos de diversas origens (Chen et al., 1977; Plaza et al., 2007).

Para este trabalho foram caracterizados ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) de horizontes A húmicos de Latossolos, com o objetivo de comprovar a hipótese de que existem diferenças na distribuição de formas de C no perfil de solo dada às diferentes rotas de humificação.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Solos

O trabalho foi realizado com amostras de Latossolo Húmico, coletados em seis áreas no Estado de Minas Gerais (Tabela 1), cujas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2. Em função da policromia apresentada por esses horizontes, foram coletadas amostras superficiais (0-10 cm) e subsuperficiais (60-100), de forma a caracterizar o material orgânico no perfil, contemplando o gradiente de pigmentação apresentado. As amostras foram secas ao ar, peneiradas a 2 mm e submetidas ao procedimento de extração e purificação das substâncias húmicas.

**Tabela 1** – Características e identificação das áreas estudadas

Amostras <sup>a</sup>	Vegetação	Localização	Altitude a.s.l. (m)	Clima (Köppen)	Litologia
LH1	Café ( <i>Coffea arabica</i> – 12 anos)	Sericita –MG	750	Cwb	Migmatito
LH2	Pastagem ( <i>Melinis minutiflora</i> – 40 anos)	Sericita-MG	750	Cwb	Migmatito
LH3	Fragmento de Mata Atlântica	Sericita-MG	750	Cwb	Migmatito
LH4	Samambaia ( <i>Pteridium aquilinum</i> )	Sericita-MG	1100	Cwb	Migmatito
LH5	Fragmento de Mata Atlântica	Mutum-MG	620	Cwa	Gnaisse-Migmatito
LH6	Cerrado	Araçuaí-MG	750	Aw	Gnaisse-Quartzito

<sup>a</sup> LH = Latossolo com horizonte A húmico

**Tabela 2** – Características físico-químicas dos solos estudados

Amostras <sup>(1)</sup>	pH (H <sub>2</sub> O)	COT (%)	NT (%)	CTC (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	Areia	Silte	Argila
<b>0-10 cm</b>							
LH1	5,1	3,3	0,3	12,4	33	11	56
LH2	4,9	3,5	0,3	12,6	29	7	64
LH3	4,8	2,6	0,3	11,7	33	11	56
LH4	5,7	4,2	0,4	15,5	37	29	34
LH5	5,4	4,7	0,3	15,4	59	12	29
LH6	4,2	5,1	0,2	16,9	41	6	53
<b>60-100 cm</b>							
LH1	4,8	2,8	0,1	11,2	33	11	56
LH2	5,1	3,0	0,2	11,0	29	7	64
LH3	5,0	2,7	0,2	10,2	33	11	56
LH4	5,5	4,7	0,3	14,6	37	29	34
LH5	5,5	3,7	0,2	15,7	61	12	27
LH6	4,3	2,7	0,1	11,0	40	4	56

<sup>(1)</sup> Para identificação das amostras ver Tabela 1.

## 2.2 – Extração e purificação dos ácidos húmicos e fúlvicos

Os solos foram submetidos a tratamento prévio com diclorometano/metanol, para remoção dos compostos lipídicos livres, de forma a evitar sua extração conjunta com as frações alcalinas solúveis. Em seguida, para extração e purificação dos AH e AF, foi utilizado método proposto pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS – sigla em inglês), de acordo com Swift (1996). Foram adicionados 200 mL de NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> em frascos contendo 20 g de amostra de solo sob presença de N<sub>2</sub> e agitados por 18 h a 25 °C. Solo e solução foram separados por centrifugação (10.000 rpm a 20 min) e a solução sobrenadante foi transferida para béquer de vidro. Esse processo de basificação e separação foi repetido cinco vezes. Para separar os AH dos AF, todo o sobrenadante foi acidificado a pH 1-1.5 com HCl concentrado. Os AF obtidos após centrifugação e filtragem foram reservados para posterior purificação. Os AH precipitados foram redissolvidos adicionando KOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> sob presença de N<sub>2</sub> e, adicionando KCl sólido até a concentração de 0,3 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida foram centrifugados por 30 min a 12.000 rpm. Após reprecipitados com HCl e o sobrenadante descartado, seguiu-se com processo de purificação dos AH através da redissolução durante 2 h com NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> seguido por centrifugação por 20 min a 12.000 rpm. O processo foi repetido três vezes. Os AH precipitados foram resuspenso em solução 0.5% HCl / 10% HF (w/v) e agitados durante 2 h a 25 °C. Em seguida foram centrifugados por 10 min a 5.000 rpm, sendo o processo repetido cinco vezes. Os AH purificados foram transferidos para tubos de diálise D-0405 (Sigma-Aldrich) e dialisados contra água destilada, até teste negativo para

cloreto, com o uso de  $\text{AgNO}_3$ . Após a diálise os materiais húmicos foram congelados e liofilizados.

Para a purificação dos AF foi preparada uma coluna de vidro (30 mm d.i., 300 mm altura) preenchida com resina Amberlite XAD-8 (Rohm & Hass, Co), previamente lavada com metanol,  $\text{NaOH}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{HCl}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  e água destilada, respectivamente. Os AF (100 mL) foram aplicados na coluna. A fração não adsorvida (AF-1) foi coletada e reservada. Em seguida, a coluna foi lavada sequencialmente com 100 mL de  $\text{HCl}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  e 100 mL de água destilada. Em seguida, os ácidos fúlvicos adsorvidos (AF-2) foram eluídos com 100 mL de  $\text{NaOH}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  sendo coletados imediatamente em um béquer contendo resina de troca catiônica, Dowex-50 (Dow Chemical Co.) em quantidade suficiente para manter o pH controlado entre 1 e 2. A fração AF-1 foi dialisada em sacolas de celofane, contra água destilada até teste negativo com o uso de  $\text{AgNO}_3$ . As frações AF-1 e AF-2 foram concentradas em rotavapor, congeladas e liofilizadas.

### **2.3 - Caracterização dos AH e AF**

As amostras purificadas de AH, AF-1 e AF-2 foram caracterizadas usando Análise Elementar, Espectroscopia no Visível, FTIR (infravermelho com transformada de Fourier), NMR do  $^{13}\text{C}$  (ressonância magnética nuclear do  $^{13}\text{C}$  – somente AH). A composição elementar (C, N e H) foi determinada em um microanalisador Perkin Elmer CHNS-O 2400, usando aproximadamente 2 mg da amostra. Os valores para Oxigênio (O) foram calculados por diferença. O grau de descarboxilação e desidratação dos AH e AF foram avaliados por meio do diagrama de van Krevelen (Stevenson, 1994).

As densidades ópticas de absorção no visível foram obtidas a partir de solução de  $\text{NaOH}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo a amostra em concentração de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (Chen et al., 1977; Kononova, 1982) em espectrômetro Shimadzu UV-160. Para determinar a presença de máximos espectroscópicos de baixa intensidade obteve-se a 2ª derivada do espectro, aonde as mudanças na pendente apareceram em formas de vales bem definidos cujas intensidades são proporcionais à dos picos originais.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Bruker IFS28 com transformada de Fourier, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio obtidas através de pressão uniforme de misturas de 2 mg de amostra com 200 mg de brometo de potássio. O intervalo de aquisição dos espectros foi de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Para facilitar o reconhecimento de padrões espectrais foi aplicado um procedimento matemático, para aumentar a resolução, baseado na subtração digital do espectro original do múltiplo de sua segunda derivada

(Rosenfeld & Kak, 1982; Starsinic et al., 1984; Almendros & Sanz, 1992; Filho et al., 1996). A partir dos espectros foram medidas as densidades ópticas relativas das bandas em 3400, 2920, 1720, 1620, 1460, 1330, 1270, 1380, 1030  $\text{cm}^{-1}$  fazendo relação das mesmas com a intensidade em 1510  $\text{cm}^{-1}$ , referente à banda aromática (Dupuis & Jambu, 1969). Também foram obtidas as razões das bandas em 3400  $\text{cm}^{-1}$  e 1380 com a banda em 2920  $\text{cm}^{-1}$  (que faz referencia a C-H alifático) e da banda em 1330  $\text{cm}^{-1}$  com a banda de absorção em 1270  $\text{cm}^{-1}$  onde se pode comparar a relação entre as estruturas de siringila e guaiacila. Para avaliar as diferentes amostras húmicas, a partir dos valores de densidade óptica, utilizou-se da análise multivariada discriminante.

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR dos ácidos húmicos foram adquiridos com um Bruker DSX 200, operando a uma frequência de  $^{13}\text{C}$  de 50.3 MHz, sob polarização cruzada (CP) com rotação no ângulo mágico de 6.8 kHz, utilizando um rotor de zircônio de 7 mm, com cavidade dupla aonde foram colocados os 300 mg da amostra. O tempo de aquisição foi de 12,4 ms com um tempo de contato na rampa CP de 1 ms (Knicker & Skjemstad, 2000). Análise de componentes principais foi utilizada avaliar as amostras de AH, considerando as variáveis obtidas dos espectros de  $^{13}\text{C}$  NMR.

### **3 – RESULTADOS**

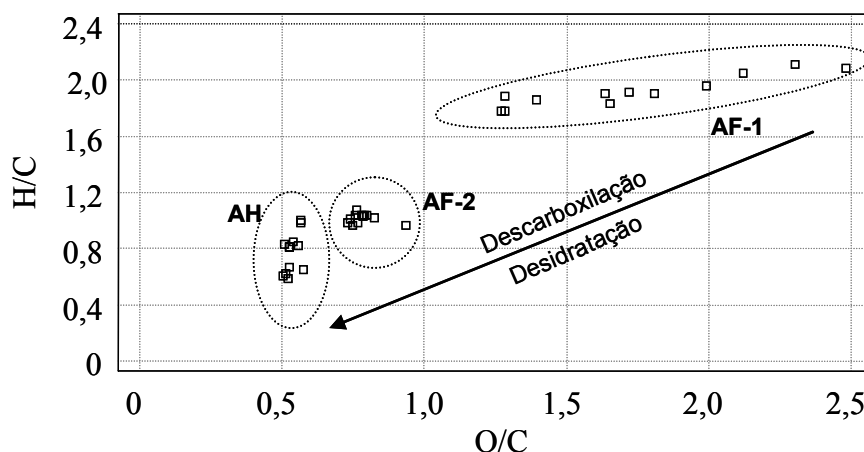
#### **3.1 – Análise Elementar**

A composição elementar e as razões atômicas (C/N, H/C e O/C) dos AH, AF estão demonstrados na Tabelas 3. Os AH e AF-2 extraídos da superfície apresentaram maiores valores de C, H e N. Dentre as frações analisadas, a AF-1 caracterizou-se por apresentar menor teor de C e N, possuindo mais H e O em sua estrutura. Os AF-1 e AF-2 apresentam composição elementar distintas principalmente no conteúdo de C e H. Os valores mais baixos da razão H/C dos AH corrobora com o fato de que são compostos mais aromáticos, condensados e descarboxilados, concomitante ao fato de apresentarem baixa razão atômica de O/C. Em detrimento à AF-2, a fração fúlvica não adsorvida pela resina XAD-8 (AF-1), apresentou maiores valores de O/C revelando presença de grupos oxigenados tais como hidroxilas, carboxilas, carbonilas, ésteres e éteres.

**Tabela 3** – Análise Elementar de amostras de AH (Ácidos Húmicos), AF-1 (Fração Fúlvica não adsorvida em XAD-8) e AF-2 (Ácidos Fúlvicos). Valores médios obtidos para diferentes Latossolos Húmicos. Valores entre parênteses representam o erro padrão da média.

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	C/N	H/C	O/C
0-10 cm							
AH	53,8 (±1,10)	3,6 (±0,52)	4,5 (±0,45)	38,0 (±0,80)	14,0 (±1,52)	0,8 (±0,13)	0,5 (±0,02)
AF-1	27,9 (±3,84)	4,5 (±0,44)	1,7 (±0,38)	65,8 (±4,55)	18,9 (±3,22)	2,0 (±0,10)	1,8 (±0,36)
AF-2	46,8 (±0,90)	3,9 (±0,07)	2,0 (±0,36)	47,3 (±0,66)	28,7 (±5,66)	1,0 (±0,03)	0,8 (±0,02)
60-100 cm							
AH	54,2 (±1,97)	3,2 (±0,57)	3,7 (±1,04)	38,9 (±0,90)	18,46 (±5,70)	0,7 (±0,15)	0,5 (±0,03)
AF-1	29,7 (±5,10)	4,6 (±0,55)	1,8 (±0,33)	63,8 (±5,73)	20,13 (±4,74)	1,9 (±0,12)	1,7 (±0,48)
AF-2	45,4 (±1,68)	3,8 (±0,25)	1,9 (±0,47)	48,9 (±1,94)	30,20 (±8,48)	1,0 (±0,04)	0,8 (±0,06)

O diagrama de Van Krevelen (Stevenson, 1994) obtido a partir das relações entre as razões moleculares de H/C e O/C evidencia diferenciação entre as frações de acordo com o grau de descarboxilação e desidratação das mesmas (Fig.1).



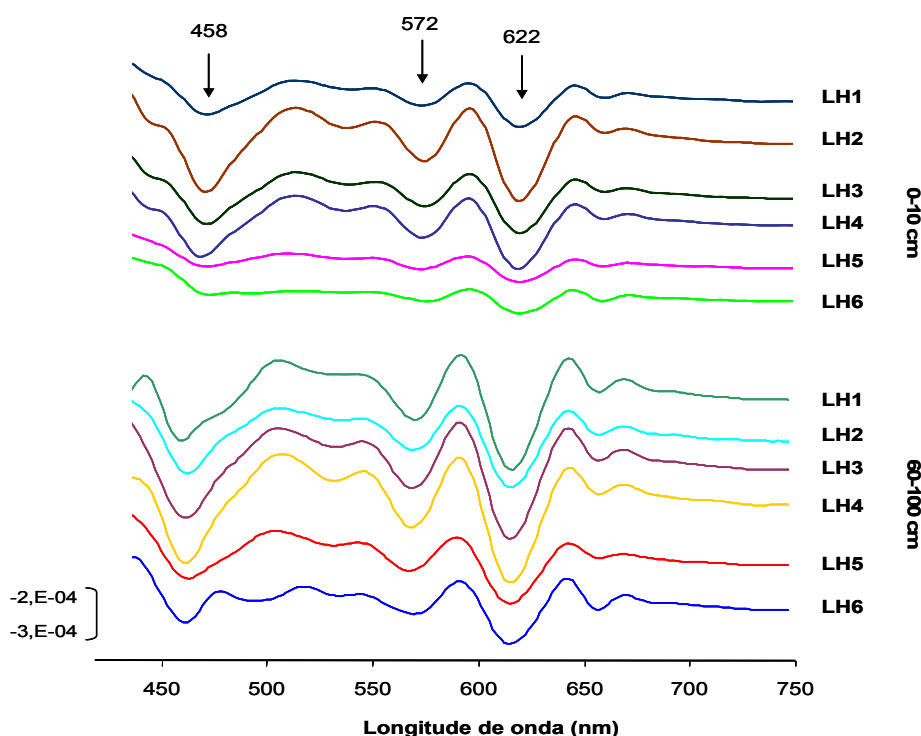
**Fig. 1** – Diagrama de van Krevelen obtido a partir da composição elementar dos ácidos húmicos (AH), AF-1 (Fração Fúlvica não adsorvida em resina XAD-8) e AF-2 (Ácidos Fúlvicos).

### 3.2 – Espectroscopia no Visível

Dado que a feição espectral das substâncias húmicas no uv-visível seja monótona e disforme em função da sobreposição de bandas relativa aos grupos cromóforos (MacCarthy & Rice, 1985), obtivemos a segunda derivada dos espectros, avaliando a intensidade dos vales apresentados (Fig. 2). Assim, os espectros apresentaram vales bem definidos a

aproximadamente 458, 570 e 620 nm. O decréscimo da intensidade de absorção para AH, extraídos na região de Mutum e Araçuaí, indicou diferenças na origem da matéria humificada para esses locais, quando comparado à amostra da região de Sericita.

As amostras de AH apresentaram razão  $E_4/E_6$  (dados não mostrados) dentro do intervalo de 3,6-5,2, em concordância com os valores descritos para AH em Stevenson (1994), sendo que os valores tenderam a aumentar com a profundidade. Valores médios de 17,6 e 9,9 foram encontrados para AF-1 e AF-2, respectivamente.

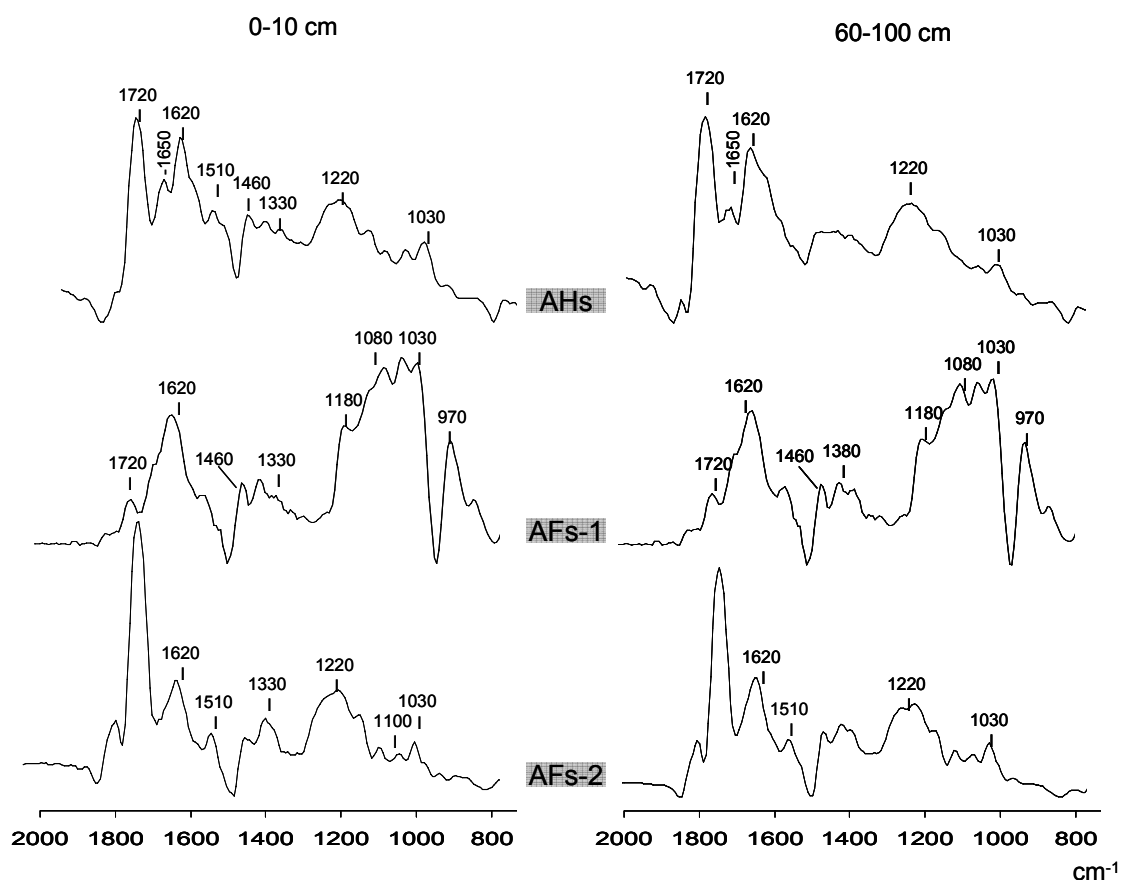


**Fig. 2** – Segunda derivada do espectro visível de ácidos húmicos extraídos de Latossolos Húmicos, em diferentes profundidades do solo (Concentração de  $0,2 \text{ mg C mL}^{-1}$ ). LH1= solo sob café; LH2= solo sob pastagem; LH3= solo sob mata em Sericita-MG; LH4= solo sob vegetação de samambaias; LH5= solo sob mata em Mutum-MG; LH6= solo sob cerrado.

### 3.3 – Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

No geral, os espectros de infravermelho dos AH, AF-1 e AF-2 apresentaram certa similaridade espectral entre si, de forma que optamos por apresentar os espectros referentes para cada fração para uma amostra representativa (Fig. 3). Neste trabalho estão apresentados apenas os sinais espectrais na região entre  $2.000$  e  $800 \text{ cm}^{-1}$ , por ser mais diagnóstica das feições características das substâncias húmicas. A identificação das bandas de absorção foi baseada em dados publicados por MacCarthy & Rice (1985), Stevenson (1994) e Tan (2003).

Os espectros mostraram diferenças entre as frações, principalmente para AF-1, que representa aquela fração fúlvica não adsorvida em resina XAD-8. Para esta fração observam-se absorções em regiões correspondentes a carboidratos ( $1.180$  e  $970\text{ cm}^{-1}$ ) e redução na banda de absorção em  $1.720\text{ cm}^{-1}$ , referente à presença dos grupos carboxílicos. Os AH apresentaram feições espectrais semelhante aos AF-2 entre as regiões de  $1.500$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ , porém, os AF-2 apresentaram maior intensidade de absorção em  $1.720\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 3 e Tabela 4). Absorções próximas a  $1010\text{ cm}^{-1}$  revelaram presença significativa de carboidratos e grupos metoxílicos na AF-1.



**Fig. 3** – Espectros de Infravermelho de ácidos húmicos (AH), fração fúlvica não adsorvida em XAD-8 (AF-1) e ácidos fúlvicos (AF-2) de um Latossolos Húmicos sob vegetação de mata (LH3) extraídos nas profundidades de 0-10 e 60-100 cm, Sericita-MG. Espectros com resolução melhorada através da subtração do múltiplo de sua segunda derivada (ver originais em anexo).

De acordo com Tan (2003) a banda de absorção em  $\sim 1.000\text{ cm}^{-1}$  de AH, usualmente é atribuída a impurezas relacionadas com a formação de quelatos orgânicos com sílica, podendo estar relacionado à presença de argilas que não foram removidas completamente durante o processo de purificação ( $\sim 1.06\%$  de cinzas). Observam-se, também, absorções centradas em

~1.220 cm<sup>-1</sup>, referentes a estiramentos de ésteres e fenóis. Para os AF-2 esse sinal aparece como uma banda mais larga, estando relacionado com deformações axiais de C-OH dos grupos carboxílicos. A absorção centrada em 1440 cm<sup>-1</sup> faz referência às ligações alifáticas C-H, sendo possível constatar redução da alifacidade nos AH extraídos entre 60-100 cm (Fig. 3).

**Tabela 4** – Densidade óptica relativa <sup>(1)</sup> das principais bandas do espectro de infravermelho de ácidos húmicos (AH), fração fúlvica não adsorvida em resina XAD-8 (AF-1) e ácidos fúlvicos (AF-2) extraídos de Latossolo Húmicos a 0-10 cm de profundidade

Amostras <sup>(2)</sup>	<u>3400</u> <u>1510</u>	<u>2920</u> <u>1510</u>	<u>1720</u> <u>1510</u>	<u>1620</u> <u>1510</u>	<u>1460</u> <u>1510</u>	<u>1330</u> <u>1510</u>	<u>1270</u> <u>1510</u>	<u>1380</u> <u>1510</u>	<u>1030</u> <u>1510</u>	<u>3400</u> <u>2920</u>	<u>1380</u> <u>2920</u>	<u>1330</u> <u>1270</u>
<b>AH</b>												
LH1	1,26	1,47	2,22	1,69	0,64	0,85	1,11	0,96	0,64	0,85	0,65	0,76
LH2	1,39	1,55	2,41	1,59	0,38	0,91	1,08	0,97	0,62	0,90	0,63	0,84
LH3	1,36	1,36	2,29	1,61	0,62	0,89	1,03	0,95	0,64	1,00	0,70	0,86
LH4	1,23	1,35	2,34	1,66	0,86	0,93	1,20	1,09	0,70	0,91	0,80	0,78
LH5	1,63	1,39	1,51	1,51	0,12	0,67	0,76	0,79	0,58	1,18	0,57	0,88
LH6	1,71	1,85	2,57	2,28	0,90	0,99	1,36	1,12	0,73	0,92	0,61	0,73
<b>AF-1</b>												
LH1	3,53	1,89	1,08	3,60	0,86	1,05	0,61	1,87	2,63	1,87	0,99	1,73
LH2	4,02	2,09	1,45	4,12	1,47	1,12	0,62	1,82	3,91	1,93	0,87	1,80
LH3	3,75	1,82	1,49	3,87	1,05	1,14	0,79	1,85	4,18	2,06	1,01	1,45
LH4	3,89	1,96	1,61	3,85	0,99	1,40	1,07	1,70	5,11	1,98	0,87	1,31
LH5	3,21	1,52	1,43	3,01	1,14	0,96	0,58	1,33	2,98	2,11	0,87	1,65
LH6	4,50	2,19	1,49	4,26	1,12	1,30	0,83	1,98	3,89	2,06	0,90	1,56
<b>AF-2</b>												
LH1	6,54	5,45	15,39	6,65	1,71	2,55	5,03	4,00	2,55	1,20	0,74	0,51
LH2	6,11	5,22	14,30	5,96	3,47	2,79	4,87	4,46	2,79	1,17	0,85	0,57
LH3	2,68	2,32	5,65	2,98	0,51	1,28	1,98	2,10	1,28	1,15	0,90	0,65
LH4	3,01	2,54	6,25	3,00	0,18	1,07	2,06	1,99	1,07	1,18	0,78	0,52
LH5	2,92	2,24	5,78	3,09	0,28	1,27	1,97	1,84	1,27	1,30	0,82	0,65
LH6	4,34	3,33	8,47	5,24	2,11	1,88	3,25	2,82	1,71	1,30	0,85	0,58

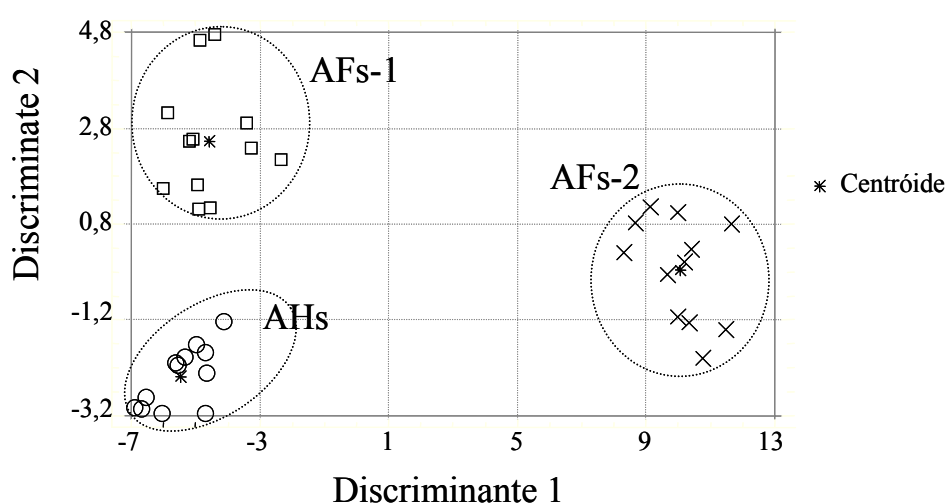
<sup>(1)</sup> em cm<sup>-1</sup>, <sup>(2)</sup> LH1= solo sob café; LH2= solo sob pastagem; LH3= solo sob mata em Sericita-MG; LH4= solo sob vegetação de samambaias; LH5= solo sob mata em Mutum-MG; LH6= solo sob cerrado.

