

9

Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C em Estudos de Caracterização Estrutural da Matéria Orgânica do Solo

Flávia Aparecida de Alcântara
Arminda Moreira de Carvalho

Resumo - Dentre as várias técnicas espectroscópicas utilizadas na Ciência do Solo, e particularmente em estudos sobre a matéria orgânica do solo, a ressonância magnética nuclear (RMN) ocupa uma posição de destaque. Esta técnica pode ser empregada para vários isótopos encontrados na natureza, contanto que estes possuam núcleos observáveis. Exemplos são os isótopos ^{14}N , ^{15}N , ^{27}Al , ^{29}Si , ^{31}P , ^1H e ^{13}C . Em trabalhos com matéria orgânica, os núcleos mais utilizados, além do ^{13}C , são ^{15}N , ^{31}P e ^1H . A técnica da RMN de ^{13}C propicia a determinação dos grupos orgânicos (ou tipos de carbono) presentes em um dado material orgânico. Podem ser analisadas amostras de material vegetal (p. ex. resíduos de culturas, serapilheira), de solo intacto e de frações extraídas fisicamente (por densimetria ou tamanho de partícula) ou quimicamente (extração das substâncias húmicas). Cada grupo ocupa uma determinada posição no espectro, em relação a um material de referência, e sua proporção relativa pode ser obtida mediante a integração de sua área dentro do espectro. Existem algumas limitações para o emprego da RMN de ^{13}C , dentre elas a baixa abundância natural deste isótopo e os baixos teores de carbono da maioria dos solos de origem mineral. Como alternativas, têm sido propostas ferramentas que visam principalmente melhorar a resolução dos espectros, sendo as principais a polarização cruzada e a utilização do ângulo mágico do spin (CPMAS). No entanto,

existem controvérsias sobre o potencial quantitativo da RMN de ^{13}C com CPMAS, sendo o termo “semi-quantificação” mais adequado para designar as proporções relativas de cada grupo orgânico obtido. De modo geral, para atender aos objetivos da maioria dos estudos de matéria orgânica, a comparação entre estas proporções em diferentes amostras tem sido suficiente para permitir avanços significativos sobre o entendimento dos processos de formação (incluindo a origem), decomposição e humificação da matéria orgânica, bem como sobre os efeitos dos sistemas agrícolas em sua composição química. Tais resultados são de grande importância para a identificação de sistemas de cultivo e práticas de manejo que, ao serem adotadas, propiciem o aumento dos teores e a melhoria da qualidade da matéria orgânica, com conseqüentes vantagens para o uso sustentável do recurso solo.

^{13}C Nuclear Magnetic Resonance on Structural Characterization of Soil Organic Matter

Abstract - Several spectroscopic techniques have been used in Soil Science, particularly in soil organic matter (SOM) studies. Among them, the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) has been considered one of the most powerful tools to structurally characterize SOM. It can be applied to all isotopes found in nature which presents nucleus that behave as magnetic dipoles, such as ^{14}N , ^{15}N , ^{27}Al , ^{29}Si , ^{31}P , ^1H and ^{13}C . In SOM research, the most studied isotope is the ^{13}C , followed by ^{15}N , ^{31}P and ^1H . Carbon-13 NMR application allows to determine the organic groups (or carbon types) that constitute the organic material. Its possible to run samples of vegetal material (e.g. crops residues, litter), whole soil, as well as soil fractions physically (by densimetry or granulometry) or chemically (humic substances extraction) extracted. Each carbon type occupies a given position in the spectrum, in relation to a reference material, and its relative proportion can be obtained integrating its area within the spectrum. There are still some limitations to the application of ^{13}C NMR in SOM studies, for instance the low natural abundance of this isotope in nature and the low of organic carbon of most mineral soils. Some procedures have been proposed as alternatives to enhance the spectra resolution, such as the cross-polarization (CP) and the magic angle spinning (MAS). However, the quantification of carbon types by the use of CPMAS ^{13}C NMR is controversial. Actually, the term "semi-quantification" is more adequate. Notwithstanding, in order to reach the objectives of most SOM studies, the comparison of the carbon types relative proportions between different samples has been sufficient to allow significant advancements in the knowledge on SOM formation, decomposition, and humification processes, as well as on the effects of land-use changes or crop systems on SOM quality. Such results may subsidize the identification of crop systems and management practices that, if adopted, will promote increases in SOM content and improvements in SOM quality, with advantageous consequences to the soil sustainable use.