A partir dos espectros foram medidas as densidades ópticas relativas das bandas em 3400, 2920, 1720, 1620, 1460, 1330, 1270, 1380, 1030 cm<sup>-1</sup> fazendo relação das mesmas com a intensidade em 1510 cm<sup>-1</sup>, referente à banda aromática (Tabelas 4). A razão 3400/1510 (OH/C=C vibrações aromáticas) foi maior para os AF-2, seguido pelos AF-1 e AH. A razão de intensidade das bandas 2920/1510 (C-H/C=C vibrações aromáticas) e 1720/1510 (C=O/C=C vibrações aromáticas) também foram menores para AH quando comparado a AF-2. A relação entre as estruturas siringila e guaiacila (1330/1270) demonstrou que a frequência de siringila para AF-1 foi praticamente duas vezes maior que para AF-2, indicando ser uma fração que possui preferencialmente estrutura química de lignina menos condensada (Tabela 4). Esse resultado corrobora com o fato de que as estruturas da unidade siringila, por não



possuírem o carbono reativo C5 disponível para reação na etapa de polimerização da biossíntese da lignina, são estruturas menos condensadas e mais favoráveis à deslignificação (Gomide et al., 2005).

As funções discriminantes obtidas a partir dos valores de densidade óptica mostraram que a ferramenta analítica FTIR foi eficiente em classificar e analisar as diferentes frações estudadas (Fig. 4). Nesse caso, sete variáveis foram significativas ( $P > 0,05$ ) na distinção entre as frações AH, AF-1 e AF-2, sendo as bandas em 1720, 1030, 1270, 1330  $\text{cm}^{-1}$  e as razões 3400/2920, 1330/1270 e 1380/2920.



**Fig. 4** – Funções discriminantes considerando as variáveis do espectro de infravermelho obtidas de amostras de substâncias humificadas extraídas de Latossolos com horizonte A húmico. AHs = ácidos húmicos; AFs-1 = fração fúlvica não adsorvida em XAD-8 e AFs-2 = ácidos fúlvicos.

### 3.4 – Espectroscopia do $^{13}\text{C}$ -NMR

A integração das áreas dos picos, a partir de espécies de carbono selecionadas (Malcom, 1989; Knicker 2006), está apresentada na Tabela 5. Os sinais dominantes foram devidos ao C-aromático e C-carbonila. Com exceção de LH5, o aumento na região aromática (110-160 ppm), em profundidade, foi devido a ressonância de um pico simples e largo em 132 ppm (espectros não mostrados, ver anexo).

**Tabela 5** – Valores de integração (% total da intensidade do sinal em  $^{13}\text{C}$ -NMR) das principais regiões nos espectros dos ácidos húmicos e suas razões

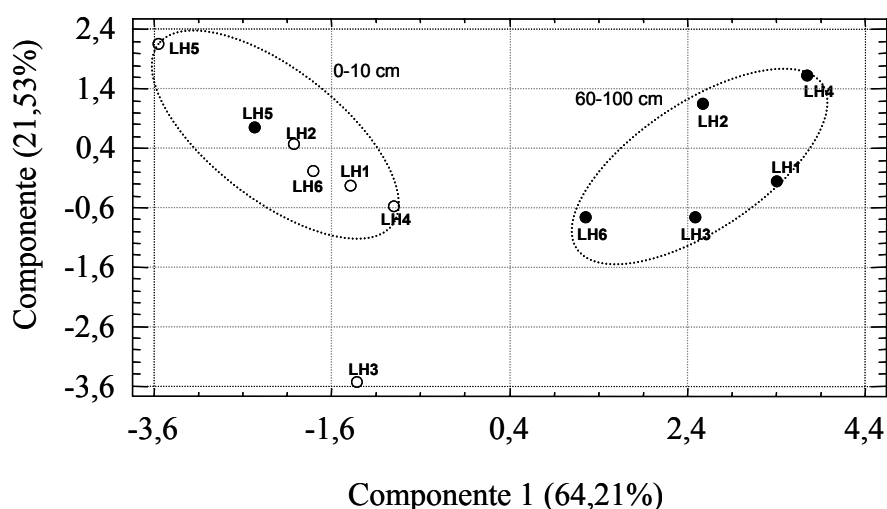
Amostras	$\delta^a \leq 40$ Região Alquila	$40 < \delta \leq 110$ O- e N-Região Alquila	$110 < \delta \leq 160$ Região Aromática	$160 < \delta \leq 220$ Região Carbonílica	Ar <sup>d</sup> /Al	GA <sup>e</sup>
			0-10 cm			
LH1	17,6	17,3	43,5	21,6	2,5	55,5
LH2	19,9	19,7	40,1	20,4	2,0	50,3
LH3	15,1	14,2	40,3	30,5	2,7	57,9
LH4	14,5	19,5	42,1	23,9	2,9	55,3
LH5	17,5	30,3	31,9	20,3	1,8	40,0
LH6	20,4	18,0	40,4	21,2	2,0	51,3
			60-100 cm			
LH1	6,7	10,7	60,0	22,5	8,9	77,5
LH2	8,7	13,0	58,6	19,7	6,7	73,0
LH3	8,1	11,8	56,4	23,7	7,0	73,9
LH4	6,4	13,1	60,2	20,3	9,3	75,5
LH5	14,7	26,3	35,8	23,2	2,4	46,6
LH6	10,2	12,8	53,6	23,4	5,3	70,0

<sup>a</sup> Deslocamento químico em ppm; <sup>b</sup> O- alquila C; <sup>c</sup> C-Alquila; <sup>d</sup> C-Aromático; <sup>e</sup> GA: grau de aromaticidade = (% C-aromático\*100)/(% C-alquilico + C-aromático). LH1= solo sob café; LH2= solo sob pastagem; LH3= solo sob mata em Sericita-MG; LH4= solo sob vegetação de samambaias; LH5= solo sob mata em Mutum-MG; LH6= solo sob cerrado.

Os espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR CPMAS dos AH extraídos de horizontes A Húmicos de Latossolos apresentaram diferenças estruturais em profundidade, principalmente devido a reduções na intensidade dos sinais na região entre 110-0 ppm. Os AH extraídos de amostras de solo provenientes da região de Mutum (LH5) apresentaram sinais típicos de lignina com ressonância em 150, 130, e 56 ppm e, maiores proporções entre C-carboxílico e C-aromático. Na região de Sericita, a distribuição das diferentes espécies de C não foi influenciada pelo uso da terra com café (LH1) e com pastagem (LH2) quando comparados com solo sob vegetação natural (LH3 e LH4) (Espectros não mostrados, ver em Anexo). Por sua vez, os AH provenientes de Mutum (LH5) apresentaram mais estruturas O-alquílicas. As contribuições para essa região do espectro são devido a carboidratos da celulose (62-112 ppm), grupos nitrogenados e lignina (145-160 ppm).

Os valores da relação Ar/Al evidenciaram caráter alifático dos AH em superfície. Para todas as localidades analisadas houve aumento em aproximadamente 20% no grau de aromaticidade dos AH com a profundidade, com exceção para a região de Mutum, onde o incremento foi de apenas 7%.

Os AH se diferenciaram estruturalmente ao longo do perfil do solo (Fig. 5). O comportamento diferenciado (*outline*) para LH3 foi devido ao forte sinal para carbonilas no horizonte superficial dessa amostra. Observa-se também que os ácidos húmicos, extraídos entre 60-100 cm, na região de LH5 apresentam similaridades estruturais com aqueles de superfície.



**Fig. 5** – Componentes principais da variância das amostras de AH considerando variáveis do espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR. Peso Componente 1 = região 160-110 ppm e razão Aromático/Alquílicos; peso Componente 2 = região 110-60 ppm e razão O-Alquil/Alquílicos. LH1= solo sob café; LH2= solo sob pastagem; LH3= solo sob mata em Sericita-MG; LH4= solo sob vegetação de samambaias; LH5= solo sob mata em Mutum-MG; LH6= solo sob cerrado.

#### 4 – DISCUSSÃO

Os estudos comparativos entre técnicas analíticas apropriadas possibilitaram identificar mudanças na composição estrutural e molecular da matéria orgânica do solo (MOS). Os resultados para composição elementar dos ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF-2) estão de acordo com valores obtidos para substâncias húmicas (Steelink & Muester, 1985; Stevenson, 1994; Tan, 2003.). De acordo com valores usuais de N para substâncias húmicas (0.8-4.3% para AH e 0.9-3.3% para AF), é possível afirmar que AH extraídos de Latossolos Húmicos apresentaram consideráveis teores de N em sua composição, assim como verificado para outros Latossolos brasileiros (Dick et al., 1999; González Pérez et al., 2004). O maior enriquecimento relativo de N para os AH, evidencia o acúmulo de compostos nitrogenados com a humificação. Segundo Lima et al. (2001) o aumento do N está associado à presença de núcleos aromáticos. Por outro lado, Kumada (1955) relaciona o aumento no conteúdo de N como indicador do processo de evolução dos AH, com transformações químicas mais intensas. A diminuição da relação O/C observado no sentido AF-1  $\rightarrow$  AF-2  $\rightarrow$  AH pode estar relacionada como a evolução das substâncias húmicas nesses solos, principalmente porque foi acompanhada pelo aumento na aromaticidade das mesmas (Schnitzer & Khan, 1972). De fato, quando as mudanças são plotadas no diagrama de van Krevelen (Fig.1), observamos que as amostras de AH são mais descarboxiladas e desidratadas.

Os resultados obtidos com a aplicação da segunda derivada nos espectros de UV-visível (Fig. 2) permitiram observar diferentes intensidades em vales específicos (458, 572 e 622 nm), os quais em muitos trabalhos têm sido relacionados ao comportamento de melaninas fúngicas do tipo dihidroxiperilenquinona (DHPQ) (Kumada, 1955; Valmaseda et al., 1989). A intensificação dos vales entre 60-100 cm corrobora com o ligeiro escurecimento observado em profundidade nesses horizontes húmicos. Os Latossolos da região de Sericita apresentaram diferenças mais marcantes entre as profundidades analisadas o que pode ser resultado das condições climáticas de maior precipitação e temperaturas mais amenas. Por outro lado, Silva & Vidal (1999) propuseram que a decomposição do carvão em material plásmico bruno-escuro contribui significativamente para melanização (escurecimento) em profundidade nesses horizontes húmicos. Todos os horizontes húmicos estudados apresentaram consideráveis quantidades de carvão vegetal no perfil, porém para este trabalho os mesmos não foram quantificados ou analisados qualitativamente. Dessa forma, é preciso considerar o fato de que a natureza das substâncias que possa estar atuando na pigmentação ainda não esta de toda esclarecida.

A razão de absorção entre 465 nm e 665 nm ( $E_4/E_6$ ) fornece informações sobre o conteúdo de radicais livres, C, O, COOH, acidez total; sendo influenciada pelo peso molecular (Chen et al., 1977). Comparando os resultados da razão  $E_4/E_6$  dos AH com os valores obtidos para grau de aromaticidade por  $^{13}\text{C}$ - RMN, observamos correlação negativa ( $r=-0,75^{***}$ , dados não mostrados) entre esses fatores, demonstrando que quanto menor o valor de  $E_4/E_6$  maior foi a aromaticidade das amostras húmicas. De acordo com Anderson (1979) e Stevenson, (1994), a razão  $E_4/E_6$  também pode ser usada para medir o grau de humificação da amostra. Os valores obtidos para  $E_4/E_6$  confirmaram maior humificação/aromaticidade para AH, AF-2 e AF-1, respectivamente. Por outro lado, Chen et.al.1 (1977) não encontraram relação entre a razão  $E_4/E_6$  com o grau de aromaticidade.

Os espectros de infravermelho (FTIR) obtidos para AH e AF-2, respectivamente, enquadraram-se nos tipos I e II de acordo com a classificação proposta por Stevenson (1994). Neste sentido, consideramos a fração AF-1 pode ser descrita como não-húmica pelo fato de não ter sido enquadrada em nenhum dos tipos considerados por estes autores. No geral, a análise no FTIR permitiu discriminar as diferentes frações húmicas do solo através de informações como o grau de oxidação, alifacidade e presença de grupos metóxi da lignina (Fig.4). Observamos a participação de produtos originados da alteração oxidativa da lignina através do reconhecimento de bandas típicas desta macromolécula a 1510, 1460 e 1330  $\text{cm}^{-1}$  (Farmer & Morrison, 1960; Yonebayashi & Hattori, 1989). No caso dos AH a proximidade

com a superfície do solo favoreceu a definição dessas bandas no espectro, o que nessa condição mostra contribuição mais efetiva da biomassa vegetal na origem dessa fração. As densidades relativas das principais bandas do espectro do FTIR (Tabela 3) refletiram menor processo de descarboxilação, desidratação, condensação e aromatização dos AH provenientes da região de Araçuaí, seguida por Sericita e Mutum. Em se tratando das condições climáticas esperaríamos resultado contrário para a região de Araçuaí (Aw), onde temperaturas mais elevadas poderiam favorecer a humificação. No caso da região de Mutum podemos considerar que a textura do solo possa ter influenciado nos menores valores observados para essa região, uma vez que os AH provêm de solo com característica mais arenosa que as demais regiões (Tabela 2). A proteção física dada pela fração argila do solo às substâncias húmicas (SHs) tem sido bastante documentada na literatura (Hassink & Whitmore 1997; Feller & Beare, 1997).

O complexo argilo-húmico é favorecido positivamente pela presença de grupamentos carboxílicos na estrutura das substâncias húmicas, sendo de grande importância nos processos geoquímicos do solo (Hayes et al., 1989; Stevenson 1994). A maior expressão da banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , característica de grupos carboxílicos, no espectro de AF-2 confirmou a importância dessa fração nos processos de interação argilo-húmus. Mendonça & Rowell (1996) trabalhando com Latossolos encontraram que os ácidos fúlvicos possuem maior capacidade de formar complexos argilo-húmicos, sendo importantes agentes na estabilização da estrutura desses solos. Com relação aos ácidos húmicos, Fontes (1990) observou forte interação entre ácidos húmicos extraídos de Latossolos húmicos com a goethita sugerindo mecanismos de ligação entre grupamentos carboxílicos desses ácidos com hidroxilas deste mineral.

A não observância de bandas definidas para amidas primárias ( $1340\text{-}1360\text{ cm}^{-1}$ ) e amidas secundárias ( $1540\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ ) demonstra que as mesmas possam estar sobrepostas com seus correspondentes aromáticos a  $1620$  ou  $1510\text{ cm}^{-1}$  e, ou, que grande parte dos 4% de N obtido para os AH referem-se a compostos aromáticos nitrogenados.

Como, *a priori* da extração e purificação dos AH, os componentes lipídicos foram extraídos do solo podemos considerar que a maior proporção de C-alquílico observada nos AH extraídos entre 0-10 cm, refere-se a estruturas parafínicas ligadas aos AH, resultado da preservação seletiva de biopolímeros de plantas, como cutina e suberina. Resultado esse que evidencia participação de biopolímeros alifáticos nos processos de humificação.

O aumento entre 60-100 cm do sinal para a região aromática (espectros não mostrados, ver anexo) foi devido a ressonância de um pico simples e largo a 132 ppm. Esse comportamento foi atribuído por Preston (1996), como resultado da conversão dos picos de

grupos aromáticos e aromáticos oxigenados em grupos C aromáticos substituídos. Essa conversão leva a crer que as estruturas aromáticas recalcitrantes, presentes devem ter origem diferente da lignina (Guggenberger et al., 1994) ou são produtos de uma via metabólica que conduziu a perdas de oxigênio em grupamentos aromáticos.

#### **4 – CONCLUSÕES**

1. A análise de FTIR revelou importantes diferenças entre AF-1 e AF-2, sendo que a primeira mostrou-se composta preferencialmente por polissacarídeos e grupamentos metoxílicos do tipo siringilo. Por sua vez, a AF-2 apresentou-se mais rica em grupamentos carboxílicos e estruturas químicas de lignina condensadas do tipo guaiacilo.
2. A análise do  $^{13}\text{C}$  por NMR permitiu determinar importantes diferenças quantitativas na distribuição dos ácidos húmicos em profundidade, com uma rota de humificação em profundidade no sentido da diminuição de grupamentos alquílicos e aumentos na região de sinal do C-aromático.
3. Ácidos húmicos provenientes da região de Mata Atlântica apresentam maior descarboxilação, desidratação e aromaticidade quando comparados aos da região de Cerrado.

#### **5 - AGRADECIMENTOS**

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão da bolsa. Agradecemos também ao Dr. Gonzalo Almendros do CSIC/CCMA de Madri pelo auxílio com as análises de UV-Visível e FTIR e, a Dra. Heike Knicker da Universidade Técnica de Munique pelo apoio com as determinações do  $^{13}\text{C}$  NMR.

#### **6 - REFERÊNCIAS CITADAS**

- Almendros, G., Sanz, J. 1992. A Structural study of alkyl polymers in soil after perborate degratation of humin. *Geoderma* 53: 79-95.
- Anderson, D.W. 1979. Processes of humus formation and transformation in soils of Canadian great plants. *Journal of Soil Science*, 30:77-84.
- Andrade, F. V.; Schaefer, C. E. G. R.; Correa, M. L. T.; Mendonça, E. S. 2004. Carbon stocks in brazilian Latosols (oxisols) from diferent morphoclimatic regions and management systems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35:2125-2136.

- Chen Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M. 1977. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society American Journal*, 41: 352-358.
- Dick, D.P., Burba, P., Herzog, H. 1999. Influence of extractant and soil type on molecular characteristics of humic substances from two Brazilian soils. *Journal Brazilian Chemical Society*, 10: 140-145.
- Dupuis T. y Jambu P. 1969. Etudé par spectrographie infrarouge des produits de l'humification en milieu hydromorphe calcique. *Sci. du Sol.* 1, 23-25.
- Farmer, V. C.; Morrison, R. I., 1960. Chemical and infrared studies on Phragmites peat and its humic acid. *Sci. Proc. R. Dublin Soc.*, 1: 85-104.
- Feller, C., Beare, M.H., 1997. Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. *Geoderma* 79: 69–116.
- Filho, B.R., Forato, L.A., Colnago, L.A. 1996. Recomendações sobre a utilização da técnica de derivação para aumento de resolução em espectros de FTIR de proteínas. *Comunicado Técnico, Embrapa*, 8:1-4
- Fontes, M.R. 1990. Interactions of goethite and humic acid in some oxisols from Brazil. In: Thesis PhD. Faculty of North Carolina State University. 75p.
- Gomide, J.L.; Colodette, J.L.; Oliveira, R.C.; Silva, C.M. 2005. Caracterização tecnológica, para produção de celulose, da nova geração de clones de Eucalyptus do Brasil. *Revista Árvore*, 29:129137.
- González-Pérez, M., Martin-Neto, L. Saab, S.C., Novotny, E.H., Milori, D.M.B.P., Bagnato, V.S., Colnago, L.A., Melo, W.J., Knicker, H. 2004. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, <sup>13</sup>C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma*, 118: 181-190.
- Gonzalez-Vila, F.J., Lentz, H., Lüdemann, H-D. 1976. FT-<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochemistry Biophysics Research Comm.* 72: 1063-1713.
- Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W. 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. Lignin and carbohydrate signature. *European Journal Soil Science*, 45: 449-458.
- Hassink, J., Whitmore, A.P., 1997. A model of the physical protection of organic matter in soils. *Soil Science Society American Journal* 61: 131-139.
- Ker, J. C., 1999. Latossolos do Brasil: uma revisão. *Genomos* 5, 17-40.
- Knicker, H., Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J., Gonzalez-Perez, J.A., Polvillo, O. 2006. Characteristics alterations of quantity and quality of soil organic matter caused by forest

- fires in continental Mediterranean ecosystems: a solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR study. *European Journal Soil Science*, 57: 558-569.
- Knicker, H., 2000. Biogenic nitrogen in soils as revealed by solid state carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 29, 715– 723.
- Knicker, H., Skjemstad, J.O., 2000. Nature of organic carbon and nitrogen in physically protected organic matter of some Australian soils as revealed by solid-state  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy. *Aust. J. Soil Res.* 38, 113– 127.
- Krier, C.; Rossi, F.; François, D., Verleysen, M. 2007. A data-driven functional projection approach for the selection of feature ranges in spectra with ICA or cluster analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, XX:XXXX (In press)
- Kononova, M. M. 1982. *Materia Orgánica del Suelo. Su Naturaleza, Propiedades y Métodos de Investigación.* Oikos-Tau ediciones: Barcelona.
- Kumada, K. Absorption spectra of humic acids. 1955. *Soil Plant Food*, 1: 29-30.
- Lima, H.N., Benites, V.M., Schaefer, C.E.R.G., Mello, J.W.V., Ker, J.C. 2001. Caracterização de ácidos húmicos extraídos de Terra Preta de Índio. In: Mendonça et al. (Eds) *Resumos do IV Encontro brasileiro de substâncias húmicas.* P. 155-156. Viçosa. UFV.
- MacCarthy, P., Rice, J.A. 1985. Spectroscopic Methods (Other than NMR) for Determining Functionality in Humic Substances. In: *Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation and Characterization.* Eds. Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wersshaw, R.L., MacCarthy. Wiley-Interscience, New York.
- Mahieu, N., Powlson, D.S., Randall, E.W., 1999. Statistical analysis of published carbon-13 CPMAS NMR spectra of soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 307– 319.
- Malcolm, R.L., 1989. Applications of solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy to geochemical studies of humic substances. In: Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. (Eds.), *Humic Substances II: In Search of Structure.* New York, Wiley, pp. 339–372.
- Mendonça, E.S.; Rowell, D.L. 1996. Mineral and organic fractions of two oxisols and their influence on effective cation-exchange capacity. *Soil Science Society of America Journal*, 60:188-192.
- Pappas, C.S.; Tarantilis, P.A., Moschopoulou E., Moatsou, G., Kandarakis, I., Polissiou, M.G. 2008. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry* 106: 1271-1277.
- Piccolo, A.; Stevenson, F.J. 1982. Infrared spectra of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  complexes of soil humic substances. *Geoderma*, 27: 195.



- Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Mondelli, D. 2007. Evolution of the fulvic acid fractions during co-composting of olive oil mill wastewater sludge and tree cuttings. *Bioresource Technology*, 98: 1964-1971.
- Preston, C.M. 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science*, 161:144-166.
- Rosenfeld, A., Kak, A.C., 1982. *Digital Picture Processing*, vol. I. Academic Press, New York.
- Schnitzer, M., Khan, S.U. 1972. *Humic Substances in the Environment*. Dekker, New York.
- Silva, A.C., Vidal-Torrado, P. 1999. Gênese dos Latossolo Húmicos e sua relação com a evolução da paisagem numa área cratônica do Sul de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 23: 329-341.
- Starsinic, M., Otake, Y., Walker Jr., P.L., Painter, P.C. 1984. Application of FT-IR spectroscopy to the determination of COOH groups in coal. *Fuel* 63: 1002-1007.
- Steelink, C., Muester. 1985. Geochemistry and ecological role of humic substances. In: *Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation and Characterization*. Eds. Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy. Wiley-Interscience, New York.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley. 496p.
- Swift, R.S., 1996. Organic matter characterization. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. SSSA Book Series No. 5. SSSA and ASA, Madison, WI., pp. 1011–1069.
- Tan, H.K. 2003. *Humic Matter in Soil and the Environment – Principles and Controversies*. Marcel Dekker, New York.
- Theng, B.K.G., Tate, K.R., Sollins, P. 1989. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: Coleman, D.C., Oade, J.M., Uehara, G. (Eds.) *Dynamic of Soil Organic Matter in tropical Ecosystems*. Honolulu, University of Hawaii. P 5-32.
- Valmaseda, M.; Martinez, A.T., Almendros, G. 1989. Contribution by pigmented fungi to P-type humic acid formation in two forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 21:23-28.
- Volkoff, B., Cerri, C.C., Melfi, A.J. 1984. Húmus e mineralogia dos horizontes superficiais de três solos de campos de altitude dos Estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 8:277-283.
- Yonebayashi, K.; Hattori, T., 1989. Chemical and biological studies on environmental humic acids. II. <sup>1</sup>H-NMR and IR spectra of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35: 383-392.

Zech, W., Senesi, N. Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A., Schoroth, G. 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79: 117161.

## **II - Dessorção e pirólise de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob café e pastagem na Zona da Mata Mineira.**

### **RESUMO**

Para avaliar as transformações estruturais ocorridas na fração humificada da matéria orgânica do solo em horizonte A húmico de um Latossolo sob café e pastagem, foram extraídos e purificados ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) em intervalos de 0-10 e 60-100 cm de profundidade. As amostras purificadas foram submetidas a técnicas termais de degradação, sendo dessorção a 280 °C e pirólise a 610 °C, em pirolisador analítico acoplado a cromatógrafo a gás e espectrômetro de massa. Os resultados obtidos por dessorção e pirólise mostraram que os mecanismos de estabilização envolvem acumulação de compostos nitrogenados e aromáticos em AH e de compostos aromáticos e fenólicos em AF. Os AH extraídos da superfície apresentaram, tanto por pirólise quanto por dessorção, maior diversidade de compostos em sua estrutura que àqueles extraídos entre 60-100 cm, principalmente sob sistema de uso com mata e pastagem. Os solos cultivados apresentaram estruturas húmicas mais alifáticas na camada entre 60-100 cm, sendo que sob café, esse efeito foi mais intenso. Comparativamente com o solo sob mata, os AH e AF extraídos sob café e pastagem apresentaram poucas estruturas nitrogenadas. Detectou-se maior proporção de estruturas ricas em polissacarídeos nos AF extraídos entre 60-100 cm de profundidade, revelando importantes movimentações desses ácidos no perfil. Nos primeiros 10 cm do solo, o uso agrícola do solo promoveu reduções em compostos alifáticos e nitrogenados na estrutura dos AH e, de compostos fenólicos, de lignina, ácidos graxos e nitrogenados na estrutura dos AF.

**Palavras chaves:** Pi-CG/EM, substâncias húmicas, termodegradação, diversidade estrutural, uso da terra.

**SUMMARY:** Double-shot pyrolysis of the humic and fulvic acids isolated from a Subtropical Humic Latosol cultivated with coffee and pasture in the Atlantic Forest Zone, Minas Gerais - Brazil.

To evaluate the structural transformations occurred in the humified fraction of soil organic matter (SOM) in a humic horizon Latosol under coffee, pasture and Atlantic Forest fragment, humic (HA) and fulvic acids (FA) from 0-10 and 60-100 cm soil layers were extracted and purified. The purified samples were submitted to thermal techniques of degradation, with desorption at 280 °C and pyrolysis at 610 °C, using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. The results obtained by desorption and pyrolysis showed that stabilization mechanisms involve accumulation of aromatic and N-compounds in HA, and aromatic and phenolic compounds in FA. The HA from topsoil presented, for both pyrolysis and desorption, greater diversity of compounds in its structure than those extracted from the 60-100 cm, mainly under the system with forest and pasture. Cultivated soils showed more aliphatic humic structures between 60-100 cm, with coffee having a more intense effect. Comparatively, with the soil under forest, HA and FA extracted from soil under coffee and pasture showed less N structures. The FA extracted at 60-100 cm showed a higher proportion of structures rich in polysaccharides, revealing important movements of those acids in the profile. In first 10 cm of the soil, the agricultural use reduced aliphatic and N compounds in the HA structure, and of phenolic, lignin, fatty acids and N compounds in the FA structure.

**Keywords:** Py-GC/MS, humic substances, termodegradation, structural diversity, land use.

## 1 - INTRODUÇÃO

Lavouras de café (*Coffea arabica* L.) e pastagens de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.) constituem padrão geral de uso da terra na Zona da Mata (Ribeiro et al., 1972; Resende et al., 2002), sendo que as áreas com ocorrência de Latossolos com horizonte A húmico são intensamente utilizadas para estes fins. Esses solos são profundos, intemperizados, com boa drenagem, distróficos e apresentam horizonte A rico em matéria orgânica (MO) com até 200 cm de profundidade (Ker, 1999). O uso agrícola nesses solos pode estar alterando a dinâmica da MO, principalmente do compartimento mais humificado o qual representa mais de 80% do carbono orgânico total (Assis et al. 2005 – dados não publicados). A importância das substâncias húmicas (SHs) nos estudos de impacto do uso agrícola, provêm de seu caráter integrador do meio com a biota e da atuação como fonte e estoque de carbono (C) no solo.

As frações humificadas da MO são importantes marcadores químicos do histórico de uso do solo, sendo utilizadas como indicadoras dos efeitos do manejo sobre a qualidade do solo, em termos quantitativos e qualitativos (Andreux & Cerri, 1989; MacCallister & Chien, 2000; Canellas et al., 2004). A análise das SHs permite diagnosticar as mudanças progressivas no ciclo biogeoquímico dos ecossistemas, por serem atuantes na compartimentação dos nutrientes e na microestruturação do solo (Hayes, 1991)

A pirólise (Py) em conexão com a cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/MS) tem sido amplamente utilizada na caracterização molecular direta de matrizes complexas (Saiz-Jimenez & Leeuw, 1987; Schulten & Schnitzer, 1992; González-Vila et al., 2001), assim como a influencia urbana (Canellas et al., 2000) e agrícola (Masciandaro et al., 1998; Nierop et al., 2001) na composição molecular das SHs. As técnicas de Py apresentam diversas vantagens sobre outros métodos degradativos em estudos das macromoléculas. É uma técnica bastante reproduzível onde se utiliza pouca quantidade da amostras e os resultados obtidos podem ser interpretados tanto qualitativamente como quantitativamente (Stevenson, 1994).

Recentemente, a utilização de técnicas pirolíticas que envolvam temperaturas de dessorção seguidas pela Py convencional tem sido utilizada com o objetivo de se obter maiores informações sobre a composição estrutural das matrizes macromoleculares complexas (Arias et al., 2006; Quénéa et al., 2006; González-Perez et al., 2007) Os produtos liberados por dessorção correspondem às substâncias de origem recente na estrutura das substâncias húmicas, sendo fracamente condensadas e periféricamente ligadas

nas estruturas humificadas termoestáveis (Almendros & González-Vila, 1987; González-Perez et al., 2007).

Assim, importantes contribuições vêm sendo obtidas no detalhamento da estrutura química das SHs, principalmente na elucidação da origem dos seus componentes estruturais (Saiz-Jimenez & Leeuw, 1987), como na identificação das mudanças na composição estrutural pelo uso e manejo do solo (Nierop et al., 2001; Gleixner et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do uso agrícola com café e pastagem sobre a estrutura de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo húmico da região de Mata Atlântica de Minas Gerais, utilizando técnica de degradação térmica diferencial por dessorção e pirólise.

## **2 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Áreas de estudo e amostragem**

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico húmico, textura argilosa, localizado no município de Sericita (20°28'26S e 42°28'55 W), região pertencente à Zona da Mata Mineira. A região caracteriza-se por um clima mesotérmico (Cwb), com temperatura média anual de 18 °C. O regime pluviométrico é caracterizado por um período chuvoso, durante os meses de novembro a março, e por um período seco, de abril a outubro. A precipitação média anual varia em torno de 1.300 mm.

Café e pastagem são padrões de uso da terra na região estudada. Para tanto selecionou-se área cultivada 12 anos com café em sistema convencional, sendo que os 40 anos anteriores foram utilizados com pastagem. Para pastagem foi selecionada área com aproximadamente 40 anos de uso com capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.), sendo anteriormente mata natural. Como referência amostrou-se um fragmento de vegetação nativa, dentro da mesma unidade taxonômica de solo. A amostragem foi realizada numa mesma posição na paisagem, coletando para cada área amostras compostas por 20 subamostras simples, nas profundidades de 0-10 e 60-100 cm. Em seguida, as mesmas foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas a 2 mm.

### **2.2 - Extração e Purificação dos Ácidos Húmicos e Fúlvicos**

Amostras de solo peneiradas foram previamente tratadas com CHCl<sub>3</sub>/MeOH (diclorometano e metanol) na proporção 3:1 (v/v), para eliminação de compostos lipídios (substâncias não húmicas) de forma a evitar sua co-extração como forma solúvel em ácido e álcali. Em seguida procedeu-se a extração, seguida de purificação, dos ácidos húmicos

(AH) e fúlvicos (AF) de acordo com o método proposto por Swift (1996). Brevemente, utilizou-se como extrator solução de NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup> na proporção de 10:1 para remoção dos AH e AF da matriz do solo. Os ácidos húmicos extraídos foram redissolvidos, na presença de N<sub>2</sub>, adicionando 100 mL de 0,1 M KOH até concentração final de 0.3 M. Após completa dissolução o material foi centrifugado a 14,000 x g de forma a remover os sólidos suspensos (argilas). Em seguida os AH foram agitados por 2 h a 25 °C na presença de solução contendo 10 e 5% (w/v) de ácido fluorídrico e clorídrico, respectivamente. O tratamento com fluorídrico e clorídrico foi repetido por sete vezes, que foi a quantidade necessária, nessas amostras, para reduzir o teor de cinzas à < 1%. Os AH foram dialisados em tubos de celulose D-0405 (Sigma Aldrich) e liofilizados.

A solução contendo os AF foi eluída em coluna preenchida com DAX-8 a uma taxa de 10 mL min<sup>-1</sup>. A fração adsorvida na coluna foi eluída a taxa de 2 mL min<sup>-1</sup> utilizando solução de NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>, sendo coletada imediatamente em frasco contendo resina de troca catiônica Dowex-50. Nesse passo o controle do pH se manteve na faixa de 1-2, fato importante no monitoramento do processo de troca catiônica. Em seguida os AF foram congelados e liofilizados.

### **2.3 - Dessorção e Pirólise acoplados a cromatografia de gás espectrometria de massa**

A dessorção e pirólise das amostras foram realizadas pelo aquecimento rápido na ausência de oxigênio em um pirolizador tipo microforno “*double-shot*” (modelo PY2020iD, Frontier Laboratórios, Fukushima, Japão) conectado a um cromatógrafo a gás (CG) e espectrômetro de massas (EM) Agilent 6890N. Na primeira etapa (dessorção), aproximadamente 2 mg da amostra foram condicionados em cápsula de platina e introduzidos em microforno à 100 °C, com taxa de elevação de 10°C até 280 °C, mantendo-se nesta temperatura por 1 (um) minuto. Na etapa seguinte (pirólise) a amostra foi submetida no microforno a uma temperatura de 610 °C durante 30 s. O forno do CG foi programado de 50 a 100 °C, sendo que depois de 300 °C a velocidade de aumento de temperatura foi de 10 °C min<sup>-1</sup>. O injetor e a interface foram programados a 250 °C e 280 °C respectivamente. Foi utilizada uma coluna capilar de 25 m x 0,25 x 0,25 mm DB5 MS (J&W Scientific). O gás carreador foi o hélio (He) com um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O espectrômetro de massa (MS) operou num intervalo de massas de 40-600 scans s<sup>-1</sup> com temperatura na fonte de ionização de 230 °C e voltagem de 70 eV.

Os produtos derivados da dessorção e pirólise foram identificados com o auxílio de padrões de espectros em livraria eletrônica como Wiley e NIST (National Institute of Standards and Technology) e com espectros publicados na literatura. A estimativa da área

dos picos dos diferentes produtos da dessorção e pirólise foi calculada de acordo com abundância total, considerando a soma das áreas de todos os picos como sendo 100% da área do cromatograma do íon total (TIC – sigla em inglês), sendo que foram considerados picos com mais de 1% da área total.

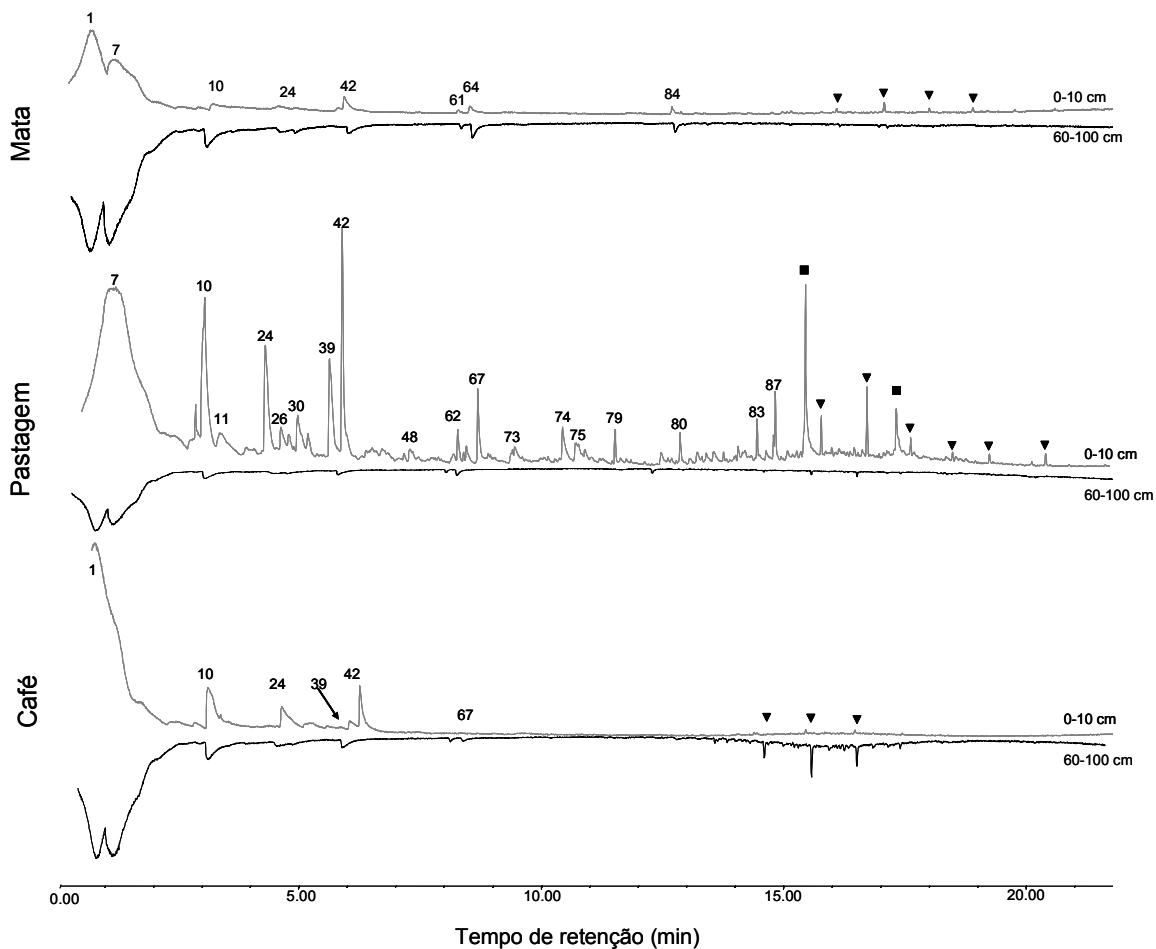
Para avaliar a diversidade de compostos gerados por dessorção e pirólise utilizamos o índice de Shannon-Weaver, informando assim, a distribuição entrópica dos compostos dentro de cada amostra e dando-nos idéia da riqueza estrutural dos mesmos (Odum, 1983). A relação entre a abundância relativa dos picos referentes ao benzeno (B) e tolueno (E<sub>3</sub>) foi calculada conforme descrito por Ceccanti et al. (1986), sendo considerada como índice de humificação.

### **3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

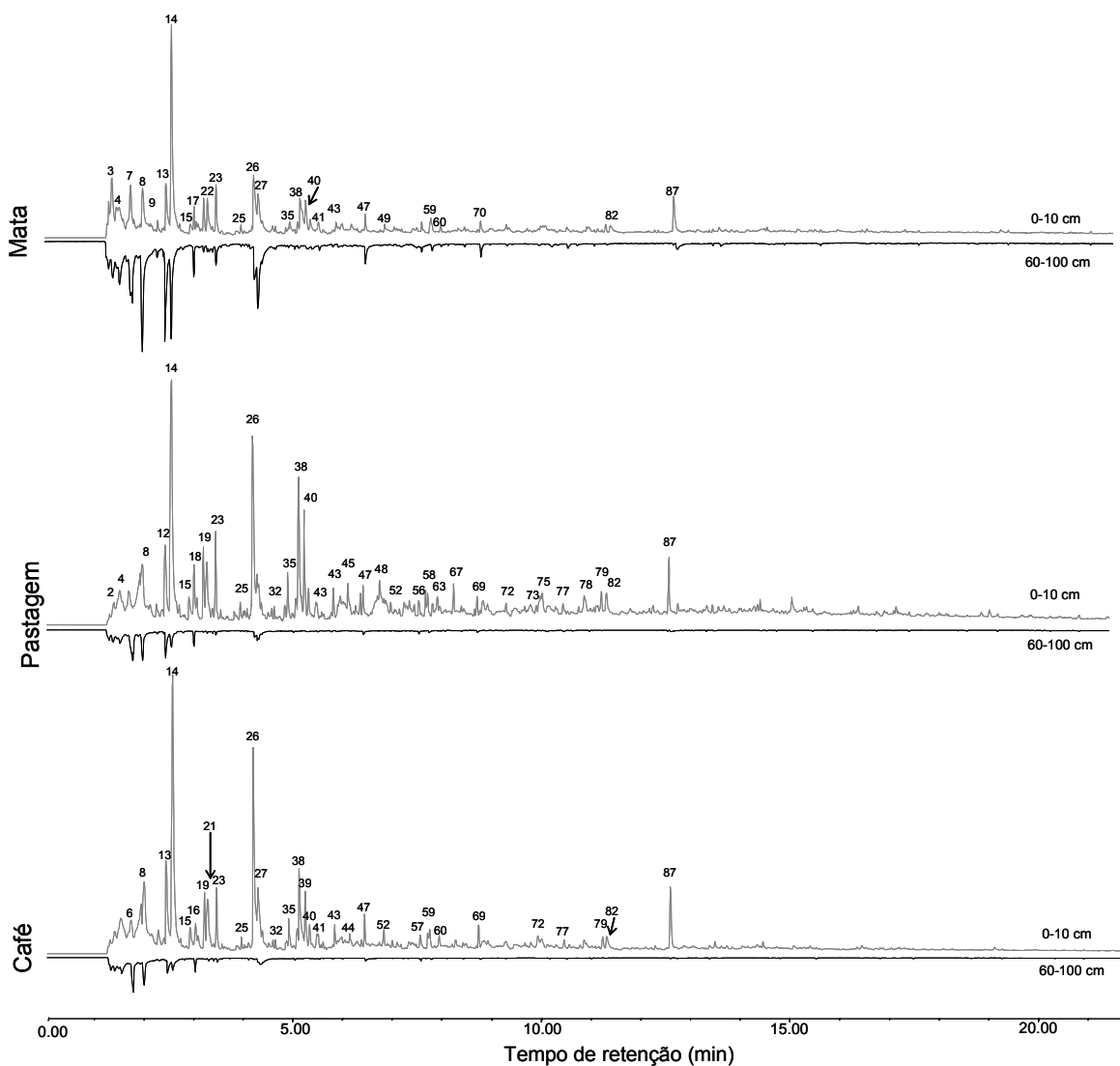
Os principais produtos encontrados com a dessorção dos AH (Fig. 1) e AF (Fig. 3) foram levoglucosano, furfural, metilfurfural, piridina, 1,3-isobenzofuranodiona, 3,4-dimetil-2,3-furandiona, os quais são considerados produtos voláteis específicos de polissacarídeos (Saiz-Jimenez & Leeuw, 1985). Observamos que para os AH extraídos entre 0-10 cm houve maior proporção desses compostos ligados na estrutura. Esses compostos são facilmente decomponíveis, sendo os primeiros a serem atacados durante processos de diagênese desses ácidos no solo, principalmente naqueles que conduzem à carbonização (Stevenson, 1994). A redução na proporção destes compostos para os AH extraídos entre 60-100 cm confirma este processo.

No geral, os cromatogramas dos produtos de pirólise mostraram características estruturais distintas entre AH e AF, assim como entre as profundidades analisadas (Fig. 2 e 4). A maior parte dos compostos foi liberada com 10 min, sendo que para os AH os principais picos referem-se aos derivados de benzenos e fenóis, enquanto que para os AF predominaram compostos aromáticos, nitrogenados e derivados do furano.





**Fig. 1** – Cromatogramas dos compostos termovaporados (280 °C.) liberados de amostras de ácidos húmicos extraídos de Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob cultivo com café e pastagem. Ácidos graxos ( ■ ) e alcanos ( ▲ ). Os números sobre os picos estão identificados na Tabela 1.



**Fig. 2** – Cromatogramas dos produtos de pirólise (610 °C.) liberados de amostras de ácidos húmicos extraídos de Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob cultivo com café e pastagem. Os números sobre os picos estão identificados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Principais produtos termodegradados por dessorção (280) e pirólise (600) identificados em amostras de ácidos húmicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob café, pastagem e mata.