Introdução

O material vegetal e a biomassa microbiana são as fontes primárias para a formação da matéria orgânica do solo (MOS). A quantidade e a composição química dos resíduos vegetais controlam a formação da MOS e os processos de humificação nos ecossistemas terrestres (Swift et al., 1979; Scholes et al., 1997).

A matéria orgânica do solo compõe-se de resíduos de plantas (fontes primárias), animais e microrganismos (fontes secundárias), de matéria orgânica dissolvida, de exsudados de raízes e dos compostos húmicos. Esses “pools” são identificados pelas transformações que caracterizam a dinâmica da matéria orgânica e, conseqüentemente, não são estáveis (Zech et al., 1997). O processo de decomposição consiste basicamente em duas fases: a primeira, desenvolvida nos primeiros meses, quando ocorre a perda dos compostos solúveis, e a segunda, que se inicia pela quebra dos compostos estruturais, pode perdurar por anos, dependendo da natureza do material. As transformações ocorrem geralmente na seguinte ordem: biodegradação rápida da maioria dos compostos hidrossolúveis e polissacarídeos, redução lenta de hidrossolúveis fenólicos e hemiceluloses e aumento relativo do conteúdo de ligninas e proteínas. Em geral, os diferentes componentes desses materiais são degradados por grupos especializados de microrganismos (Correia & Andrade, 1999).

O declínio nos teores da MOS, ao longo do tempo, pode estar associado a impactos negativos do manejo adotado, seja pelo excesso de revolvimento do solo, pela perda de nutrientes, seja por erosão acelerada, entre outros fatores (Silva et al., 1994; Mielniczuk, 1999; Bayer et al., 2001). Não obstante ser o teor de MOS um importante atributo na avaliação da sustentabilidade dos sistemas agrícolas, sabe-se hoje que sua qualidade é um fator determinante de seus efeitos no solo, seja como fonte de nutrientes, como condicionador físico ou como substrato para a microbiota. Portanto, a composição química da MOS, a qual afetará diretamente sua decomponibilidade, deve ser considerada em estudos sobre seu comportamento no solo.

Várias técnicas têm sido empregadas para caracterizar a MOS, dentre as quais podem-se destacar os métodos espectroscópicos, como a espectroscopia na região do ultravioleta visível, a espectroscopia na região do infravermelho, a ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e a

ressonância magnética nuclear (RMN). Esta última tem-se destacado como uma ferramenta importante na caracterização estrutural de material vegetal, como serapilheira e resíduos vegetais provenientes de adubos verde/plantas de cobertura, bem como da matéria orgânica, que pode ser estudada a partir de sua extração do solo ou no solo intacto.

Neste capítulo serão abordados os princípios da técnica de RMN, com destaque para o isótopo ^{13}C , seu histórico na Ciência do Solo e sua aplicabilidade para a caracterização de diferentes materiais. Apesar de os princípios serem os mesmos para amostras sólidas e líquidas, maior enfoque será dado para as primeiras, visto serem estas as mais utilizadas em estudos de MOS.