Nºdo Pico *	Compostos	Nºdo Pico *	Compostos
1	Dióxido de enxofre	45	Fenol, 4-etil-
2	Metano, bromo-	46	p-cresol
3	metanotiol	47	Naftaleno
4	Metano, iodo-	48	ρ-4-vinilfenol
5	Furano, 3-metil-	49	3-fenil-2-propin-1-ol
6	Furano, 2-metil-	50	Benzonitrila, 2-metil-
7	Ácido acético	51	Cinamaldeído
8	Benzeno	52	Benzenopropanenitrila
9	Ciclobutanocarbonitrila	53	1,2,-benzenodiol, 3- metoxi
10	Furfural	54	2-Metoxiresorcinol
11	Furandiona	55	1-Trideceno
12	Piridina	56	Tridecano
13	Piridina, 1-metil-	57	1H-Inden-1-ona, 2,3-dihidro
14	Tolueno	58	1H-Indole
15	Piridina, 2-metil-	59	Naftaleno, 1-metil-
16	1H-pirrole, 2-metil-	60	Naftaleno, 2-metil-
17	2,4-Dimetil-1-heptene	61	1H-Indole, 2,3-dihidro-
18	1H-Pirrole, 3-metil-	62	4-vinil-2-metoxi-fenol
19	Benzeno, etil-	63	Naftaleno, 2-metil-
20	ρ-xileno	64	Benzenamina, 2,6-dietil-
21	o-xileno	65	Fitálico anidro
22	ρ-xileno	66	2-isopropil-6-metilanilina
23	Estireno	67	Fenol, 2,6-dimetoxi-
24	5-metil furfural	68	Bifenil
25	Propil benzeno	69	Naftaleno, 2-etenil-
26	Fenol	70	1H-indole, 2-metil-
27	Benzonitrila	71	1H-indole-1,3-(2H)-diona, 2 metil
28	Piridina, 3-metoxi-	72	Piridina, 3-fenil-
29	Benzonitrila	73	Vanilina
30	N-Acrilonitrilaziridina	74	Acetovanilona
31	1,2,3-trimetil benceno	75	Acetamida,n-(2,4-dihidroxifenil)
32	1-propenil benzeno	76	Dibenzofurano
33	Benzenoacetaldeído	77	2(1H)-Quinolinona, 1-hidroxi-
34	1H-Indano	78	9H-Fluoreno
35	Fenol, 2-metil -	79	Fitalato dietil
36	Acetofenona	80	2-metil-4H-1-benzotiopiran-4-ona
37	Benzonitrila, 2-metil -	81	Benzofurano
38	Fenol, 4-metil -	82	Dibenzofurano, 4-metil-,
39	Fenol, 2-metoxi- (guaiacol)	83	Fitalato dibutil
40	Benzonitrila, 2-metil-,	84	Indolina, 2,3-dietil-3-metil -
41	Benzonitrila, 4-metil-,	85	2-fenoxi-, fenol
42	Levoglucosano	86	[1,1'-Bifenil]-2,3-dio
43	Benzil nitrila	87	Alachlor
44	3-etil-, fenol		

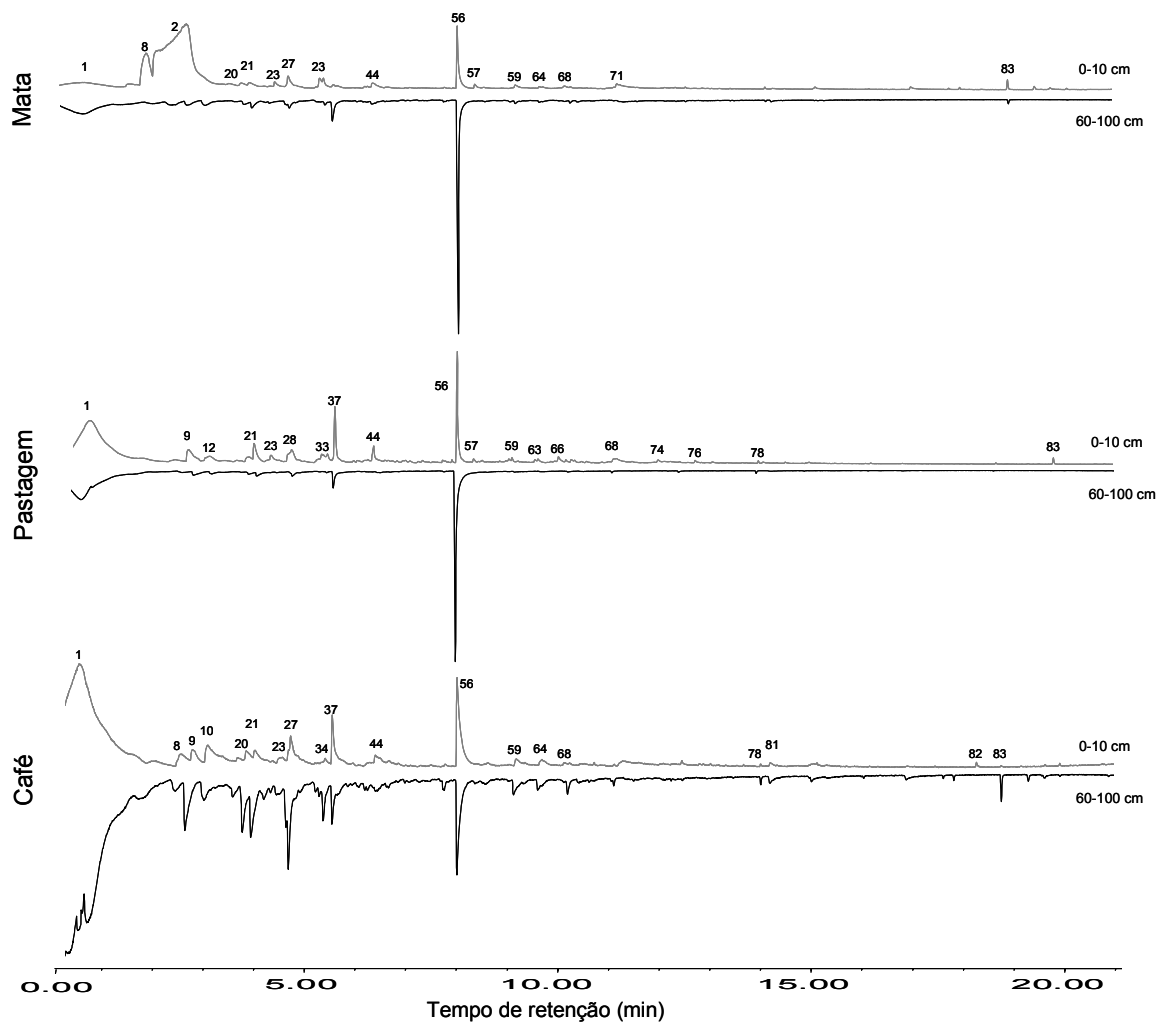
\* números dos picos como mostrado nas Fig. 1 e 2.

Ao considerarmos picos com >1% da área total do TIC observamos que foram liberados por dessorção cerca de 55 e 29% de diferentes compostos para AH e AF, respectivamente. Já sob pirólise houve volatilização de aproximadamente 45 e 70% dos compostos presentes nos AH e AF, respectivamente (dados não mostrados). Essa diferenciação em termos de produtos termoevaporados por dessorção e pirólise evidencia que os AF extraídos deste Latossolo húmico apresentaram maior diversidade de compostos termoestáveis em detrimento àqueles fracamente adsorvidos na estrutura, os quais preferencialmente eram compostos originados de polissacarídeos (Tabela 4).

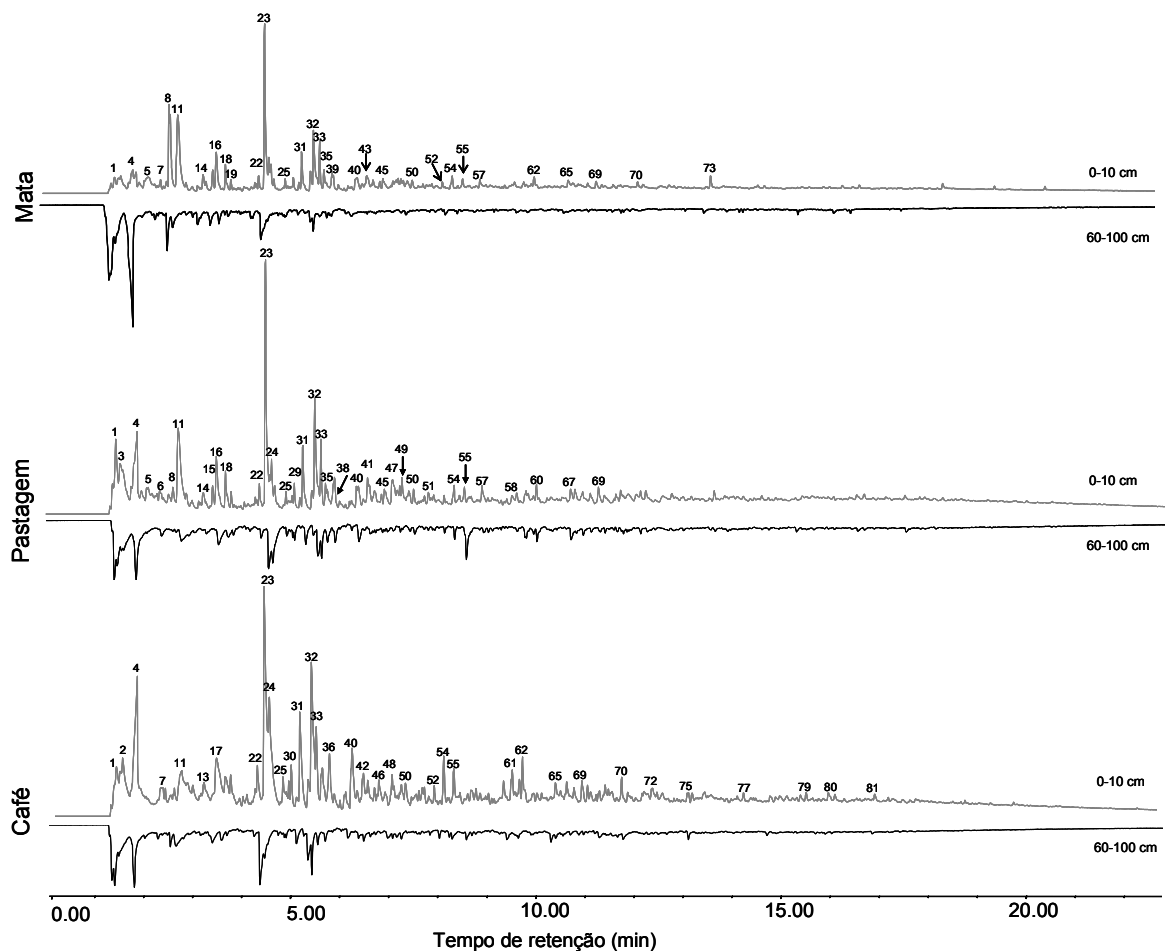
O pico 23 (Tabela 2) referente ao fenol é dominante no cromatograma dos produtos de pirólise dos AF. Também observamos presença de alquilfenóis como 2-metilfenol, 4-metilfenol e 3-etilfenol, correspondendo respectivamente aos picos 31, 32 e 40 (Tabela 2). Assim, os AF deste solo apresentaram dominância em compostos fenólicos quando comparado aos AH. Tanto os fenóis quanto os alquilfenóis podem ser gerados em pirólises de lignina, proteínas, taninos e polissacarídeos (Saiz-Jimenez & Leeuw, 1986; van Heemst et al., 1999).

Os metoxifenóis são típicos produtos da pirólise da lignina (Sainz-Jimenez & Leeuw, 1986) e a presença de 2,6-dimetoxifenol (unidades siringila) e de 2-metoxifenol (unidades guaiacila) em nossos cromatogramas, tanto para AH quanto AF, mostra a contribuição de lignina na estrutura dessas frações humificadas. A maior proporção nos cromatogramas de unidades originadas de guaiacila (2-metoxifenol) em detrimento das provindas de siringila (2,6-dimetoxifenol) corrobora com o fato de que as unidades de siringila são menos resistente à biodegradação (Sanger et al., 1997).

Maior parte dos compostos derivados da lignina na estrutura nos AH extraídos na profundidade de 0-10 cm dos solos cultivados estavam fracamente ligadas à estrutura desses ácidos (Tabela 3). Esse resultado indica que houve recentes contribuições em compostos derivados da lignina na estrutura dos AH extraídos dos solos cultivados, principalmente sob pastagem. Observamos com a profundidade ausência de compostos de lignina ligados na estrutura dos AH (dessorção) assim como redução na proporção de lignina no núcleo termoestável (pirólise) dos AH (Tabela 3).



**Fig. 3** – Cromatogramas dos compostos termovaporados (280 °C.) liberados de amostras de ácidos fúlvicos extraídos de Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob cultivo com café e pastagem. Os números sobre os picos estão identificados na Tabela 2.



**Fig. 4** – Cromatogramas dos produtos de pirólise (610 °C.) liberados de amostras de ácidos fúlvicos extraídos de Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob cultivo com café e pastagem. Os números sobre os picos estão identificados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Principais produtos termodegradados por dessorção (280 °C) e pirólise (600 °C) identificados em amostras de ácidos fúlvicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob café, pastagem e mata.

Nº do Pico	Compostos	Nº do Pico	Compostos
1	Dióxido de enxofre	43	Fenol, 3-etil-
2	Metano, iodo-,	44	Ácido Benzoico
3	Pentanal, 2-metil-	45	Naftaleno
4	Ácido acético	46	Fenol, 3,4-dimetil-
5	Benzeno	47	1,2-Benzenodiol
6	Furano, 2,5-dimetil-	48	Benzofurano, 4,7-dimetil-
7	Ácido propanoico	49	Benzofurano, 2,3-dihidro-
8	Piridina	50	2-Coumaranona
9	Furfural	51	1,2-Benzenodiol, 3-metoxi-
10	Maleico anidrido	52	1H-Inden-1-ona, 2,3-dihidro-
11	Benzeno, metil-	53	Naftaleno, 2-metil-
12	2,5-Furandiona	54	Naftaleno, 1-metil-
13	Furano, 3 metil-	55	Naftaleno, 2-metil-
14	1H-Pirrole, 3-metil-	56	1,3-Isobenzofuranodiona
15	Benzeno, etil-	57	Fenol, 2,6-dimetoxi-
16	o-Xileno	58	1,3-Isobenzofuranona
17	p-Xileno	59	1,3-Isobenzofuranodiona, 4-metil-
18	Estireno	60	Naftaleno, 1,7-dimetil-
19	2-Ciclopenten-1-ona, 2-metil-,	61	Naftaleno, 1,5-dimetil-
20	2,5-Furandiona, 3-metil-	62	Naftaleno, 2,6-dimetil-
21	2-Furancarboxaldeido, 5-metil-	63	1,4-Ciclohexanediona
22	2-Ciclopenten-1-one, 3-metil-	64	4-Metilfáltico anidrido
23	Fenol	65	1H-isoindole-1,3(2H)-diona
24	Benzeno, 1,2,4-trimetil-	66	Acetovanilona
25	Benzeno, 1,2,3-trimetil-	67	1H-isoindole-1,3(2H)-diona
26	Benzonitrila	68	Etanona, 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil
27	2,5-Furandiona, 3,4-dimetil-	69	Dibenzofurano
28	1H-pirazole, 3-metil-	70	9H-fluoreno
29	2,3-Dimetil-2-ciclopenten-1-one	71	Ácido benzoico, 4-hidroxi-3-metoxi-
30	2-Ciclopenten-1-one, 2,3-dimetil-	72	9H fluoreno-9-ol
31	Fenol, 2-metil-	73	1,1'-bifenil-2,3-diol
32	Fenol, 4-metil-	74	Benzaldeído, 4-hidroxi-3,5-dimetoxi
33	Fenol, 2-metoxi-	75	9H-Fluoreno, 1-metil-
34	1,3-pentadieno	76	Acetosiringona
35	Benzonitrila, 2-metil-	77	Antraceno
36	Benzonitrila, 4-metil-	78	Isobutil fitalato
37	Levoglucosano	79	Fenantreno
38	Benzofurano, 2-metil-	80	Xantona
39	Benzonitrila, 4-metil-	81	Anidrido 1,8-naftáltico
40	Fenol, 2,4-dimetil-	82	4- ácido metoxicinâmico
41	Fenol, 4-etil-	83	Ácido hexanodióico bis(2-etilhexil)
42	Fenol, 2-etil-		

\* números dos picos como mostrado nas Fig. 3 e 4.

Sainz-Jimenez & Leeuw (1987) relataram que os produtos de lignina podem ser coextraídos com AH ou podendo estar simplesmente ligado à estrutura destes, porém os mesmos não contribuíram significativamente para a parte mais resistente dos AH. Os autores concluíram também que o papel da lignina na formação das substâncias húmicas tem sido superestimado e, que biopolímeros alifáticos presente em cutículas e suberinas de plantas, podem sim representar os grupos mais importantes na estruturação dos AH. Os nossos resultados mostraram que para os AH na superfície do solo o núcleo estrutural estável foi preferencialmente constituído por compostos aromáticos, nitrogenados e fenólicos, respectivamente. Já os AH em subsuperfície constituíram-se em sua maioria de compostos aromáticos, nitrogenados e alifáticos, com exceção daqueles extraídos sob mata que mantiveram a mesma proporção dos da superfície. Evidenciamos assim que com a humificação houve aumento na proporção de compostos alifáticos na estrutura dos AH (Tabela 3).

**Tabela 3** – Porcentagens<sup>a</sup> relativas dos diferentes grupos de compostos identificados por dessorção e pirólise de ácidos húmicos extraídos de um Latossolo Húmico sob café, pasto e mata

Compostos	Café		Pasto		Mata	
	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise
	<b>0-10 cm</b>					
Alifáticos	3.34	1.76	7.46	3.99	22.49	2.10
Aromáticos	nd	38.11	14.26	42.5	19.52	42.94
Ácidos Graxos	nd	0.26	15.88	0.66	1.69	0.43
Lignina	5.63	2.73	16.73	5.97	nd	6.10
Compostos de N	nd	26.43	10.95	20.75	42.71	16.95
Poliaromáticos	nd	3.56	nd	3.48	0.80	4.87
Fenóis	nd	22.51	1.23	19.07	nd	10.76
Polissacarídeos	91.02	2.97	32.36	1.84	11.81	1.33
<b>B/E<sub>3</sub></b> <sup>b</sup>	-	0.25	-	0.18	-	0.22
	<b>60-100 cm</b>					
	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise
Alifáticos	66.08	9.79	24.63	5.82	8.00	3.30
Aromáticos	8.69	34.29	6.48	30.83	0.57	40.80
Ácidos Graxos	3.84	0.34	nd	0.78	nd	nd
Lignina		0.28	nd	0.35	nd	nd
Compostos de N	11.21	12.50	44.03	16.15	26.18	25.00
Poliaromáticos	1.22	2.78	6.45	2.42	nd	4.34
Fenóis	nd	1.89	nd	2.89	nd	6.03
Polissacarídeos	8.91	0.57	23.86	1.67	5.66	1.41
<b>B/E<sub>3</sub></b>		1.88		2.18		1.15

<sup>a</sup>) Resultados em % relativos da área integrada do cromatograma do íon total (TIC). Os valores que restam correspondem a SO<sub>2</sub>. dimetil ester e ácido acético, <sup>b</sup>) B/E<sub>3</sub> = razão entre as proporções de benzeno e tolueno no TIC.



O índice B/E<sub>3</sub> (Benzeno/Tolueno), faz referência ao grau de condensação dos anéis aromáticos, onde quanto maior o seu valor, maior será a humificação da MOS presente (Ceccanti et al., 1986). Assim, observamos aumento deste índice para AH extraídos na subsuperfície (60-100 cm), evidenciando núcleo estrutural com anéis aromáticos mais condensados que aqueles presentes na superfície do solo (Tabela 3). Apesar dos cromatogramas da pirólise dos AH extraídos entre 0-10 cm de profundidade sob mata, pastagem e café apresentarem certa similaridade (Fig. 2) observamos certa diferenciação em termos dos núcleos aromáticos presentes nestas amostras. Os AH sob café, apesar de apresentarem menores proporções de compostos aromáticos em superfície, são estes de características mais condensadas comparado aos de pastagem e mata. Em função do aumento na condensação dos anéis aromáticos dos AH sob pastagem acreditamos que, em nossas condições subtropicais, quanto menor o índice B/E<sub>3</sub> em AH mais intensamente será o processo que conduz à humificação destes ácidos.

A presença do composto *p*-4-vinilfenol na estrutura de AH extraídos de solo sob pastagem (Fig. 1 e 2) confirmam contribuição de lignina proveniente de gramíneas (Sainz - Jimenez & Leeuw, 1986). Por outro lado, na estrutura dos AF os compostos de lignina encontram-se mais fortemente ligados, ou seja, sendo assim termicamente mais estáveis (Tabela 4). A não detecção de ligninas em algumas amostras como, por exemplo, em pirolisados de AH extraídos sob mata (Tabela 3), não significa que as mesmas não possam estar presentes. Martín et al. (1994) alertou para o fato de que compostos de lignina podem sofrer reações de descarboxilação em condições de pirólise direta. Provavelmente, muitos dos compostos derivados de polifenóis também podem ser procedentes da degradação da lignina (reações de demetoxilação).

**Tabela 4** – Porcentagens relativas (\*) dos diferentes grupos de compostos identificados por dessorção e pirólise de ácidos fúlvicos extraídos de um Latossolo Húmico sob café, pasto e mata

Compostos	Café		Pasto		Mata	
	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise
0-10 cm						
Alifáticos	1.71	0.27	1.77	0.72	0.71	2.23
Aromáticos	8.20	25.61	16.28	31.38	4.88	28.81
Ácidos Graxos	nd	0.91	1.04	0.64	3.76	3.09
Lignina	nd	2.45	3.18	5.26	5.34	4.80
Compostos de N	7.28	5.63	2.44	9.94	52.23	12.10
Poliaromáticos	nd	12.28	2.92	4.96	nd	5.49
Fenóis	1.72	32.81	nd	28.99	2.07	27.60
Polissacarídeos	39.06	6.37	69.26	8.24	31.02	2.13
60-100 cm						
	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise	Dessorção	Pirólise
Alifáticos	4.51	2.01	7.80	1.03	1.07	1.46
Aromáticos	13.48	17.90	nd	27.36	1.36	9.08
Ácidos Graxos	5.06	1.09	2.25	1.40	0.84	1.59
Lignina	1.12	6.42	nd	4.31	nd	2.48
Compostos de N	0.56	7.99	nd	9.42	nd	15.34
Poliaromáticos	0.42	4.23	nd	8.45	nd	1.36
Fenóis	1.27	17.19	nd	19.93	nd	12.65
Polissacarídeos	74.05	6.28	89.95	8.60	96.72	7.21

(\*) Resultados em % relativos da área integrada do cromatograma do íon total (TIC). Os valores que restam correspondem a SO<sub>2</sub>, dimetil ester e ácido acético.

Consideráveis proporções de compostos nitrogenados foram detectadas na estrutura dos AH, principalmente para aqueles extraídos sob solo de mata natural (Tabela 2). De acordo com Stevenson (1994) as reações de condensação de quinonas se encontram favorecidas pela presença de compostos nitrogenados formando arilaminas e, que este mecanismo pode explicar a incorporação do N nas substâncias húmicas.

Para os AH extraídos entre 0-10 cm do solo sob café, não houve termoevaporação de compostos nitrogenados à 280°C (Tabela 3), revelando ausência de formas de N mais “disponíveis”, sendo em sua maioria fortemente ligados na estrutura desses ácidos, demonstrando pobreza no aporte de N em sistema convencional de cultivo com café. Por outro lado, AH extraídos da mata demonstraram ter consideráveis proporções desses compostos periféricamente adsorvidos na sua estrutura, principalmente na estrutura dos AF (Tabela 4). A Mata Atlântica em sua flora possui diversas espécies de leguminosas arbustivas e arbóreas que contribuem para a fixação biológica de N, favorecendo assim

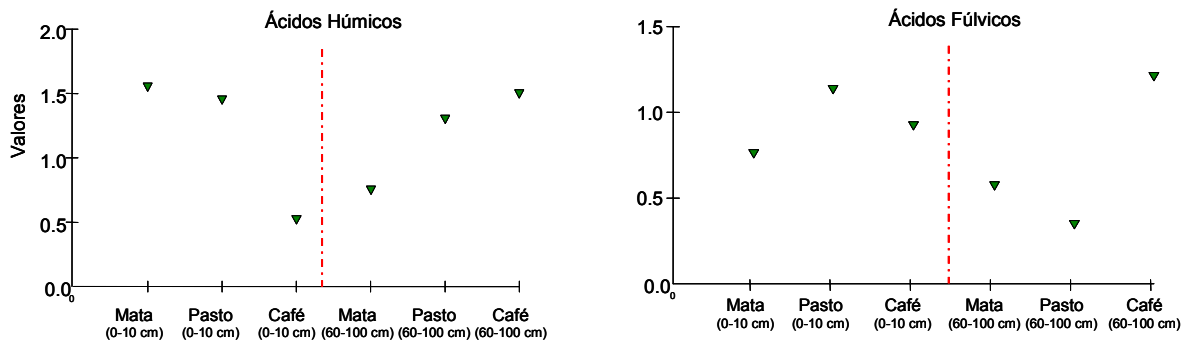
importantes aportes desse elemento no solo. Por outro lado, a diversidade da composição química presente na biomassa produzida e estocada como serapilheira em sistemas naturais, comparada à monocultura em sistemas de café, pode também ser responsável na maior contribuição em N nas estruturas humificadas da matéria orgânica deste solo. Surpreendentemente observamos aumento na proporção de compostos nitrogenados liberados por dessorção para os AH extraídos entre 60-100 cm dos solos cultivados (Tabela 3), concomitante à redução na proporção destes compostos na estrutura termoestável destes ácidos. Esse resultado indica a existência de perdas progressivas em compostos nitrogenados à medida que as substâncias húmicas evoluem no perfil do solo.

No geral, os compostos nitrogenados dos AH liberados por dessorção apresentaram maior diversidade estrutural, com mais de 77 tipos diferentes, sendo que por pirólise apenas 47 compostos nitrogenados foram identificados. Os compostos nitrogenados mais comuns foram as benzonitrilas, piridinas e derivados do pirrol. Para os AF, tanto por dessorção quanto por pirólise, foram identificados mais de 40 tipos de compostos nitrogenados (dados não mostrados), sendo os mais comuns piridinas, benzonitrilas, pirroles e isoindoles. A maior parte dos compostos nitrogenados presentes nos AH e AF extraídos do solo sob mata foi liberada por dessorção, fato que revela ligações mais fracas desses compostos na estrutura das SHs, podendo ser explicado por contribuições mais recentes. De acordo com Sainz-Jimenez & Leew (1985) grande parte dos compostos nitrogenados do solo são componentes estruturais dos microrganismos; assim, maiores proporções de N nas estruturas de SHs indicam contribuições da atividade microbiana do solo.

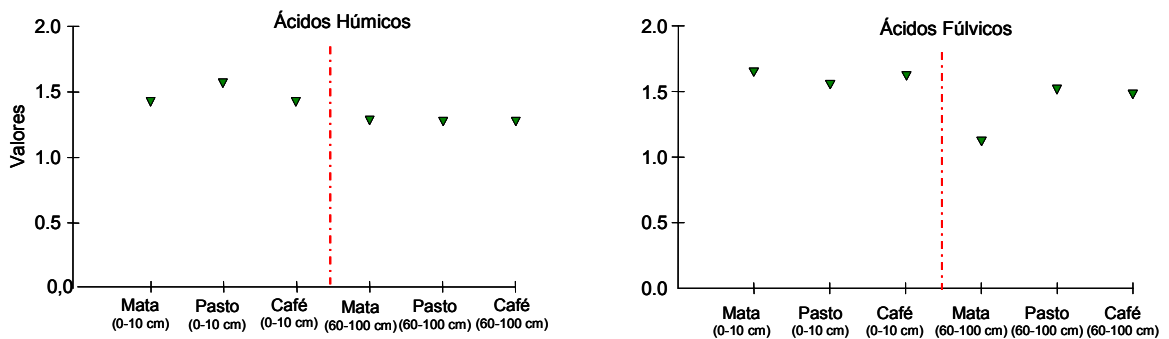
Os AH extraídos na superfície apresentaram maior proporção de compostos aromáticos, nitrogenados e de polifenóis, enquanto que aqueles extraídos entre 60-100 cm apresentaram em sua maioria compostos aromáticos, alifáticos e nitrogenados (Tabela 2). A maior aromaticidade destes AH corrobora com resultados encontrados por Assis et al. 2008, onde os autores, utilizando a técnica CP-MAS RMN de  $^{13}\text{C}$ , observaram 40% de aromaticidade em AH extraídos de Latossolos Húmicos.

A partir da análise dos 196 compostos produzidos na pirólise dos AH verificamos, por meio do índice de Shannon, maior diversidade estrutural naqueles extraídos da superfície do solo (Fig. 4).

## DESSORÇÃO



## PIRÓLISE



**Fig. 4** – Avaliação do índice de diversidade de Shannon para os compostos liberados por dessorção (280 °C) e pirólise (610 °C) de ácidos húmicos e fúlvicos extraídos a 0-10 e 60-100 cm de um Latossolo Vermelho-Amarelo húmico sob mata, pastagem e café.

Sob dessorção foram liberados 243 compostos diferentes, sendo que dentro dos diferentes sistemas de uso da terra a cafeicultura apresentou menor diversidade. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, sob cultivo convencional de café, há pouca diversidade na composição química da biomassa gerada, permanecendo assim herança química estrutural mais homogênea na matriz húmica. Por outro lado, observamos maior diversidade de compostos liberados da dessorção de AH sob mata e pastagem, respectivamente. A redução com a profundidade da diversidade estrutural dos produtos liberados por dessorção nos AH sob mata e pastagem pode ser resultado da rápida

biodegradação dos diferentes compostos anteriormente ligados à estrutura, em função da própria diversidade apresentada pelos mesmos.

#### **4 – CONCLUSÕES**

1) Ácidos húmicos e fúlvicos presentes na superfície do solo apresentam maior diversidade (riqueza estrutural) que aqueles extraídos em profundidade.

2) Substâncias húmicas extraídas do solo sob mata apresentam maior contribuição de estruturas nitrogenadas.

3) Superficialmente, o cultivo do solo promove redução de compostos alifáticos e nitrogenados na estrutura dos AH e; de compostos fenólicos, nitrogenados, de lignina e ácidos graxos na estrutura dos AF.

4) O uso com pastagem contribui efetivamente na incorporação de compostos de lignina na composição estrutural de ácidos húmicos e fúlvicos.

#### **5 - AGRADECIMENTOS**

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão da bolsa. Agradecemos também ao IRNAS/CSIC pelo auxílio na obtenção dos pirogramas.

#### **6 - REFERÊNCIAS CITADAS**

- Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J. 1987. Degradative studies on a soil humin fraction— Sequential degradation of inherited humin. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 513-520.
- Andreux, F.; Cerri.C.C. 1989. Current trends in the research on soil changes due to deforestation, burning and cultivation in the Brazilian tropics. *Toxicology Environmental Chemicals*, 20:275-283.
- Arias, M.E., Polvillo, O., Rodríguez, J., Hernández, M., Gonzalez-Perez, J.A., González-Vila, F.J., 2006. Termal transformations of pine Wood components Ander pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry conditions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 77: 63-67.

- Canellas, L.P.; Espindola, J. A.; Rezende, C.E.; Camargo, P.B.; Zandonadi, J.A.A.; Rumjanek, V.M.; Guerra, J.G.M.; Teixeira, M.G.; Braz-Filho, R. 2004. Organic matter quality in a soil cultivated with perennial herbaceous legumes. *Scientia Agrícola*, 61: 53-61.
- Canellas, L.P., Santos, G.A., Moraes, A.A., Rumjanek, V.M. 2000. Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos sólidos urbanos II. Métodos termodegradativos (pirólise acoplada à cromatografia gasosa-espectrometria de massas). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 751-757.
- Ceccanti, B., Alcaniz, J.M., Gispert, M., Gassiot, M., 1986. Characterization of organic matter from two different soils by pyrolysis-gas chromatography and isoelectrofocusing. *Soil Science* 142: 83-90.
- Gleixner, G.; Poirier, N.; Bol, R.; Balesdent, J. 2002. Molecular dynamics of organic matter in a cultivated soil. *Organic Geochemistry*, 33:357366.
- González-Vila, F.J., Amblès, A., del Río, J.C., Grasset, L., 2001. Characterization and differentiation of kerogens by pyrolytic and chemical degradation techniques. *Journal Analytical Applied. Pyrolysis* 59:315328.
- González-Pérez, J.A., Arbelo, C.D., Gonzalez-Vila, F.J. Rodriguez Rodriguez, A. Almendros, G. Armas, C.M., Polvillo, O. 2007. Molecular features of organic matter in diagnostic horizons from andosols as seen by analytical pyrolysis. *Journal Analytical Applied. Pyrolysis*, 80: 369-382.
- Hayes, M. H. B. 1991. Concepts of the origins, composition, and structures of humic substances. En: *Advances in Soil Organic Matter Research: The Impact on Agriculture and the Environment* (Wilson, W. S., ed.). The Royal Society of Chemistry: Cambridge, p.3-22.
- Ker, J. C., 1999. Latossolos do Brasil: uma revisão. *Genomos* 5, 17-40.
- Marinari, S., Liburdi, K., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S., 2007. Humification-mineralization pyrolytic indices and carbon fractions of soil under organic and conventional management in central Italy. *Soil & Tillage Research*, 92: 10-17.
- Quénéa, K., Derenne, S., González-Vila, F.J., González-Pérez, J.A., Mariotti, A., Largeau, C. 2006. Double-shot pyrolysis of the non-hydrolysable organic fraction isolated from a

- sandy forest soil (Landes de Gascogne, South-West France): Comparison with classical Curie point pyrolysis. *Journal of Analytical Applied and Pyrolysis*, 76: 271-279.
- Nierop, K.G.; Pulleman, M.M.; Marinissen, J.C.Y. 2001. Management induced organic matter differentiation in grassland and arable soil: a study using pyrolysis techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 755-764.
- Saiz-Jiménez, C., de Leeuw, J.W., 1987. Chemical structure of soil humic acid as revealed by analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 11: 367-376.
- Saiz-Jiménez, C., de Leeuw, J.W., 1985. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of soil polysaccharides, soil fulvic acids and polymaleic acid. *Organic Geochemistry*, 6:287-293.
- Sanger, L.J., Anderson, J.M., Little, D., Bolger, T., 1997. Phenolic and carbohydrate signatures of organic matter in soils developed under grass and forest plantations following changes in land use. *European Journal of Soil Science* 48, 311–317.
- Schulten, H.R.; Schnitzer, M. 1992. Structural studies on soil humic acids by Curie-Point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Soil Science*, 153: 205-224.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley. 496p.
- Swift, R.S., 1996. Organic matter characterization. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. SSSA Book Series No. 5. SSSA and ASA, Madison, WI., pp. 1011–1069.
- Resende, M.; Curi, N.; Rezende, S.B. & Corrêa, G.F. 2002. *Pedologia: base para distinção de ambientes*. 4<sup>a</sup> edição, Viçosa: NEPUT, 338p.
- Ribeiro, A. C.; Resende, M.; Fernandes, B. 1972. Latossolos com horizonte subsuperficial escurecido na região de Viçosa. *Revista Ceres*, 19:280:298.
- Martín, F., del Río, J.C., González-Vila, F.J., Verdejo, T. 1995. Pyrolysis derivatization of humic substances. II. Pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAHS). *J. Anal. App Pyrol.*31:75-83
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Gallardo-Lancho, J.F., 1998. Organic matter properties in cultivated versus set-aside arable soils. *Agric. Ecol. Environ.* 67: 267-274.

- MacCallister, D.L.; Chien, W.L. 2000. Organic carbon quality and forms as influenced by tillage and cropping sequence. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 31:465-479.
- Odum, E.P. *Ecologia*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1983. 434p.
- van Heemst, J.D.H., van Bergen, P.F., Stankiewicz, B.A., de Leeuw, J.W., 1999. Multiple sources of alkylphenols produced upon pyrolysis of DOM, POM and recent sediments. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 52, 239–256.



### **III- Content and molecular composition of total lipids extracts under pasture and coffee land use in a subtropical humic Latosol**

#### **ABSTRACT**

Soil organic matter (SOM) of a humic Latosol has been characterized by analyzing litter and soil lipids composition under different vegetal covers (coffee, pasture and fragment of native forest). Soil samples were collected from each site at two depths (0-10 and 60-100 cm), as well as litter samples. Important biomarkers referring to the cover vegetation were identified in the lipid extracts from topsoil layers (0-10 cm). The results showed the predominantly aliphatic character for all the lipid extracts. Clear differences in lipid composition were found between the topsoil and subsurface. Long chain alkylic compounds (alkanes and fatty acids) accumulated preferably between 60-100 cm. On the surface, the soil from natural vegetation had higher total lipid than cultivated soils, also showing predominance of unsaturated fatty acids between 60-100 cm. There was greater preservation of short-chain alkanes with depth under forest and pasture, demonstrating a higher conservation in these systems of land use. The study of lipid composition from soils under different uses provides important indicators of land use impact, which can be used as indicators of the sustainability of tropical agriculture.

**Keywords:** soil lipid, n- fatty acids, land use, tropical soil, grass, coffee.

**RESUMO: Teor e composição molecular de lipídios totais extraídos de um Latossolo húmico cultivado com café e pastagem**

A matéria orgânica do solo (MOS) de um Latossolo húmico sob café, pastagem e fragmento de mata nativa foi caracterizada através da análise da composição lipídica do litter e do solo, sob diferentes coberturas vegetais (café, pastagem e fragmento de mata nativa). Sob cada cobertura foram coletadas amostras de solo na camada entre 0-10 e 60-100 cm, bem como amostras da serapilheira. Foram identificados importantes biomarcadores referentes à vegetação de cobertura nos extratos lipídicos do solo na camada entre 0-10 cm. Os resultados indicaram predominância de caráter alifático para todos os extratos lipídicos. Observou-se clara diferenciação entre a composição lipídica na superfície e subsuperfície do solo. Compostos alquílicos de cadeia longa (alcanos e ácidos graxos) acumularam preferencialmente entre 60-100 cm. Em superfície, o solo sob vegetação natural apresentou maior teor de lipídios totais que solos cultivados, apresentando também predomínio de ácidos graxos insaturados entre 60-100 cm. Sob cobertura de mata e pastagem, houve maior preservação de alcanos de cadeia curta em profundidade, demonstrando maior conservação nestes sistemas de uso da terra. O estudo da composição lipídica de solos sob diferentes usos fornece importantes indicadores do impacto do uso da terra podendo atuar como indicadores da sustentabilidade agrícola tropical.

## 1. INTRODUCTION

The influence of soil management systems on the contents and quality of soil organic matter (SOM), and consequently on the soil properties and its ability to promote carbon stabilization (sequestration), is a research subject of major interest concerning subtropical Brazilian soils. The general pattern of land use in the Zona da Mata Mineira zone in Minas Gerais, Brazil, is coffee (*Coffea arabica*) cropping and pastures of molasses grass (*Melinis minutiflora*) (Resende *et al.*, 2002). Most of these cultivated areas are supported by humic Latosols in reason of their great friability, permeability and water retention capacity (Ker, 1999). Furthermore, these clay reddish-orange soils are characterized by the presence of darker A horizon (7,5YR 3/4, wet) with enrichment the humic fractions observable at depth of 60 cm or more (7,5YR 3/2, wet). This chromatic differentiation can be consequence of pedogenetic process involving the different SOM forms (high C contents) in the A horizon of humic Latosols, were different lipid compounds can be trapped with the humic matrix of these soils (Schulten & Schnitzer, 1990).

The composition of the total lipid extracts (TLEs) oil lipid fraction in both, topsoil and subsoil layers, may provide additional information through the study of the compounds with value as biomarkers for SOM sources and diagenesis products in the soil profile (Schulten & Schnitzer, 1990; Van Bergen *et al.*, 1997; Quenea *et al.* 2004; Almendros *et al.*, 2001, Jandl *et al.*, 2007 ). Zelles *et al.* (1995) observed differences between fatty acids in grassland and cultivated soils when monounsaturated fatty acid fraction was accounted for, showing that is possible to evaluate changes in the land use through soil lipid composition.

Among the different SOM fractions, it is nowadays recognized that lipids play a key role in important biogeochemical soil processes, and also in the relationship between plants and their ecological environments (Amblés *et al.*, 1989; Quenea *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2006; Wiesenberg *et al.*, 2006). There is a growing interest in the determination of biology indicators which can be used to assess the land use impact of agricultural soils. Furthermore, the TLEs can inform about recent changes in the trophic system structure.

Thus, as an example, the soil lipid composition at the top layers in different agrosystems, may reflect the direct impact of the soil use mainly related to the influence of the plant litter or the entrance or preservation of organic contaminants. On the other hand, a selective preservation of lipid compounds may influence the humic matrix dynamic, since it has been proved the occurrence of hydrophobic interaction between lipids and humic acids (Schintzer & Neyroud, 1975).

Actually, literature data concerning the molecular composition of total free lipid in tropical soil are scarce, as far as we are aware. In this paper we studied TLEs with the objective of: a) to assess the variations in the litter and soil lipids composition influenced by cultivation with coffee and pasture and; b) to evaluate differences of lipid composition between topsoil and subsoil in the humifield A horizon.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1. Agroecologic characteristics of the area***

The study was done in the Atlantic Forest Biome region at “Zona da Mata Mineira”, Southeast Brazil, located at 20°28’26’’ S and 42°28’55’’ W, at an average altitude of 712 m above sea level. The typical climate of the region is Cwb (Koppen classification), temperate climate with rainy summers and dry winters. The mean annual rainfall and temperature are 1300 mm and 18 °C, respectively. According to the classification system of the Brazilian Foundation Institute of Geography and Statistics, the vegetation in the area can be classified as a Mountain Semi-deciduous Mesophytic forest (Semi-deciduous tropical forest) with emergent canopy (*Fme*) (IBGE, 1993).

The studied soil was a Red Yellow humic Latosol (Typic Hapludox), clayey, dystrophic and acid, with high content of exchangeable aluminium and organic matter. These soils are derived from migmatites rocks and are typical in the higher altitude areas.

The selected area for this work follows the typical pattern of land use in the Zona da Mata Mineira. The standard farming exploration when established at the beginning of the settling caused continuous deforestation; the native tropical forest were substituted by cultures that would come to be traditional in the region (coffee plantations and for other

farming and pastures). For this study three sites with the typical pattern of land use (coffee, pasture and forest) under the same taxonomic soil units and slope were sampled.

The soil under coffee has been cultivated for the last 12 years and the fertilization management consists in the addition of NPK (25-10-20) fertilizer twice a year and limed every two years. Before the coffee was established, the site was under spontaneous pasture (*Melinis minutiflora*) during 40 years. The pasture site was established in the 1940s after slashing and burning the forest but after a livestock crisis with low inputs in the 1960s, great part of this area was converted to coffee plantation. In the region the major area that once was devoted to pastures is nowadays degraded and farmers keep only the clean areas for cattle grazing, without much expenditure for maintenance. The molasses grass (*Melinis minutiflora*) is the predominant grass in the pasture. The generalized occurrence of this grass is indicative of low productive acid soils. For comparative purposes, soil samples under the native forest ecosystem were also sampled and studied.

## **2.2. Sampling and analysis**

Soil sampling was carried out at the beginning of the wet season in 2005. Composite soil samples were taken from two depth in the A horizon at 0-10 and 60-100 cm twenty sub-samples were collected in an area of approximately 100 m<sup>2</sup> and mixed to form a single composite sample. The samples were air dried and sieved to fine earth (< 2 mm). Sub-samples were taken for chemical and physical analysis. The main physico-chemical characteristics of the soils are in Table 1.

**Table 1**

Average values for physico-chemical characteristics of two layers of the A horizon of the studied humic Latosol under coffee, pasture and natural forest.

Depth (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	CEC <sup>a</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	TOC <sup>c</sup>	TN <sup>d</sup>	BD <sup>e</sup>	Sand	Silt	Clay
		-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----				-----%-----		g cm <sup>-3</sup>		-----%-----		
<b>Coffee</b>												
0-10	5.1	0.53	2.10	12.40	1.33	12.40	3.34	0.26	0.94	33	11	56
60-100	4.8	0.03	0.23	11.24	1.40	11.24	2.77	0.15	0.85			
<b>Pasture</b>												
0-10	4.9	nd <sup>f</sup>	0.53	12.60	1.40	12.60	3.55	0.26	0.96	29	7	64
60-100	5.1	nd	0.13	11.03	0.73	11.03	3.03	0.18	0.80			
<b>Forest</b>												
0-10	4.8	nd	0.06	11.70	0.10	11.55	2.61	0.27	1.05	33	11	56
60-100	5.0	nd	nd	10.24	1.20	10.23	2.67	0.21	0.86			

<sup>a</sup> Cation exchange capacity (pH 7.0); <sup>b</sup> H+Al = potential acidity; <sup>c</sup> TOC = total organic carbon; <sup>d</sup> TN = total nitrogen; <sup>e</sup> BD = Bulk density; <sup>f</sup> no detected.

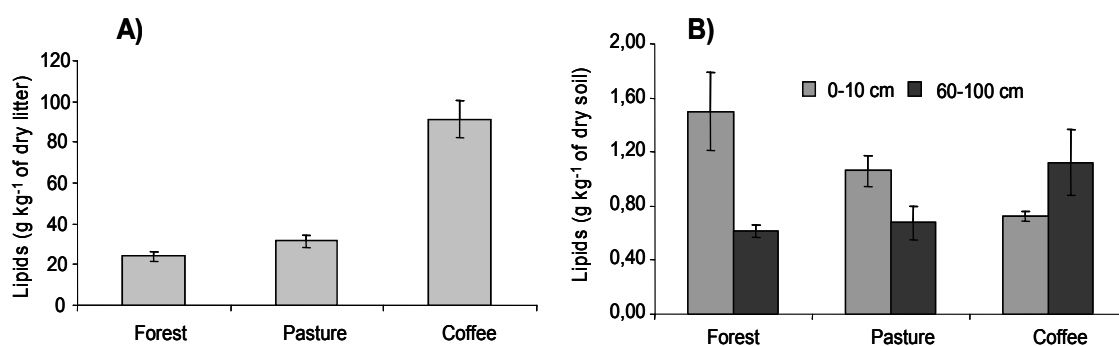
Leaf litter samples were collected from the soil surface in all sites. For litter sampling, a 0.25 m<sup>2</sup> (0.5 x 0.5 m) metallic platform was used and four sub-samples collected in an area of *circa* 100 m<sup>2</sup>. The samples were thoroughly mixed to compose a single sample, dried at 40 °C in an oven, milled and weighed. Litter (2 g) and soil (20 g) lipids were Soxhlet-extracted at approximately 70 °C for 16 h, using 200 ml of the mixture dichloromethane/methanol (3:1 v/v) (van Bergen *et al.*, 1997).

The free lipids were methylated with trimethylsilyldiazomethane and silylated with *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) before analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Hewlett-Packard 5730A). Separation of lipids compounds was achieved using a SE-52 fused silica capillary column (30m x 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 µm). The column oven temperature was programmed to increase from 40 to 100 °C at 30 °C min<sup>-1</sup> and then to 300 °C at 6 °C min<sup>-1</sup>. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. Mass spectra were measured at 70 eV ionizing energy. Individual compounds were identified by inspecting mass fragments, by key single ion monitoring (SIM) for the different homologous series, by low resolution mass spectrometry and by comparison with published mass spectra and computerized libraries (NIST and Wiley).

Total lipid content was gravimetrically estimated and referred as percentages of dry soil. For the compound abundance we established the distribution patterns on the basis of the relative abundance of the compounds in the chromatograms.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The total amounts of extractable lipids (TLE) was higher in the coffee litter in comparison when compared with pasture and forest (Fig. 1-A). Although extractable lipids content was low under forest, this was higher than those found for the cultivated soils (Fig. 1-B). A higher lipid proportion in the deeper layers in soils under coffee could indicate that an important part of lipids from the litter are easily lixiviated along the soil profile, then they are not totally hydrophobic. (Nierop et al., 2005). It is also possible that at the deeper layer the coffee roots exudates higher amounts of lipid compounds than those occurring under forest or pasture.



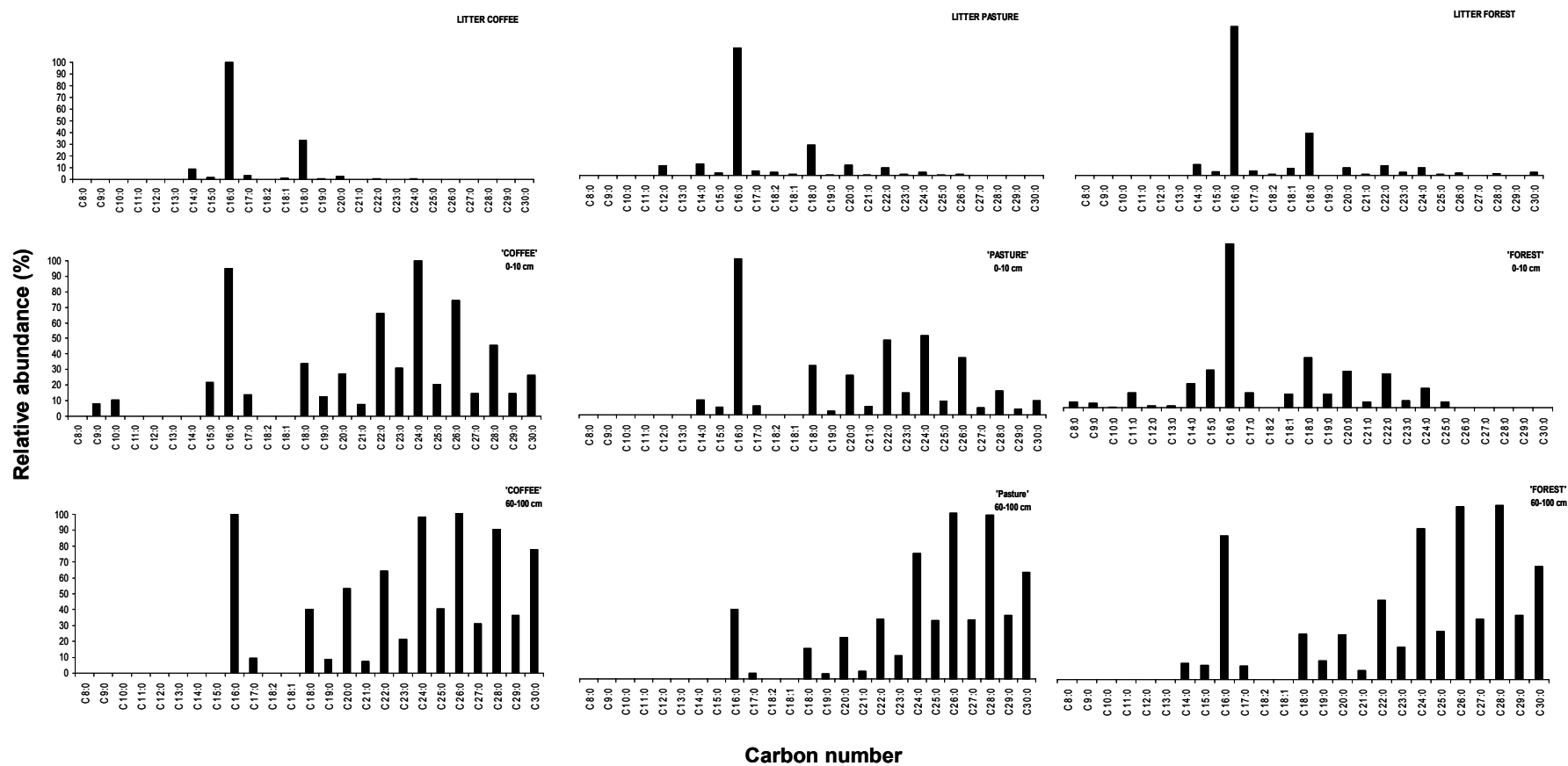
**Fig. 1.** Total lipid extracts from litter (A) and topsoil and subsoil (B) from humic Latosol under coffee and pasture land use.

The lowest values found for the forest litter indicate that higher preservation of lipids is observed in the soil profile. Thus, our results suggest that litter under forest effectively contributes to topsoil lipid content when compared to pasture and coffee uses.