Breve histórico e Princípios da Técnica

A ressonância magnética nuclear foi criada por físicos na década de 50 e logo passou a ser utilizada em outros campos da ciência (Veeman, 1997). Desde o início da década de 60 tem sido largamente utilizada na química orgânica e na bioquímica (Preston, 1996). No que diz respeito a estudos específicos sobre MOS, os primeiros trabalhos com RMN do isótopo ^{13}C tinham como objetivo caracterizar estruturalmente os ácidos húmicos. Trabalhos pioneiros nessa área são os artigos publicados por Barton & Schnitzer (1963), Neyrod & Schnitzer (1972) e Gonzalez-Vila et al. (1976). Na Ciência do Solo, a RMN pode ser utilizada tanto para estudos da matriz inorgânica do solo, onde os principais isótopos estudados são ^{14}N (junto com o ^{15}N), ^{27}Al , ^{29}Si e ^{31}P , quanto para o material orgânico, além da elucidação de processos de metabolismo de plantas. No segundo caso, de interesse nesta revisão, além do ^{13}C , os principais isótopos de interesse são ^1H , ^{31}P e ^{15}N (Randall et al., 1997; Bligny & Douce, 2001).

Apesar de ser utilizada há mais de quatro décadas, somente nos últimos 15 a 20 anos é que o desenvolvimento da RMN de ^{13}C tem permitido a expansão de seu uso em estudos de MOS. Sua subutilização tem sido atribuída à falta de equipamento e de especialistas em RMN envolvidos com tais estudos, à escassez de oportunidades de treinamento para um número maior de pesquisadores e à pouca interação entre a Ciência do Solo e a Química (Preston, 1996). No Brasil, Ceretta et al. (1999) consideram as limitações de equipamentos e de recursos humanos bastante acentuadas, o que explica

que apenas recentemente os primeiros estudos de MOS utilizando ^{13}C RMN tenham sido publicados (por ex.: Ceretta, 1995; Martin-Neto et al., 1995).

Vários autores têm se esforçado em tornar mais acessíveis os princípios e as possibilidades de aplicação da RMN, que são os mesmos para ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P ou qualquer outro isótopo que possua núcleos observáveis por ressonância magnética. Excelentes materiais para consulta são os trabalhos de Wilson (1987), Slichter (1990) e Veeman (1997), bem como as revisões de Preston (1996), Kögel-Knabner (1997) e Kögel-Knabner (2000). Aqui, os princípios da técnica serão descritos de maneira sucinta, com ênfase em algumas limitações e nas ferramentas para contorná-las.

A base da RMN é o conceito de que muitos atômicos se comportam como dipolos magnéticos. De forma simples, um dipolo magnético pode ser visualizado como uma minúscula barra magnética com um pólo “norte” e outro “sul”. A força dessa barra, ou seja, a magnitude do dipolo magnético, é proporcional a uma propriedade fundamental dos núcleos atômicos, o momento angular spin, ou simplesmente spin, que corresponde à rotação do núcleo ao redor de um determinado eixo, produzindo um campo magnético, o qual pode então ser concebido, como gerado pelo próprio dipolo (Veeman, 1997). O spin do próton, do nêutron e do elétron é igual a $\frac{1}{2}$, mas como um núcleo pode ter mais de um próton ou nêutron, o spin total (I) do núcleo pode ser igual a 0, $\frac{1}{2}$, 1, $\frac{3}{2}$, 2 e assim por diante, dependendo do número de prótons e nêutrons. Os núcleos que contêm número ímpar de prótons e/ou nêutrons e número ímpar de número de massa têm I semi-inteiro, igual a $\frac{1}{2}$ no caso do ^1H e do ^{13}C , e são observáveis por RMN. Já os núcleos com número par de prótons e nêutrons têm I igual a zero, não sendo observáveis, pois não apresentam rotação em torno do eixo, como é o caso do C^{12} (Slichter, 1990).

Consideremos uma amostra de solo (sólida ou em solução) num espectrômetro de RMN a ser caracterizada quanto a sua composição estrutural de carbono. Como explicado anteriormente, é o ^{13}C que nos permite a aplicação da técnica para estudos de MOS. Um transmissor emite a frequência de rádio (isto significa que é necessária a aplicação de um campo magnético externo), responsável por entrar em ressonância com os spins. Estes sofrem, então, um movimento de precessão ao redor do eixo. Os núcleos com I maior que zero geram $2I+1$ níveis de energia. No caso do ^{13}C , os níveis são $-\frac{1}{2}$ e $+\frac{1}{2}$, e correspondem às duas orientações que o núcleo pode assumir no campo magnético. A uma dada frequência, ocorre uma transição

entre estes dois níveis de energia, resultando numa linha de ressonância no espectro de frequência (Wilson, 1987; Slichter, 1990; Veeman, 1997).

Na prática, os spins nunca estão completamente isolados do espaço a sua volta, interagindo com a “nuvem” de elétrons ao redor do núcleo e com outros dipolos magnéticos. A presença dessa nuvem de elétrons se manifesta como um deslocamento na linha de ressonância, o qual é característico para a densidade dos elétrons e sua distribuição ao redor do núcleo e é denominado “deslocamento químico” (Veeman, 1997). Este é o principal parâmetro espectral utilizado na RMN, nos estudos de MOS. Utiliza-se sempre uma substância padrão, como por exemplo o tetrametilsilano (TMS). No caso da MOS, o TMS representa o zero na faixa de deslocamento químico e, a partir dele, vão sendo detectados os diferentes tipos de carbono presentes na amostra: alifáticos (tipo alcano ou alquil), alifáticos hidroxilados ou aminados (O-alquil) e alifáticos dehidroxilados, aromáticos e por fim, carbonilas (Wilson, 1990). Os tipos de carbono, ou grupos orgânicos, são então quantificados como proporções relativas da área total. Em verdade, o termo “semi-quantificados” é mais apropriado, conforme explicações apresentadas a seguir.

O curto tempo de relaxação (menor que 1ms), aplicado durante a análise, bem como os teores de carbono relativamente baixos da maioria dos solos minerais ($10\text{-}50\text{ g kg}^{-1}$), dificultam a quantificação da participação de cada grupo orgânico do material analisado (Kinchesh et al., 1995a). Além disso, o núcleo ^{13}C apresenta baixa abundância isotópica (1%) na natureza (Kinchesh et al., 1995b). Isto torna mais difícil sua polarização direta (direct-polarization em inglês, por isso a utilização da sigla DP), fazendo que experimentos deste tipo consumam muito tempo, o que os torna pouco viáveis. A técnica da polarização cruzada (cross-polarization, sigla CP) consiste em transferir a polarização do núcleo ^1H , muito mais abundante (99,9%), ao núcleo ^{13}C . Desse modo, obtêm-se absorções mais intensas dos carbonos ligados ao hidrogênio (alquilas, O-alquilas, CH aromáticos) e diminui-se o tempo de execução das análises, que, caso contrário, levariam várias horas (Dick et al., 2002). Portanto, devido ao fato de que a energia é transferida apenas indiretamente para o ^{13}C , a proporção relativa dos grupos orgânicos é considerada semi-quantitativa (Conte & Piccolo, 1997). A transferência de energia do núcleo do ^1H para o núcleo do ^{13}C durante o processo leva à existência de diferentes tempos de contato para cada núcleo de carbono. Isto significa que existirão diferentes tempos de indução para cada núcleo de

carbono. A fim de contornar este problema, pode-se avaliar o melhor tempo de contato para a aquisição de um espectro quantitativo de RMN de ^{13}C com CP, por meio da realização de experimentos com tempo de contato variável, encontrados na literatura internacional como Variable Contact Times (VCT) experiments. A obtenção de um tempo de contato ótimo para cada amostra pode minimizar erros na avaliação das áreas dos picos. Excelentes trabalhos nessa linha são os de Conte & Piccolo (1997) e Conte et al. (1997).

Na prática, a polarização cruzada resolve o problema da baixa abundância do isótopo ^{13}C , mas ao tornar a técnica semi-quantitativa, pode criar uma nova limitação perante os pesquisadores mais puristas. Entretanto, para atender aos objetivos da maioria dos estudos de MOS, a comparação entre as porcentagens relativas dos grupos orgânicos em diferentes amostras permite que se faça importantes inferências sobre, por exemplo, diferentes sistemas de cultivo e manejo do solo e seu efeito sobre a decomponibilidade/estabilidade da MOS.