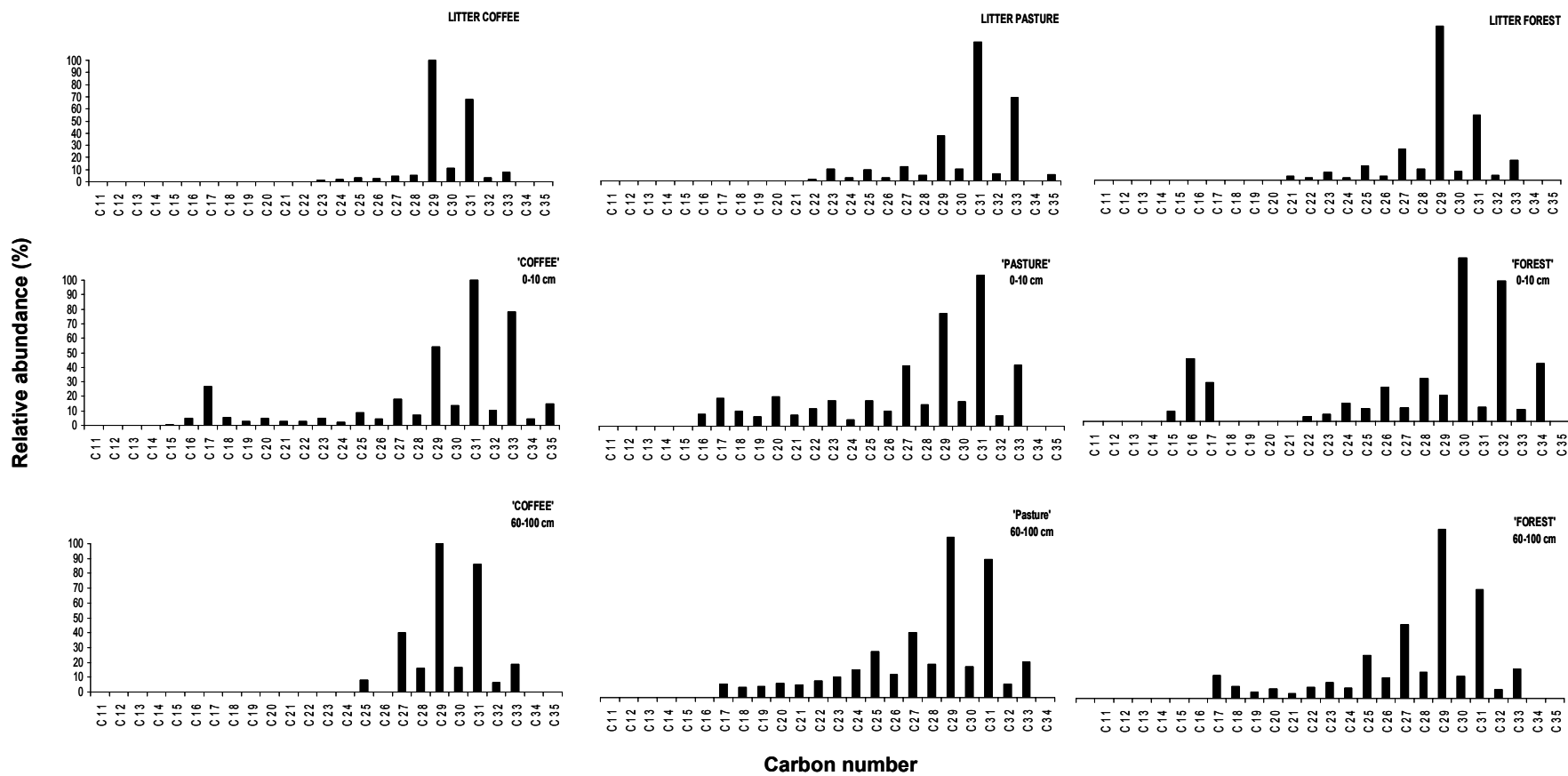
Overall, saturated fatty acids were the most abundant class of compounds in the lipid soil fraction, with a dominance of long-chain over short chain compounds (Fig. 2). This result seems to be a general soil characteristic (Amblés *et al.*, 1989; Bull *et al.*, 1998;

Marseille *et al.*, 1999; Chefetz *et al.*, 2002, Jandl *et al.*, 2004; Quenea *et al.*, 2004), and confirmed the predominantly aliphatic character of the extracts. Homologous series of saturated fatty acids from C<sub>8</sub> (octanoic acid) to C<sub>30</sub> (triacontanoic acid) with a predominance of even numbered C-chain lengths were observed both in the litter and soil extracts. Similar values were previously reported by Jandl *et al.* (2005) for Ap horizon of a Phaeozem with long-term cropping of rye and maize. The most abundant fatty acids present in the samples were C<sub>16</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> and C<sub>28</sub>. The chromatograms of the extracts from litter showed maxima at C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub> and, the presence of these in the upper soil layer (0-10 cm) is indicative of a direct contribution from the above vegetation (litter) to the soil lipidic composition (Fig. 2). Unsaturated C<sub>18:1</sub> and C<sub>18:2</sub> fatty acids were only observed in litter samples and soil samples under forest (0-10 cm) that may be indicative of a lower degradation rate. In fact, these aliphatic biopolymers can selectively be preserved in the soil with little or no alteration (Almendros *et al.*, 1996). Short chain (C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub>) fatty acids were observed both in the litter and the surface soil layers (0-10 cm). The occurrence of short chain alcanoic acids in the 60-100cm depth under forest suggests higher microbial activity under this land use system once, the presence of these compounds, generally considered as bacterial markers (Meyers & Ishiwatari, 1993).





**Fig. 2.** Relative distributions of carboxylic acids extracted from litter and soils analysed, normalized to the most abundant compound.



**Fig. 3.** Relative distributions of *n*-alkanes extracted from litter and soils analysed, normalized to the most abundant compound

In contrast with the litter lipid composition the soil fatty acids presents a bimodal distribution in the range C<sub>18</sub> - C<sub>30</sub>, which is more evident in the deeper layers (60-100 cm). Thus, there was higher long chain fatty acids content in the 60-100cm depth and those are typical biomarkers of higher plants (Kolattukudy 1980). According to Nierop et al. (2005), alcanoic acids in soils may originate from a) plants and/or insects, once bacteria and fungi preferentially produce short chain fatty acids; b) oxidation of long chain alcohols, and; c) leaching down the soil profile.

The increase in total lipid contents in the soil under coffee at 60-100 cm depth (Fig. 1-B), may be a consequence of increase in lipid compounds of longer chain length (Figs. 2 and 3).

The distribution of the n-alkanes was determined by selective detection of the m/z=71. This compounds constitute a vastly complex mixture whose distribution pattern from C<sub>14</sub> – C<sub>35</sub> (Fig.3). In soil samples, at 0-10 cm, the distribution of n-alkanes is bimodal with maxima at C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub> and C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>. The long chain compounds in the C<sub>23</sub>-C<sub>35</sub> range exhibit an odd-over-even C number. This pattern distribution has been previously found in soils (Amblès et al., 1989; Bull et al., 1998). The predominance of the long chain n-alkanes odd-carbon-numbered indicate a typical contribution from higher plant waxes and, the short chain C-compounds are commonly used as bacterial biomarkers (Moucawi et al., 1981; Amblès et al., 1989; Tan 2003). Several authors have frequently used the alcanoic acids C<sub>15:0</sub> and C<sub>17:0</sub> as biomarkers for soil bacteria (Tunlid and White, 1992; Vestal and White, 1989; Zelles et al., 1995). This way, it is possible to observe that, in both depths of 0-10 cm and 60-100 cm, there is higher bacterial activity in the soil profile under forest when compared to tillage systems (Fig 2). This suggests there may be differences in the microbial community composition when soil use changes.

The differences in the n-fatty acids and n-alkanes distributions in relation to the different soil uses (mainly at 0-10 cm) (Figs. 2 and 3), indicates that variations in soil lipidic composition is associated to vegetation type. In lipids extracted the forest and coffee litter, we observed that C<sub>29</sub> and C<sub>31</sub> were predominant while C<sub>31</sub> and C<sub>33</sub> compounds dominated pastures. The C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> and C<sub>33</sub> distribution along the soil profile evidence a clear vegetation (litter) contribution concerning n-alkanes. In the soil under pasture a higher contribution of the homologue C<sub>31</sub> is observed, whereas in the soil under coffee the C<sub>29</sub> is more abundant. The dominance C<sub>31</sub> n-alkanes observed (at 0-10 cm) is indicative of an important contribution by (grass) roots (Naafs et al., 2004). However, there is the possibility that n-alkanes compounds at 60-100cm depth in soil under pastures does not

originate directly from present grass vegetation but from previous (40-50 years ago) forest cover. Our data also suggest that in the most conservative systems like pasture and forest there is a major preservation of shorter chain *n*-alkanes with depth (Fig.3). As a result, the *n*-alkanes distribution in the less altered systems is indicated by a better preservation of compounds derived from microbial degradation.

In Fig. 2 we observe a higher contribution of C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:0</sub> saturated alkanolic acids from the litters. The soil under forest presented higher proportion of unsaturated alkanolic acids as compared to soils under pasture and coffee (Table 2).

**Table 2**

Semi-quantitative analysis of main compounds of soil and litter lipids extractable of humic Latosol under coffee, pasture and natural forest. (percentage of total peak area of the chromatogram)

Compounds	Coffee			Pasture			Forest		
	Litter	0-10 <sup>a</sup>	60-100 <sup>a</sup>	Litter	0-10 <sup>a</sup>	60-100 <sup>a</sup>	Litter	0-10	60-100
Saturated <i>n</i> -alkanoic acids	66.36	64.20	51.45	59.31	49.14	56.43	33.45	65.63	63.91
Unsaturated alkanolic acids	11.42	1.85	1.51	29.74	8.45	0.71	15.50	15.65	4.48
<i>n</i> -Alkanols	2.99	4.21	9.26	0.97	6.22	4.23	2.53	2.51	5.65
<i>n</i> -Alkanes	3.74	3.27	14.07	3.03	2.88	15.04	31.61	2.31	7.17
Aldehydes	3.36	1.09	1.58	-	2.80	0.88	0.40	0.06	3.27
Ketones	1.94	-	3.44	1.87	0.21	1.66	0.39	0.47	2.64
Other Compounds	10.19	27.24	18.69	5.08	30.30	21.05	16.12	13.37	12.88
<i>n</i> -alkanoic C <sub>20+</sub> / C <sub>20-</sub>	0.04	1.20	C <sub>20+</sub> / nd	0.07	0.10	3.40	0.12	0.37	2.30
<i>n</i> -alkanes C <sub>20+</sub> / C <sub>20-</sub>	C <sub>20+</sub> / nd <sup>b</sup>	7.20	C <sub>20+</sub> / nd	C <sub>20+</sub> / nd	4.10	10.76	C <sub>20+</sub> / nd	1.90	10.00

<sup>a</sup> Depth in cm; <sup>b</sup> no detected.

The forest litter displayed a narrower proportion between saturated and unsaturated alkanolic acids, probably due to characteristics and biodiversity of plants in natural environments. Under pasture we observed a similar behavior, which may be explained by the characteristic of the gramineae *Melinis minutiflora* or well by occurrence of invasive plants in the degraded pastures. Although litter under pasture unsaturated alkanolic acids in a similar proportion to that observed under forest, we did not find an effective contribution of these compounds to the content in soil, that means that under forest there was a better preservation of this compounds originated from litter, even at 60-100cm depth. On the other hand, the litter from *Coffea arabica* was characterized by higher proportions (66.36%) of saturated alkanolic acids relative to the unsaturated compounds (11.42%) (Table 2)

The lower ratio of long-chain vs short-chain fatty acids (Table 2) with depth is explained by the occurrence of a selective degradation of short chain homologous (Tan,

2003; Jandl *et al.*, 2005). The increase in this ratio reflect differential contributions of higher plant acids (Quenea *et al.*, 2004) whereas the accumulation of long-chain compounds in depth 60-100 cm (Fig. 2 and Fig. 3) can be attributed to pedogenetics processes.

The silylated lipid fractions reveal the presence of n-alkanols in the samples from litter and soil (Table 2), and their accumulation in depth. These n-alkanols are present in epicuticular waxes and commonly observed in soil lipids (van Bergen *et al.*, 1997; Quenea *et al.*, 2004). In the case of soil under *M. minutiflora*, we observed considerable contribution from superficial root system in the accumulation of n-alkanols at 0-10 depth. The deepest root system of coffee, similar to that of forest trees, contributed to the building of those compounds at 60-100cm depth. It is observed that in the soil under forest the distribution is more homogeneous being indicative of a more stable biogeochemical cycle.

The increase in free ketones at 60-100cm may indicate transport of these compounds down the soil profile. This behavior was also observed for n-alkanes (Table 2). Thus, we observed that n-alkanes and ketones are considerably mobile in these humic Latosols. Nevertheless, these ketones can be considered as humification products but a mechanism responsible for their formation has not yet been elucidated (Quenea *et al.*, 2004).

#### **4. CONCLUSIONS**

The lipid data obtained provide new detailed molecular insights into the no-humified SOM the humic Latosols. The differences in lipids content and composition between the forest, pasture and coffee can be ascribed to differences input of fresh organic materials. The incorporation of stable long-chain compounds in depth was indicated by lipid analysis, highlighting the importance of aliphatic biopolymers in the bulk structure of soil organic matter. This process suggested occurrence of selective preservation of such molecules during humification, mainly as non-humified alkylic material (waxes). Qualitative changes in free lipid assemblages were also observed under different land uses were, in the most conservative systems like pasture and forest there is a major preservation of shorter chain *n*-alkanes with depth.

#### **5. ACKNOWLEDGEMENTS**

This work has been financed in part by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and The State of Minas Gerais Research Foundation

(FAPEMIG), Brazil. We would also like to express our thanks to Trinidad Verdejo (IRNAS-CSIC) for an excellent technical assistance.

## 6. REFERENCES

- Almendros, G., M.E. Guadalix, F.J. Gonzalez-Villa, Martin, F., 1996. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humin. *Organic Geochemistry* 24, 651–659.
- Almendros, G., Tinoco, P., González-Vila, F.J., Lüdemann, H.D., Sáenz, J., Velasco, F., 2001.  $^{13}\text{C}$ -NMR of forest soil lipids. *Soil Science* 166, 186-196.
- Ambès, A., Magnoux, P., Jambu, P., Jacquesy, R., Fustec, E., 1989. Effects of addition of bentonite on the hydrocarbon fraction of a podzol soil (A1) horizon. *Journal of Soil Science* 40, 685-694.
- Bull, I.D., van Bergen, P.F., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments-II. Soils from the Hoosfield Spring barley experiment treated with different quantities of manure. *Organic Geochemistry* 28, 11–26.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshumukh, A.P., Hatcher, P.G., Chen, Y., 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Science Society of America Journal* 66, 129-141.
- Chen, J., Ferris, H., Scow, K.M., Graham, K.J., 2001. Fatty acid composition and dynamics of selected fungal-feeding nematodes and fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 130, 135–144.
- Jandl, G., Leinweber, P., Schulten, H., Eusterhues, K., 2004. The concentrations of fatty acids in organo-mineral particle-size fractions of a Chernozem. *European Journal of Soil Science* 55, 459–469.
- Jandl, G.; Leinweber, P., Schulten, H. R., Ekschmitt, K., 2005. Contribution of primary organic matter to the fatty acid pool in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 1033-1041.
- Jandl, G., Leinweber, P., Schulten H. R., 2007. Origin and fate of soil lipids in a Phaeozem under rye and maize monoculture in Central Germany. *Biology Fertility Soils* 43, 321-332.
- Jansen, B., Nierop, K.G.J., Hageman, J.A., Cleef, A.M., Verstraten, J.M., 2006. The straight-chain lipid biomarker composition of plant species responsible for the dominant biomass production along two altitudinal transects in the Ecuadorian Andes. *Organic Geochemistry* 37, 1514-1536.

- Ker, J. C., 1999. Latossolos do Brasil: uma revisão. *Genomos* 5, 17-40.
- Kolattukudy, P.E., 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208, 990–1000.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1993. **Mapa de vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro. (Map). <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/>
- Marseille, F., Disnar, J.R., Guillet, B., Noack, Y., 1999. n-Alkanes and free fatty acids in humus and A1 horizons of soils under beech, spruce and grass in the Massif-Central (Mont-Lozère), France. *European Journal of Soil Science* 50, 433–441.
- Meyers, P.A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine organic geochemistry – an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 20, 867–900.
- Moucawi, J., Fustec, E., Jambu, P. 1981. Decomposition of lipids in soils: free and esterified fatty acids, alcohols and ketones. *Soil Biology & Biochemistry*, 13: 461- 468.
- Naafs, D.F.W., van Bergen, P.F., Boogert, S.J., Leeuw, J.W., 2004. Solvent-extractable lipids in an acid andic forest soil; variations with depth and season. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 297-308.
- Nierop, K.G.J., Naafs, D.F.W., van Bergen, P.F. 2005. Origin, occurrence and fate of extractable lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Organic Geochemistry*, 36:555-566.
- Moucawi, J., Fustec, E., Jambu, P., Amblès, A. and Jacquesy, R., 1981. Bio-oxidation of added and natural hydrocarbons in soils: effect of iron. *Soil Biology and Biochemistry* 13, 335-342.
- Quenea, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2004. Variation in lipid relative abundance and composition among different particle size fractions of a forest soil. *Organic Geochemistry* 35, 1355-1370.
- Schintzer, M., Neyroun, J. 1975. Alkanes and fatty acids in humic substances. *Fuel*, 54:17-19.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M., 1990. Aliphatics in soil organic matter in fine-clay fractions. *Soil Science Society American Journal* 54, 98–105.
- Tan, K.H., 2003. *Humic matter in soil and environment*, Marcel Dekker, New York.
- van Bergen, P.F., Bull, I.D., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1997. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Organic Geochemistry* 26, 117–135.

- Resende, M., Lani, J.L.; Rezende, S.B., 2002. Pedossistemas da Mata Atlântica: considerações pertinentes sobre a sustentabilidade. *Revista Árvore*, **26**: 261-269.
- Tan, H.K. 2003. *Humic Matter in Soil and the Environment – Principles and Controversies*. Marcel Dekker, New York.
- Tunlid, A., White, D.C., 1992. Biochemical analysis of biomass community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In: Stotzky, D. G., Bollag, J.M. (Eds), *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, INC New York, pp. 229-262.
- Vestal, J.R., White, D.C., 1989. Lipid analysis in microbial ecology. *Bioscience* 39, 535-541.
- Weisenber, G.L.B., Schwark, L., 2006. Carboxylic acid distribution patterns of temperate C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> crops. *Organic Geochemistry* 37, 1973-1982.
- Zelles, L., Rackwitz, Q.Y. Bai, Beck, T., Beese, F., 1995. Discrimination of microbial diversity by fatty acid profiles of phospholipids and lipopolysaccharides in differently cultivated soils. In: Collins, H.P., Robertson, G.P., Klug, M.J. (Eds.), *The significance and regulation of soil biodiversity*. Kluwer Academic Publishers, pp. 115-122.



## **IV - Influência da Correção da Acidez, Adubação Fosfatada e Adição de Sacarose na Matéria Orgânica de um Latossolo Vermelho-Amarelo Húmico**

### **RESUMO**

O uso agrícola dos Latossolos Húmicos na região da Zona da Mata Mineira, principalmente com a cafeicultura, tem levantado a hipótese de que a matéria orgânica humificada possa apresentar perdas em função das práticas agrícolas adotadas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento da matéria orgânica do solo quando da aplicação de calagem, adubação fosfatada e adição de fonte de carbono lábil (sacarose). O solo estudado foi um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico húmico da região de Sericita-MG, sendo o experimento conduzido em laboratório com temperatura controlada a 25°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema fatorial 5x2x2, sendo cinco níveis de calagem (0; 0,5; 1; 2 e 3 vezes a quantidade necessária para elevar a saturação de bases do solo a 60%), dois níveis de adubação fosfatada (com e sem, na forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e dois níveis de aplicação de uma fonte de C lábil (com e sem, na forma de sacarose). Curvas de respiração foram estabelecidas a partir das quantidades acumuladas de C-CO<sub>2</sub> liberado durante 136 dias e ajustadas ao modelo de cinética de primeira ordem. Após o período de incubação foram avaliados o C total do solo e das frações humificadas (humina, húmico e fúlvico). A produção total de C-CO<sub>2</sub> acumulado no tempo foi afetada positivamente pela presença de sacarose. A fração fúlvica do solo tendeu a aumentar com a adição de C-lábil e reduzir com a presença de fosfato. Observou-se também, com a calagem, redução do C da fração ácido húmico, e incremento no C da fração humina. Os resultados indicam que práticas agrícolas como calagem, adubações fosfatadas e adições de resíduos na forma de C-lábil alteram a dinâmica do C da matéria orgânica de Latossolos húmicos.

**Palavras chaves:** calagem, solos tropicais, respirometria, substâncias húmicas.

**SUMMARY: Influence of liming, phosphate fertilization and sucrose addition in organic matter of Humic Latosol (Oxisol)**

The agricultural use of soils in the Region of Zona da Mata in Minas Gerais, mainly with coffee crops, has been raising the hypothesis that humified organic matter may be lost as a function of the adopted agricultural practices. The objective of this work was therefore to evaluate the behavior of organic matter in the soil following application of liming, phosphate fertilization and addition of a labile carbon source (sucrose). The studied soil was a dystrophic red yellow Latosol from Sericita-MG. Trials were conducted in laboratory with controlled temperature at 25°C. The experiments were arranged in a complete randomized design in a 5x2x2 factorial scheme, with five liming levels (0; 0.5; 1; 2 and 3 times the amount needed to increase soil base saturation to 60%), two levels of phosphate fertilization (with and without, in the form of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) and two levels of a labile carbon source (C) (with and without, in form of form sucrose). Respiration curves were established from the accumulated  $\text{CO}_2$  liberated during 136 days and then fitted to the first order kinetic model. Following the incubation period, C total in the soil and humic fractions (fulvic, humic and humin) were evaluated. The total C- $\text{CO}_2$  production accumulated over time was positively affected by the sucrose. The fulvic acid fraction in the soil tended to increase with addition of labile-C, but reduced with the addition of phosphate. Liming caused reduction in C of the humic acid fraction but increased C of the humin fraction. Results indicated that agricultural practices such as liming, phosphate fertilizations and addition of residues in the form of labile-C changed the C dynamics in organic matter of humic Latosols

**Key words:** liming, tropical soils, humic substances, land use.

## 1 – INTRODUÇÃO

Práticas agrícolas como calagem, adubação fosfatada e adição de material orgânico lábil podem propiciar modificações na dinâmica da matéria orgânica do solo (MOS), principalmente por alterarem seus compartimentos em função da entrada de energia no sistema. Atualmente, grande importância vem sendo dada à influência dessas práticas agrícolas na mineralização e produção da MOS em função de afetarem a dinâmica do carbono (C), acarretando assim mudanças globais no ciclo deste elemento (Bayer et al., 2006; Lal, 2004)

Os Latossolos húmicos são caracterizados por apresentarem horizonte A espesso e rico em C, sendo em sua maioria distróficos (Ker, 1999). Esses solos estocam, em média, 29 kg m<sup>-2</sup> de C, sendo preferencialmente compartimentalizado na forma de ácidos húmicos (40%), humina (39%) e ácidos fúlvicos (21%) (Assis et al. 2005, dados não publicados). A natureza do húmus e a distribuição das frações humificadas variam, entre outros fatores, com a acidez, presença ou ausência de bases (Zech et al., 1997). Dessa forma, podem ocorrer alterações neste compartimento estável da MOS uma vez que correção da acidez e adubações são práticas essenciais na obtenção de produtividades das culturas nesses solos. Contudo, a calagem (Badalucco et al., 1992; Smolander et al., 1994) e as adubações podem atuar sobre a composição, quantidade e atividade dos microrganismos envolvidos nas transformações orgânicas, podendo influenciar indiretamente no comportamento do C presente nas frações humificadas deste solo.

Em função de sua distrofia e, em grande parte à presença de elevada acidez, esses solos também apresentam baixa atividade de microrganismos no solo. Contudo, sabemos que a atividade microbiana é um parâmetro integrador de muitos dos processos que envolvem as transformações do C no solo (van Hees et al., 2005) e que o uso agrícola pode influenciar em sua dinâmica no solo (Janzen, 2004). Compostos de C de baixo peso molecular (p.e., glicose e sacarose) originados da decomposição de restos vegetais e de rizodeposição são importantes reguladores dos fluxos de C no sistema solo, podendo assim influenciar em diferentes compartimentos desse elemento nos solos.

A atividade microbiana edáfica está intimamente relacionada com os processos de degradação da MOS, os quais podem ser inibidos ou estimulados com a presença de substratos no solo. Ela pode ser medida através da avaliação da atividade respiratória do solo, sendo um fator importante para se determinar a mineralização de compostos orgânicos no solo (Stevenson & Verburg, 2006; Curtin et al., 1998). O ajuste de um modelo de

cinética de primeira ordem aos dados obtidos em ensaio de respirometria pode fornecer parâmetros representativos para se avaliar, em resposta energética adicionada no sistema, os efeitos da calagem e da adição de fósforo e carbono lábil nas alterações da matéria orgânica de Latossolos com horizontes A húmicos. Até onde conhecemos os estudos relacionados com alterações da MO em Latossolos com horizontes A húmico em função do uso da terra são escassos, apesar de grande parte destes solos ser utilizada com cafeicultura e pastagem na Zona da Mata de Minas Gerais.