A presença de altas concentrações de íons paramagnéticos nas amostras de solo, como por exemplo o Fe^{+3} , pode causar o encurtamento do tempo de relaxação do próton do núcleo, o que leva à perda de sinal do núcleo do carbono (Wilson, 1987). Pré-tratamentos das amostras com ácidos fortes, como o HF e o HCl, podem ser utilizados para a remoção de boa parte desses íons, minimizando seu efeito (Skjemstad et al., 1994; Dai & Johnson, 1999).

A técnica do Ângulo Mágico do spin ou Magic Angle Spinning (MAS) consiste na rotação da amostra em torno de um determinado ângulo, de modo a reduzir interações anisotrópicas, e conseqüentemente, melhorar a resolução dos espectros (Kentgens, 1997). Pode ser aplicada para amostras sólidas e apresenta como vantagem o fato de que a matéria orgânica não precisa ser extraída do solo (Hemminga & Buurman, 1997). Os espectros de RMN de ^{13}C com CPMAS geralmente apresentam bandas laterais provocadas pela utilização do MAS, as quais reduzem a intensidade do sinal da linha principal ou banda central. Uma alternativa para minimizar em parte este problema é a utilização da CPMAS com TOSS (Total Sidebands Supression) (Dixon et al., 1982), mas é importante ressaltar que a TOSS resolve o problema apenas parcialmente, pois a intensidade suprimida nas bandas laterais ainda aparece em parte, na banda central (Schmidt-Rohr & Spiess, 1994).

Em síntese, apesar das limitações que ainda existem, com o advento dessas duas ferramentas (Polarização Cruzada e Ângulo Mágico do spin, geralmente

identificadas em conjunto pela sigla CPMAS), os estudos de RMN de ^{13}C ganharam muito em qualidade, já que tais técnicas permitem obter espectros com boa resolução para ^{13}C em amostras sólidas (Preston, 1996).

Aplicações da RMN de ^{13}C com CPMAS

A técnica de RMN de ^{13}C no estado sólido com CPMAS pode ser aplicada para determinar a composição relativa dos grupos orgânicos de interesse, mediante integração das absorções desses grupos nas regiões específicas do espectro. Em geral, as absorções dos grupos são integradas utilizando-se a rotina de integração do espectrômetro. Dessa forma, obter-se-á um valor de proporção relativa, ou seja, um valor em porcentagem da contribuição de cada grupo orgânico (ou tipo de carbono) para a estrutura do material analisado. Considera-se, a título de integração, as seguintes faixas de deslocamento químico: alquilas (0-46 ppm), O-alquilas (46-110 ppm), aromáticos (110-160 ppm) e carbonilas/acilas (160-220 ppm) (Wilson, 1987). Entretanto, é possível encontrar na literatura trabalhos com pequenas variações nessas faixas (Baldock et al., 1992; Conte & Piccolo, 1997; Conte et al., 1997; Dai & Johnson, 1999; Guggenberger & Zech, 1999; entre outros).

A Fig. 1 e a Tabela 1, adaptadas de Alcântara et al. (2004), mostram, respectivamente, espectros de RMN de ^{13}C com CPMAS para serapilheira e MOS extraída do solo (extração alcalina) (Fig. 1) e as proporções relativas de cada grupo de carbono para a estrutura da serapilheira e da MOS (Tabela 1). É interessante observar a existência de duas áreas distintas na região das O-alquilas (Fig. 1), as quais foram integradas e tratadas separadamente. Na contribuição relativa deste grupo (Tabela 1), as áreas dos dois picos são somadas. Os dois subgrupos equivalem, respectivamente, a carbonos alifáticos hidroxilados (ou aminados) e alifáticos dehidroxilados (Wilson, 1990).