Neste contexto esse trabalho teve por objetivo avaliar, sob ensaio de respirometria, as alterações na matéria orgânica de um Latossolo Húmico submetido à calagem, adubação fosfatada e adição de sacarose.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico húmico, franco-argiloso, pertencente à região de Sericita, Zona de Minas Gerais. Foi coletada amostra composta de 15 subamostras entre 40-60 cm de profundidade no Horizonte A húmico. As características físico-químicas do solo estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Características físico-químicas do Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico húmico amostrado entre 40-60 cm de profundidade

Características Químicas <sup>/1</sup>								Características Físicas <sup>/2</sup>							
pH (H <sub>2</sub> O)	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	T	P-rem	COT	NT <sup>c</sup>	AG	AF	S	A	Ds
	mg dm <sup>-3</sup>		cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>					mg L <sup>-1</sup>	dag kg <sup>-1</sup>		dag kg <sup>-1</sup>			g cm <sup>-3</sup>	
5.5	0.7	30	2.0	0.4	0.2	12.6	9,84	4.9	4.7	0.32	28	9	29	34	0.80

<sup>/1</sup> pH em água (relação 1:2,5); P e K extraídos com Mehlich-1; Mg, Ca e Al extraídos com KCl 1 M; H+Al extraídos com Acetato de Cálcio 0,5 M em pH 7,0; T = CTC a pH 7,0; P -rem = fósforo remanescente; COT = carbono orgânico total de acordo com Yeomans & Bremner (1988); NT = nitrogênio total, método Kjeldahl; <sup>/2</sup> AG = areia grossa; AF = areia fina, A = argila; Ds = densidade do solo, método do anel volumétrico.

Para a montagem do experimento, os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 5x2x2, sendo cinco níveis de calagem (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 vezes a necessidade de calagem), dois níveis de adubação fosfatada (com e sem), e dois níveis de carbono lábil (com e sem), em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. A necessidade de calagem foi determinada de forma a elevar a saturação de bases do solo à 60%, sendo utilizados carbonatos de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e magnésio (MgCO<sub>3</sub>) em proporção de 4:1. A aplicação do fosfato baseou-se na recomendação para a manutenção da produtividade do cafeeiro, sendo utilizados 40 kg ha<sup>-1</sup> de P na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Para

adição de carbono lábil utilizou-se 15 mL de solução de 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Högberg & Ekblad, 1996).

Após a aplicação dos tratamentos, as amostras de solo (50 cm<sup>3</sup>) foram acondicionadas em frascos de 500 cm<sup>3</sup>, hermeticamente fechados. O C-CO<sub>2</sub> liberado pela atividade microbiana do solo foi capturado em solução de NaOH e determinado por titulação com HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, após adição de 5 mL de solução de BaCl<sub>2</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e fenolftaleína como indicador. A quantidade total de C-CO<sub>2</sub> evoluído correspondeu ao somatório dos valores obtidos em cada medição. Durante o ensaio, a umidade do solo foi mantida em torno de 60% da capacidade máxima de retenção de água. O experimento foi conduzido durante 136 dias em laboratório com temperatura controlada a 25 °C.

Em seguida foram avaliados o C orgânico total do solo (COT) e das frações ácidos húmicos, fúlvicos e humina. As frações ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina foram extraídas de acordo com a diferença de solubilidade em ácido e álcali (Schnitzer, 1982). Os teores de COT do solo e das frações humificadas foram determinados por oxidação via úmida, utilizando-se solução de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> em meio ácido, com aquecimento externo (Yeomans & Bremner, 1988).

Os valores CO<sub>2</sub> acumulado foram relacionados aos intervalos de tempo de incubação onde, para descrever a cinética de produção de CO<sub>2</sub>, empregou-se o seguinte modelo de cinética:  $Y = A(1 - e^{-kt})$ , onde Y= quantidade total de CO<sub>2</sub> liberada no tempo t de incubação; A= quantidade de CO<sub>2</sub> produzida num tempo infinito e, k= constante de velocidade de degradação de primeira ordem (Jenkinson & Rayner, 1977).

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos A e k e, para COT, C da fração húmica, C da fração fúlvica, C da fração humina foram submetidos à análise de variância. Dentro de cada nível de calagem e de C-lábil foram comparadas as médias dos tratamentos com e sem P pelo teste F (p<0,05). Da mesma foram analisadas as médias dos tratamentos com e sem C-lábil dentro de cada nível de calagem e de P. Também foram avaliados dentro de cada combinação os efeitos polinomiais da calagem sobre as variáveis estudadas através de regressão linear. Como auxílio computacional utilizou-se o programa SAEG<sup>®</sup> - UFV.

### **3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A adição de sacarose (C-lábil), tanto em tratamentos com e sem de P, favoreceu o aumento da atividade microbiana (Tabela 2), sendo que apenas no tratamento que recebeu INC não foi observado efeito da sacarose quando da ausência de P no sistema. Estímulos na respiração com a adição de calagem também foram verificados por Persson et al. (1989),

Marschner & Wilczynski (1991). Apesar de observarmos aumento nos valores de A com a adição de sacarose no sistema, o incremento no k apenas foi observado nos níveis com 2 e 3 NC.

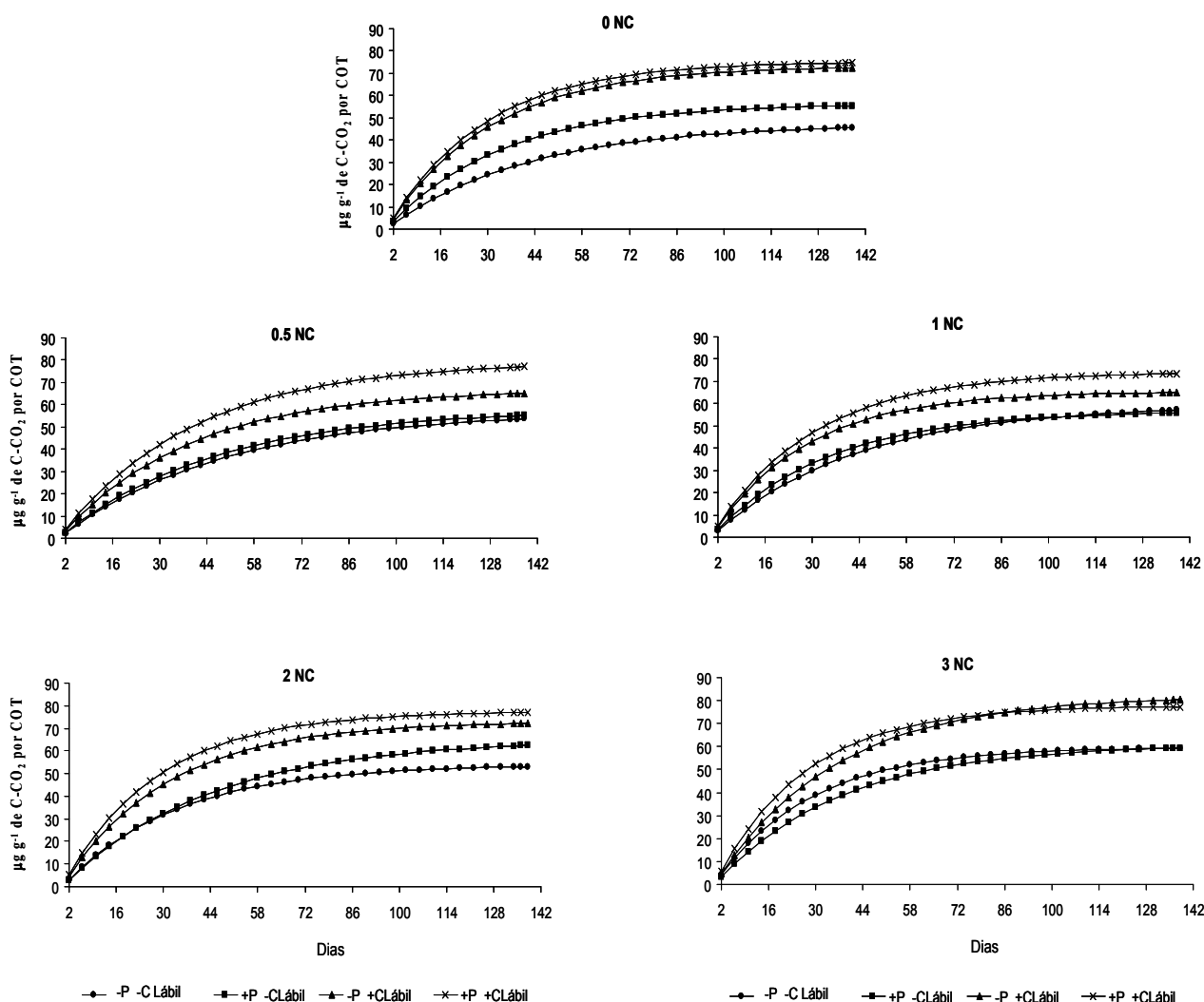
Os resultados obtidos nos tratamentos que não receberam sacarose e P refletiram o efeito da adição da calagem. Neste caso observamos que com o aumento no nível de calagem houve tendência de aumento nos valores médios de k. Com exceção de 3NC, não observamos efeito da aplicação de P sobre os valores obtidos para a variável k. Contrariamente, na presença de P e sacarose, os valores de k foram maiores nos tratamentos com 2 e 3 NC. Podemos considerar que em condições de campo a partir da dosagem de 1 NC a taxa de degradação do material orgânico do solo pode ser significativamente aumentada na presença de adubação fosfatada e fontes de C mais lábeis.

**Tabela 2** – Parâmetros cinéticos relativos ao ajuste do modelo de cinética de primeira ordem<sup>(1)</sup> relativos à adição de carbono lábil e fosfato sob efeito de diferentes níveis de calagem

Níveis de Calagem <sup>(2)</sup>	Presença de Sacarose		Ausência de Sacarose	
	+P <sup>(3)</sup>	-P	+P	-P
A ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de $\text{CO}_2$ do COT <sup>(5)</sup> )				
0	75.32 aA	73.30 aA	56.36 aB	47.25 aB
½	79.51 aA	66.84 bA	58.02 aB	56.96 aB
1	74.09 aA	65.41 aA	56.79 aB	59.35 aA
2	77.06 aA	72.95 aA	65.31 aB	54.04 bB
3	77.82 aA	82.06 aA	60.87 aB	59.75 aB
k ( $\text{dia}^{-1}$ )				
0	0.035 aA	0.033 aA	0.029 aA	0.024 aB
½	0.025 aA	0.026 aA	0.022 aA	0.020 aA
1	0.033 aA	0.036 aA	0.029 aA	0.023 aB
2	0.035 aA	0.032 aA	0.023 aB	0.029 aA
3	0.037 aA	0.028 bA	0.027 aB	0.035 bA
$r^2$				
0	0.94 ***	0.96 ***	0.92 ***	0.92 ***
½	0.97 ***	0.95 ***	0.93 ***	0.94 ***
1	0.94 ***	0.93 ***	0.93 ***	0.92 ***
2	0.95 ***	0.97 ***	0.94 ***	0.90 ***
3	0.91 ***	0.92 ***	0.90 ***	0.89 ***

<sup>(1)</sup>  $Y = A(1 - e^{-kt})$ ; <sup>(2)</sup> proporção referente à necessidade de calagem para o solo, <sup>(3)</sup> fósforo na forma de fosfato de potássio, <sup>(5)</sup> carbono orgânico total. Diferenças estatísticas encontradas usando teste F para  $p < 0,05$ . Médias seguidas pela mesma letra maiúscula e minúscula não diferem estatisticamente para adição de carbono lábil e adubação fosfatada, respectivamente. \*\*\* significativo a 1% pelo teste F.

Através do ajuste dos pontos experimentais ao modelo de cinética de primeira ordem foi possível verificar dois distintos estágios na evolução acumulada de C-CO<sub>2</sub>, onde em função dos valores de k, a meia-vida foi em média 25 dias, com valores variando de 19 a 35 dias. Como observado na Fig.1 nos primeiros 25-30 dias foi possível observar aumento crescente na liberação de C-CO<sub>2</sub>, dando seqüência a uma fase mais lenta com fluxos de C-CO<sub>2</sub> mais estabilizados até os 136 dias da incubação (Fig. 1).



**Fig. 1** – C-CO<sub>2</sub> acumulado em função do tempo de incubação com adições proporcionais de 0; 0.5; 1; 2; e 3 NC (Necessidade de Calagem) sob efeito da adição de P (adubação fosfatada na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e C-lábil (na forma de sacarose) para um Latossolo Vermelho-Amarelo húmico. As linhas correspondem ao ajuste dos pontos experimentais ao modelo de cinética de primeira ordem,  $Y = A(1 - e^{-kt})$ .

As curvas de liberação de C-CO<sub>2</sub> relacionadas ao COT presente no solo fazem inferência à atividade dos microrganismos que atuaram na mineralização da MOS (Fig.1). Gráficamente observamos que a adição conjunta de P e sacarose favoreceu a produção de C-CO<sub>2</sub>, indicando assim maior efeito da adição conjunta em comparação aos seus efeitos isolados. Este resultado confirma que a adição conjunta da fertilização e resíduos lábeis no solo aumenta a evolução de C-CO<sub>2</sub> em detrimento à adição isolada (Azam et al., 1985; Vanlauwe et al. 2001; Moran et al. 2005). Avaliando a respiração microbiana, no tempo, depois da adição de glicose, glicose+nitrogênio e glicose+fósforo em um solo tropical ácido, Ilsted & Singh (2005) encontraram aumento na respiração quando fósforo foi adicionado junto com glicose em relação à sua aplicação isolada.

De acordo com Haynes (1982) a precipitação de fosfatos como fosfato de cálcio insolúvel diminui a disponibilidade do fosfato em solução. Contudo observamos que no tratamento com 3NC a presença de P, inicialmente, aumentou a atividade respiratória. Acreditamos que nestas condições houve maior disponibilidade de P para a comunidade microbiana do solo, ou até mesmo favorecendo populações microbianas que têm crescimento limitado com a ausência deste elemento. Para Stevenson & Cole (1999) a solubilidade de fosfatos de cálcio e magnésio pode ser aumentada através da produção de ácido carbônico durante a liberação de CO<sub>2</sub> ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ). Os valores médios de pH obtidos com aplicação de fosfato no tratamento com 3NC, foram de 7,67 e 7,71 para presença e ausência de sacarose, respectivamente. De acordo com Sauchelli (1965) a partir de pH 7,5 há aumento na solubilidade dos fosfatos de cálcio. Dessa forma podemos dizer que houve maior disponibilidade de fosfatos nessa condição do tratamento com 3NC quando da presença de adubação fosfatada, os quais podem ser utilizados como recurso energético pelas comunidades microbianas presentes no solo.

Para C orgânico total do solo (COT) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, com exceção daqueles que receberam dosagem de 3NC, onde foi possível detectar redução COT com a adição de P (Tabela 3). Na fração fúlvica, definida como a menos estável, observamos um pequeno, porém significativo aumento ( $P < 0,05$ ) com a adição de sacarose nos tratamentos com 0 e 2NC.

Em resposta à calagem não constatamos efeito sobre os teores de COT do solo (dados não mostrados). Serrano et al (2003), estudando solos ácidos cultivados com café em Veracruz no México, também não observaram impacto sobre o COT quando utilizaram 3.6 a 9 t ha<sup>-1</sup> de



CaCO<sub>3</sub>. Neste trabalho, quando comparamos o COT entre os diferentes tratamentos (presença ou não de P e sacarose) não observamos mudanças significativas nos teores de C entre os tratamentos, porém quando analisamos as frações humificadas algumas significâncias observadas sugerem que durante o experimento houve movimentação do C neste compartimento da MOS (Tabela 3). Dado que grande parte da MOS destes Latossolos se encontra na forma humificada este resultado indica importantes movimentações do C no solo, mesmo em situações onde não se observa alterações nos teores totais do mesmo.

**Tabela 3** – Teores de carbono orgânico total do solo (COT) e das frações humina (C-FHN), ácido húmico (C-FAH) e fúlvico (C-FAF) após incubação por 136 dias com 0, ½, 1, 2 e 3NC (doses referentes à necessidade de calagem do solo) em presença e ausência de fósforo (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e C-lábil (sacarose)<sup>(\*)</sup>.

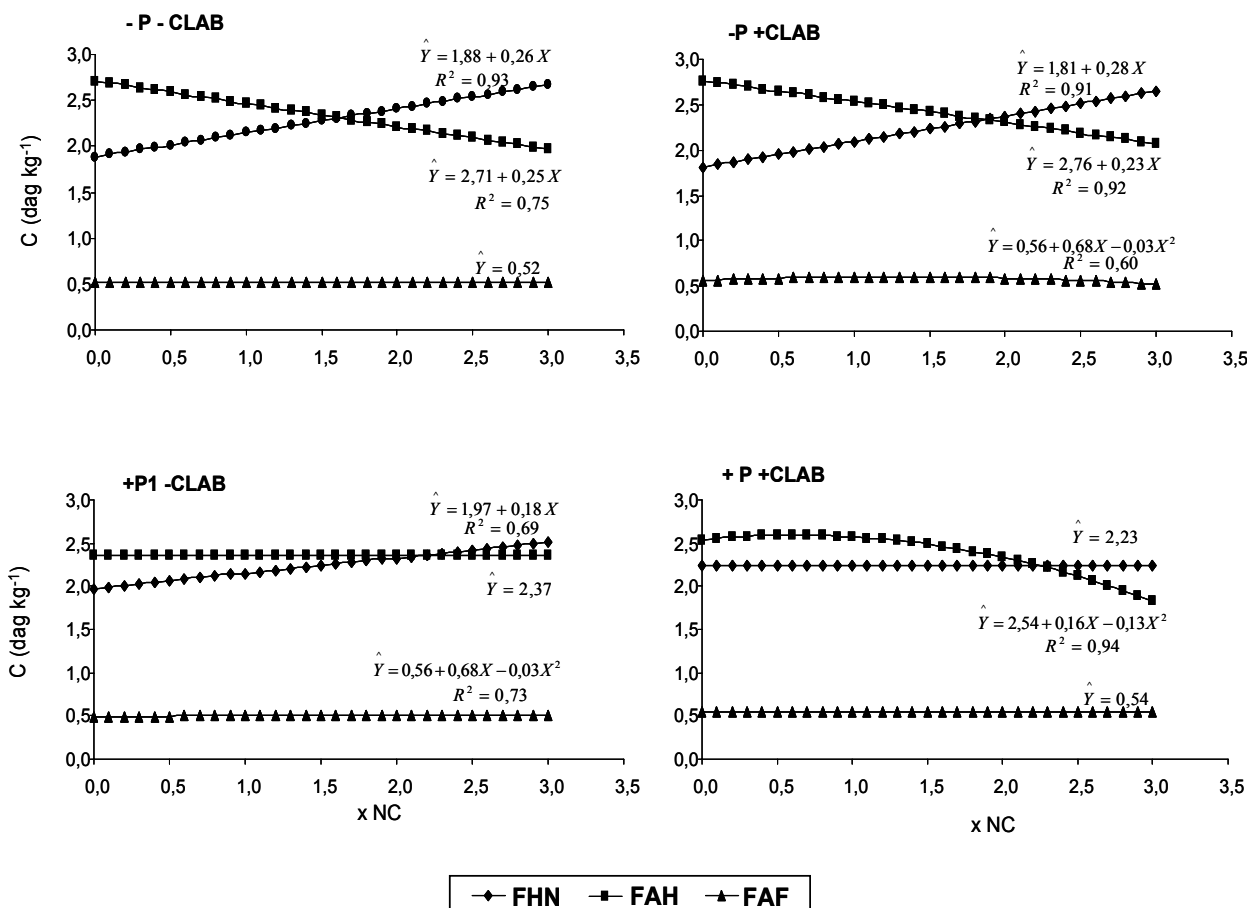
Níveis de Calagem	Presença de C-lábil		Ausência de C-lábil	
	+P <sup>(4)</sup>	-P	+P	-P
			COT	
0	5.57 Aa	5.80 Aa	4.99 Aa	5.32 Aa
½	5.24 Aa	4.94 Aa	5.41 Aa	4.82 Aa
1	5.30 Aa	5.67 Aa	4.82 Aa	5.19 Aa
2	5.33 Aa	5.55 Aa	5.13 Aa	5.47 Aa
3	5.07 Aa	5.35 Aa	5.13 Ab	6.05 Aa
			C-FHN	
0	2.35 Aa	1.85 Aa	1.77 Aa	1.79 Aa
½	2.04 Aa	1.91 Aa	2.23 Aa	2.12 Aa
1	2.07 Aa	2.00 Aa	2.25 Aa	2.11 Aa
2	2.40 Aa	2.53 Aa	2.31 Aa	2.49 Aa
3	2.30 Aa	2.58 Aa	2.46 Aa	2.61 Aa
			C-FAH	
0	2.54 Aa	2.85 Aa	2.39 Aa	2.70 Aa
½	2.51 Aa	2.60 Ba	2.50 Ab	3.12 Aa
1	2.69 Aa	2.43 Aa	2.38 Aa	2.45 Aa
2	2.26 Aa	2.38 Aa	2.30 Aa	2.25 Aa
3	1.85 Ba	2.06 Aa	2.26 Aa	1.95 Aa
			C-FAF	
0	0.53 Aa	0.58 Aa	0.46 Ba	0.51 Ba
½	0.51 Aa	0.56 Aa	0.54 Aa	0.54 Aa
1	0.54 Aa	0.58 Aa	0.53 Aa	0.53 Aa
2	0.56 Aa	0.62 Aa	0.51 Ba	0.51 Ba
3	0.53 Aa	0.50 Aa	0.52 Aa	0.52 Aa

<sup>(\*)</sup> Diferenças estatísticas encontradas usando teste F para P<0,05, as médias apresentadas seguidas pela mesma letra maiúscula e minúscula não diferem estatisticamente para adição de C-lábil e fósforo, respectivamente.

Também observamos que a fração fúlvica, considerada menos humificada e rica em polissacarídeos (Stevenson, 1994), tendeu a apresentar maiores teores médios de C com a aplicação de sacarose, principalmente quando na ausência de P (Tabela 3).

Em resposta à calagem constatamos, no geral, incrementos no C na fração humina, com conseqüente redução no C da fração húmica (Fig.2). O aumento e redução do C para a fração humina e ácido húmico, respectivamente, demonstrou o impacto do pH na dinâmica dessas frações humificadas no solo. A intensificação na calagem pode estar causando microfloculações de humatos de cálcio (Jekel, 1986), o que resultaria em pouca solubilidade em álcali dessa fração, incrementando assim a fração humina. Yagi et al. (2003) também constataram diminuições no conteúdo de C da fração húmica de um Latossolo Vermelho com a calagem. Os processos que conduzem a esse comportamento precisam ser elucidados, uma vez que se acredita ser resultado de microfloculações de humatos de cálcio e, ou, à desestabilização de complexos Al-húmus.

Reduções nas formas trocáveis do alumínio, assim como o incremento de cálcio, também podem estar favorecendo na desestabilização de complexos húmicos (Mendonça & Rowell, 1994). Dessa forma, a redução do C observada para a fração húmica quando da aplicação máxima de calagem (3 NC) (Tabela 3) também pode ter ocorrido em função da desestabilização de complexos Al-húmus, aumentando a susceptibilidade à decomposição para essa fração. Dados na literatura confirmam que a calagem reduz significativamente a formação de complexos orgânicos com o Al, assim como a forma trocável desse elemento no solo (Takahashi et al. 2006; Canellas et al. 1999; Mendonça & Rowell, 1994).



**Fig.2** – Carbono (C) das substâncias húmicas em função das doses de calagem aplicadas. FHN= fração húmica; FAH= fração ácido húmico e FAF= fração ácido fúlvico.

Com relação à fração fúlvica observamos resposta à calagem apenas quando da adição isolada de P e sacarose (Fig.2). De acordo com Mendonça & Rowell (1996) em solos intemperizados e argilosos, a fração fúlvica possui maior capacidade de formar complexos argilo-húmicos, o que a torna mais protegida contra a degradação. Esses autores também discutem que a característica oxidica e caulínica dos Latossolos favorece a decomposição dos ácidos húmicos em detrimento aos ácidos fúlvicos. De modo geral, os dados obtidos demonstraram tendência de redução da fração fúlvica quando da aplicação de P. Uma explicação plausível seria a competição dos íons fosfatos pelos sítios de ligação com a fração mineral, tornando os ácidos fúlvicos mais suscetíveis à degradação. A formação de fosfatos de alumínio e cálcio também pode contribuir para a desestabilização do material orgânico do solo (Haynes & Naidu, 1998; Haynes, 1982).

#### 4 - CONCLUSÕES

2) A produção total de C-CO<sub>2</sub> acumulada no tempo aumentou com a adição de sacarose em detrimento a presença de P no solo.

4) A calagem em Latossolos Húmicos promoveu aumentos na fração humina e reduções na fração húmica.

1) Práticas agrícolas como calagem, adubações fosfatadas e adições de resíduos na forma de C lábil alteram a dinâmica do C no compartimento passivo (humificado) da matéria orgânica de Latossolos húmicos.

#### 5 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

#### 6 - REFERÊNCIAS CITADAS

- ASSIS, C.P. LANI, J.L., JUCKSCH, I., PACHECO, A.A., I. OLIVEIRA, H., BARDALES, N.G., AMARAL, E.F. 2005. Alterações físicas, químicas e morfológicas de Latossolos Húmicos como indicadores da degradação da microbacia do ribeirão Alto Santana, Sericita, MG. Relatório técnico-científico FAPEMIG (EDT 43/2004)m, 79p.
- AZAM, F., K.A. MALIK, AND M.I. SAJJAD, 1985. Transformation in soil and availability to plants of N<sup>15</sup> applied as inorganic fertilizer and legume residues. *Plant soil*, 86:3-13.
- BADALUCCO, L.; GREGO, S.; DELL'ORCO, S.; NANNIPIERI, P. 1992. Effect of liming on some chemical, biochemical, and microbiological properties of acidic soils under spruce (*Picea abies* L.). *Biological Fertility Soils*, 14:76-83.
- BAYER, C., MARTIN-NETO, L., MIELNICZUK, J., PAVINATO, A., DIECKOW, J., 2006. Carbon sequestration in two Brazilian Cerrado soils under no-till. *Soil Till. Res.* 86, 237–245.
- CANELLAS, L.P., SANTOS, G.A., AMARAL SOBRINHO, N.M.B. 1999. Reações da matéria orgânica. In: Santos & Camargo. Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais. Gênese. 491p.
- CURTIN, D., CAMPBELL, C.A., JALIL, A., 1998. Effects of acidity on mineralization: pH-dependence of organic matter mineralization in weakly acidic soils. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 57–64.

- HAYNES, R.J. 1982. Effects of liming on phosphate availability in acid soils. *Plant and Soil*, 68: 289-308.
- HAYNES, R.J., NAIDU, R. 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51:123-137.
- HÖGBERG, P., EKBLAD, A. 1996. Substrate-induced respiration measured *in situ* in a C3-Plant ecosystem using additions of C4-sucrose. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1131-1138.
- ILSTEDT, U., SINGH, S. 2005. Nitrogen and phosphorus limitations of microbial respiration in a tropical phosphorus-fixing acrisol (ultisol) compared with organic compost. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 1407-1410.
- JANZEN, H.H., 2004. Carbon cycling in earth systems—a soil science perspective. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 104: 399–417.
- JEKEL, M.R. 1986. Stabilization of Dispersed Mineral Particles by Adsorption of Humic Substances. *Water Research*, 20:1543-1554.
- JENKINSON, D.S. & RAYNER, J.H. 1977. The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted Classical Experiments. *Soil Science*, 123: 298-305.
- KER, J. C. 1999. Latossolos do Brasil: uma revisão. *Geonomos*, 5: 17-40.
- LAL, R., 2004. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123: 1–22.
- MARSCHNER, B., WILCZYNSKI, W. 1991. The effect of liming on quantity and chemical composition of soil organic matter in a pine forest in Berlin, Germany. *Plant and Soil*, 137: 229-236.
- MENDONÇA, E. S.; ROWELL, D. L. 1994. Dinâmica do alumínio e de diferentes frações orgânicas de um latossolo argiloso sob cerrado e soja. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, Campinas, 18:295-303.
- MENDONÇA, E.S.; ROWELL, D.L. 1996. Mineral and organic fractions of two oxisols and their influence on effective cation-exchange capacity. *Soil Science Society of America Journal*, 60:188-192.
- MORAN, K.K., SIX, J., HORWATH, W.R., Van KESSEL, C. 2005. Role of Mineral-Nitrogen in Residue Decomposition and Stable Soil Organic Matter Formation. *Soil Science Society of America Journal*, 69: 1730-1736.
- PERSSON, T., LUNDKVIST, H., WIRÉN, A., HYVÖNEN, R., WESSÉN, B. 1989. Effects of acidification and liming on carbon and nitrogen mineralization and soil organisms in mor humus. *Water, Air & Soil Pollution*, 45: 77-96.

- SAUCHELLI, V. 1965. Phosphate in agriculture. New York: Reinold Publishing,. 277p.
- SCHNITZER, M. 1982. Organic matter characterization. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H. & KEENEY, D.R., eds. Methods of soil analysis. Part 2 - Chemical and microbiological properties. 2.ed. Madison, Soil Science Society of America, p.581-594.
- SERRANO, J.A.; CECCANTI, B.; MASCIANDARO, G.; GALLARDO, J.F.; GARCÍA-IZQUIERDO, C.; ESCALANTE, A. 2003. Structural chemical analysis of organic mineral compounds for whitewash of coffee plantations. *Agrochimica*, 47:236-249.
- SMOLANDER, A.; MAELKOENEN, E. 1994. Microbial Biomass C and N in limed soil of Norway spruce stands. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 503-509.
- STEENWERTH, K.L., JACKSON, L.E., CALDERON, F.J., SCOW, K.M., ROLSTON, D.E., 2005. Response of microbial community composition and activity in agricultural and grassland soils after a simulated rainfall. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 2249–2262.
- STEVENSON, F.J. 1994. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley. 496p.
- STEVENSON, F.J., COLE, M.A. 1999. Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. 2<sup>a</sup> Edição. John Wiley & Sons, INC.427p.
- STEVENSON, B.A., VERBURG, P.S.J., 2006. Effluxed CO<sup>2</sup> -<sup>13</sup>C from sterilized and unsterilized treatments of a calcareous soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 1727–1733.
- TAKAHASHI, T., IKEDA, Y. FUJITA, K., NANZYU, M. 2006. Effect of liming on organically complexed aluminum of nonallophanic Andosols from northeastern Japan. *Geoderma*, 130:26-34.
- van HEES, P.A.W., JONES, D.L., FINLAY, R., GODBOLD, D.L., LUNDSTRÖM, U.S., 2005. The carbon we do not see—the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1–13.
- VANLAUWE, B., J. WENDT, AND J. DIELS. 2001. Combined application of organic matter and fertilizer. P. 247-279. In: G. Tian et al. (ed) Sustaining soil fertility in West Africa. SSSA and ASA, Madison, WI.
- YAGI, R. FERREIRA, M.E., CRUZ, M.C.P., BARBOSE, J.C. 2003. Organic matter fractions and soil fertility under the influence of liming, vermicompost and cattle manure. *Scientia Agrícola*, 60:549-557.

- YEOMANS, J.C., BREMNER, J.M. 1988. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19:1467-1476.
- ZECH, W., SENESI, N. GUGGENBERGER, G., KAISER, K., LEHMANN, J., MIANO, T.M., MILTNER, A., SCHOROTH, G. 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79: 117161.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos comparativos entre técnicas analíticas apropriadas possibilitam identificar mudanças na composição estrutural e molecular da matéria orgânica do solo (MOS). O estabelecimento do que possa ser a “impressão digital” dos ácidos húmicos (AH) e fúlvicos (AF) extraídos de horizonte A húmico de Latossolos revelaram pontos chaves:

- a) O escurecimento em subsuperfície no horizonte A pode ser resultado da presença de pigmentos melânicos de origem fúngica.
- b) Ácidos húmicos provenientes da região de Mata Atlântica apresentam maior descarboxilação, desidratação e aromaticidade quando comparados aos da região de Cerrado.
- c) Ácidos fúlvicos retidos em resina XAD-8 possuem mais grupamentos COOH são mais alifáticos e apresentam maiores contribuições de compostos originados da oxidação de lignina.
- d) A humificação dos AH no perfil envolve diminuição de grupamentos alquílicos e aumentos na região de sinal do C-aromático, sendo que essa aromaticidade é devida principalmente a compostos benzenos e toluenos.
- e) Os AH e AF extraídos de solo sob mata natural apresentam maior proporção de compostos de N, sendo em sua maioria ligados fracamente à estrutura.
- f) Dentro do horizonte A húmico, aqueles AH extraídos da superfície apresentam em sua estrutura maior diversidade de compostos que àqueles extraídos da subsuperfície.
- g) Os mecanismos de estabilização provavelmente envolvem acumulações de compostos nitrogenados heterocíclicos em AH e de compostos aromáticos (fenóis) em AF.
- h) A dessorção térmica a 280 °C mostra-se uma técnica sensível para diagnosticar influências do uso da terra nas modificações estruturais de AH e AF.

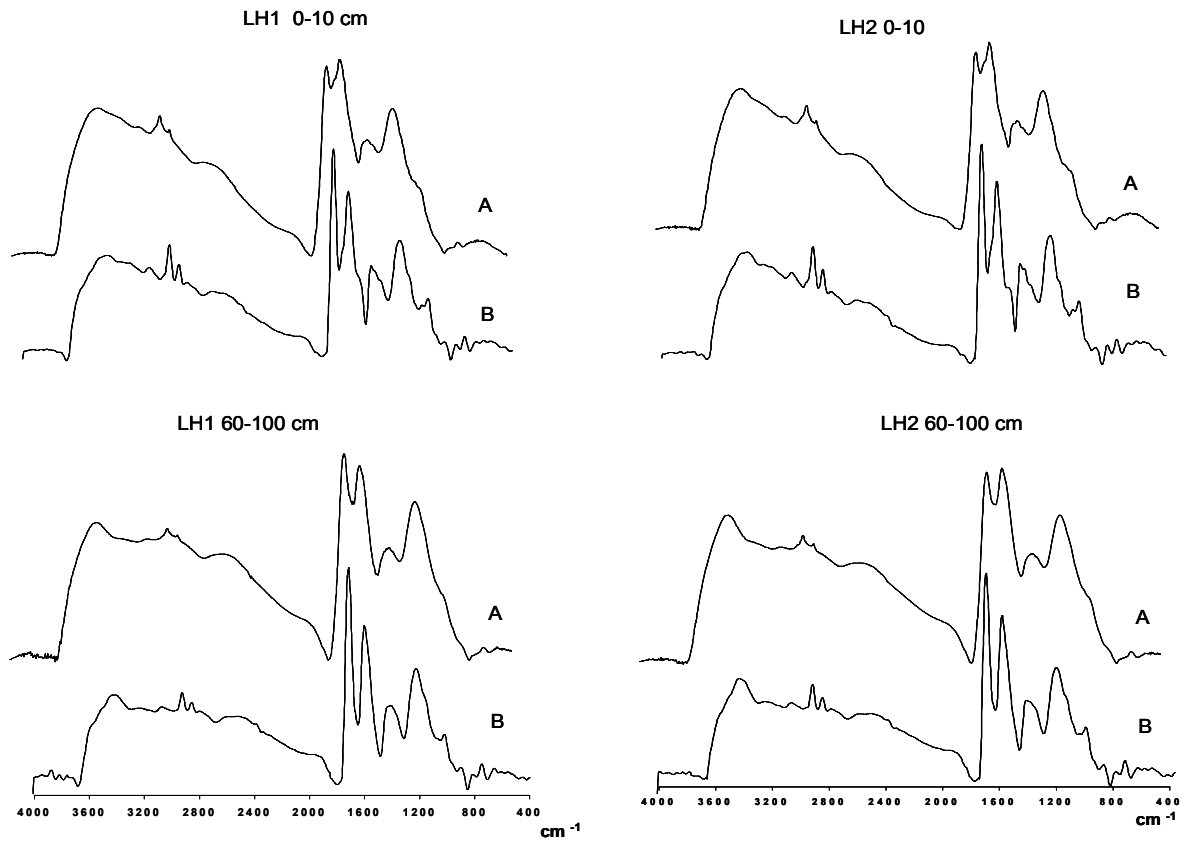
O impacto promovido pelas mudanças na cobertura do solo pode ser avaliado através da análise de lipídios totais, assim como a composição molecular dessa fração não-humificada. Nas camadas mais superficiais, maiores teores totais de lipídios são encontrados em solo sob vegetação natural. Na fração lipídica dos Latossolos Húmicos estudados predominam os ácidos graxos (AG). Na superfície, grande parte desses AG é herdada da serapilheira e, em subsuperfície, provavelmente de exsudações radiculares. Os AG insaturados mostram-se indicadores sensíveis da degradação do solo. Compostos n-



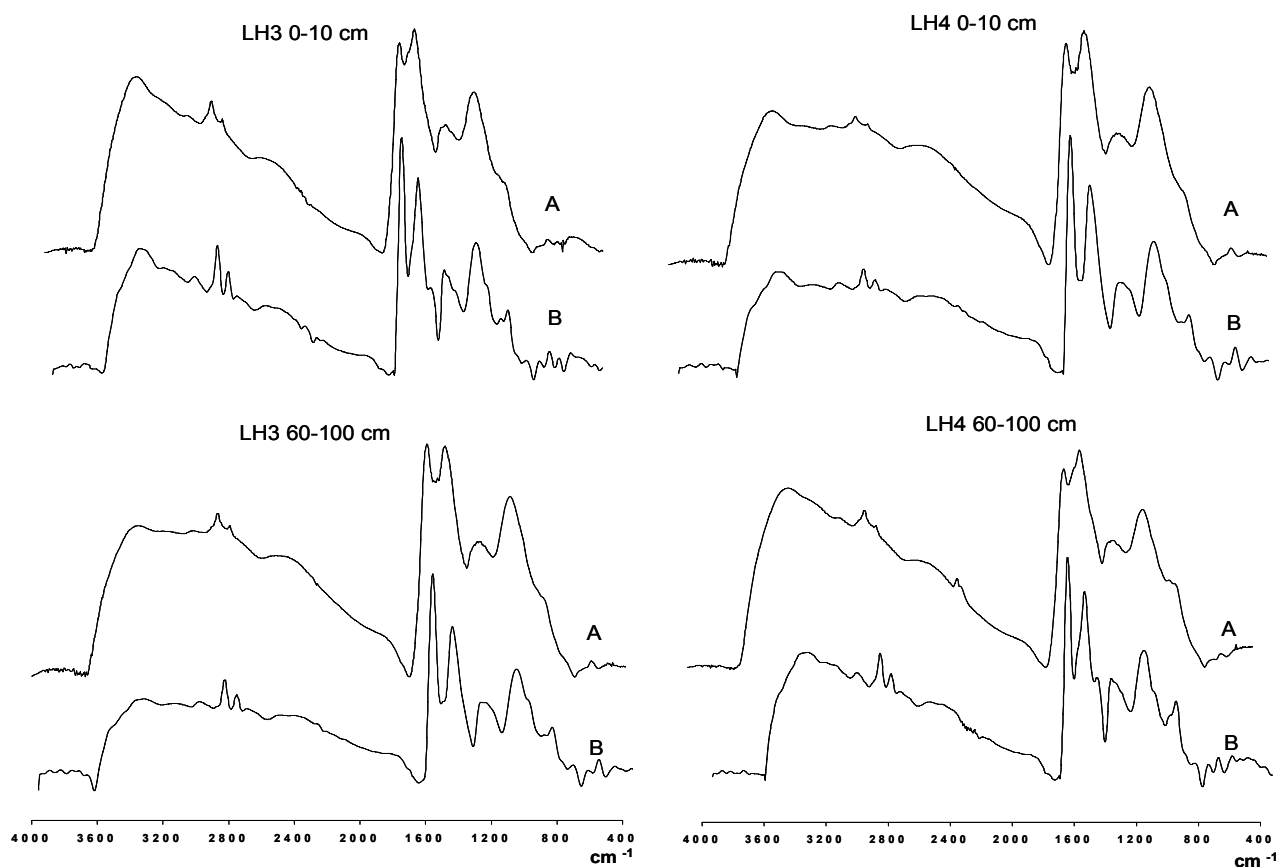
alcanos com C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> e C<sub>33</sub> são importantes na determinação da contribuição da serapilheira no padrão de distribuição destes compostos no perfil do solo, principalmente quando se conhece o histórico de sucessão da cobertura vegetal.

Com relação às práticas agrícolas que se utilizam da correção do solo, adubação fosfatada e adições de fontes de C lábeis nestes Latossolos com horizonte A húmico observa-se importantes modificações na dinâmica do C. A calagem neste solo favorece a movimentação do C no compartimento estável, no sentido de diminuir o C da fração ácido húmico (AH) e aumentar o C da fração humina. Considerando que neste solo, mais de 80% do C total representa seu compartimento estável, sendo que em média 40% corresponde à fração AH, a prática de se correção da acidez destes Latossolos poderá promover importantes modificações neste compartimento ao longo do tempo.

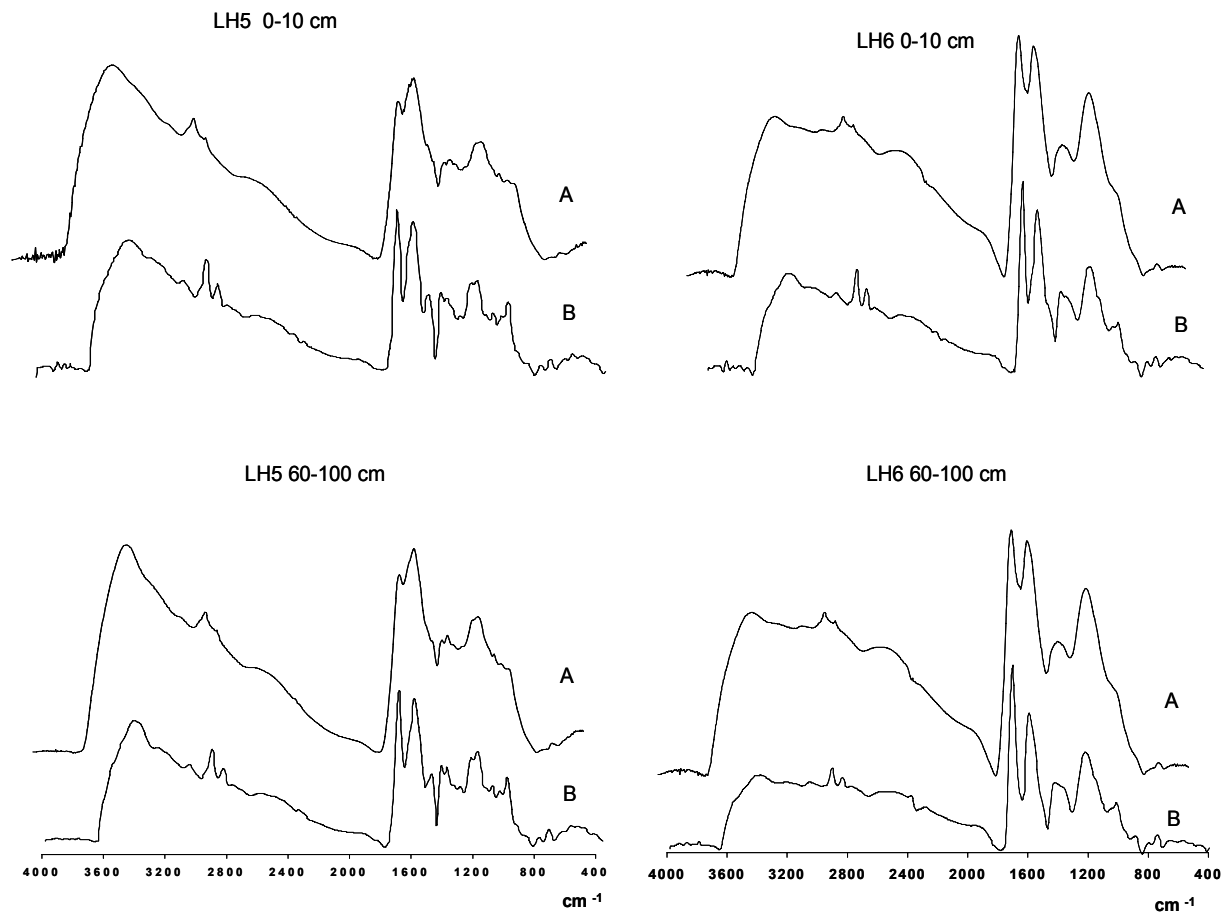
## ANEXOS



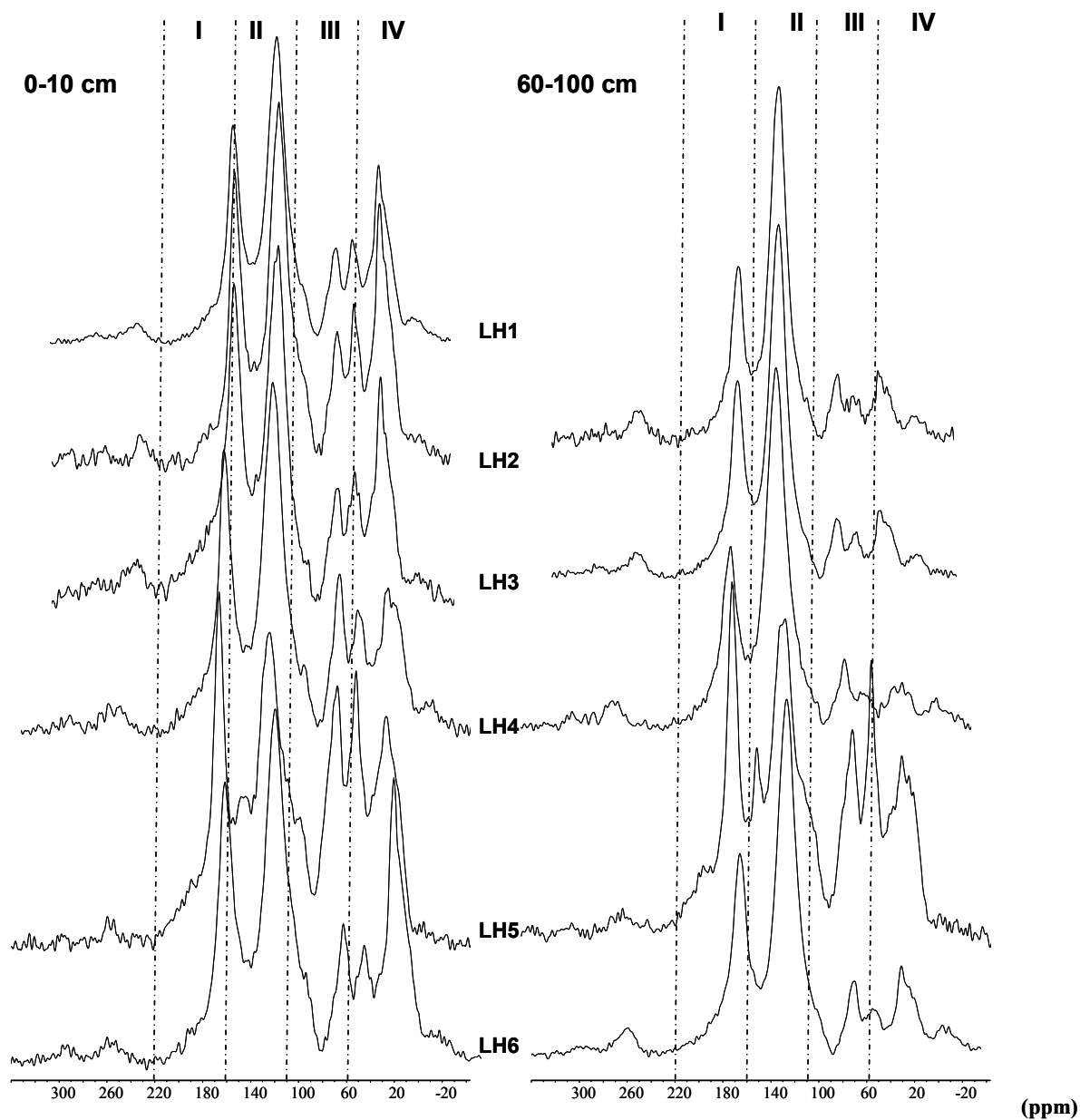
**A1** – Espectros de infravermelho (A) superpostos aos espectros de resolução melhorada (B) dos ácidos húmicos extraídos entre 0-10 e 60-100 cm de Latossolos Húmicos sob café (LH1) e pastagem (LH2).



**A2** – Espectros de infravermelho (A) superpostos aos espectros de resolução melhorada (B) dos ácidos húmicos extraídos entre 0-10 e 60-100 cm de Latossolos Húmicos sob mata Sericita (LH3) e vegetação de samambaia (LH4).



**A3** – Espectros de infravermelho (A) superpostos aos espectros de resolução melhorada (B) dos ácidos húmicos extraídos entre 0-10 e 60-100 cm de Latossolos Húmicos sob mata em Mutum (LH5) e cerrado (LH6).



**A4** – Espectros da ressonância magnética nuclear de ácidos húmicos extraídos de Latossolos Húmicos sob café (LH1), pastagem (LH2), mata em Sericita (LH3), vegetação de samambaia (LH4), mata em Mutum (LH5) e cerrado (LH6); entre as camadas 0-10 e 60-100 cm no perfil do solo. Região I= Região Carbonila; Região II= Região Aromática; região III= Região O-Alquílica e Região IV= Região Alquílica.