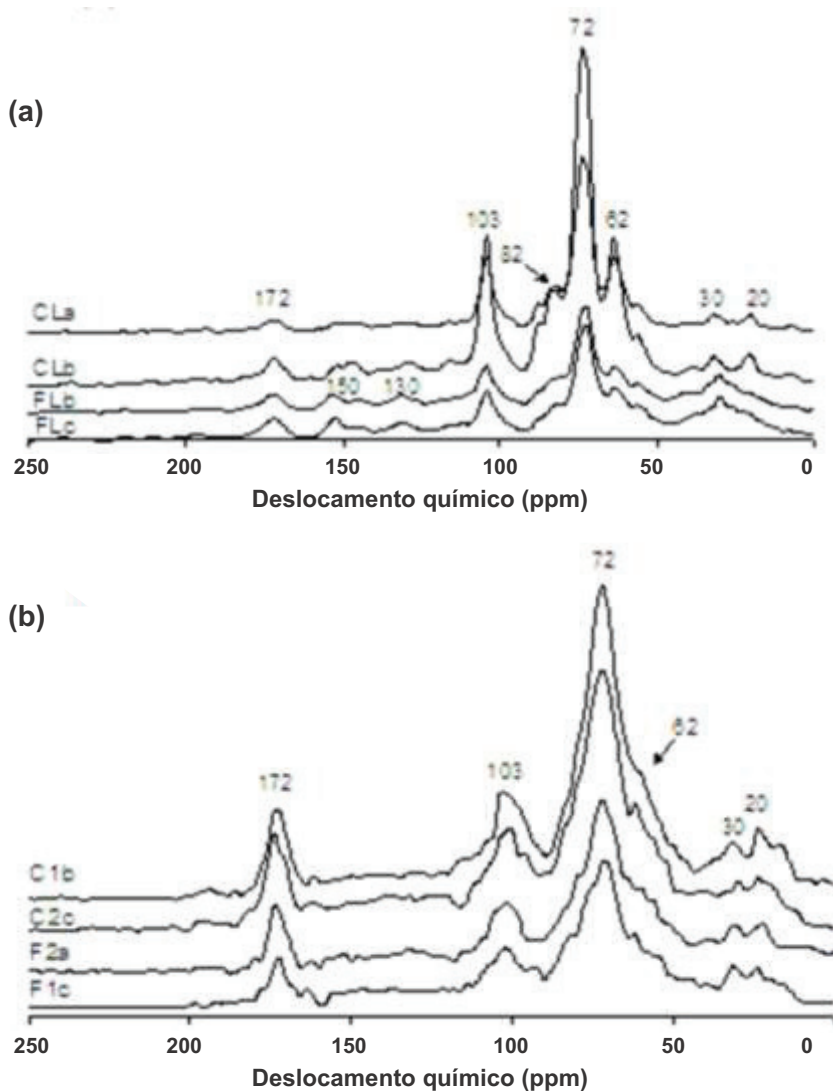


Fig. 1. Espectros de RMN de ^{13}C com CPMAS para amostras de serapilheita (a) e para substâncias húmicas extraídas de amostras de solo (b).

Legenda: CL = serapilheita do cerrado, FL = serapilheita da mata ciliar, C = substâncias húmicas extraídas do solo sob cerrado, F = substâncias húmicas extraídas do solo sob mata ciliar; a a d = blocos, 1 a 4 = profundidades de amostragem de solo. Ex.: CLa (serapilheita do cerrado no bloco a); C1b (substâncias húmicas extraídas de amostras da primeira profundidade do solo no bloco b).

Fonte: Alcântara et al. (2004).

Tabela 1. Áreas integradas dos grupos de carbono determinados por RMN de ¹³C com CPMAS, aromaticidade (arom), hidrofobicidade (hid), e razão alquilas/O-álquilas, em função da cobertura vegetal para serapilheira e Substâncias Húmicas (SH), independentemente da profundidade do solo⁽¹⁾.

Cobertura vegetal	Porcentagem da intensidade total				Arom ⁽²⁾	Hid ⁽³⁾	Alquilas / O-álquilas
	Carbonilas	Aromáticos	O-álquilas	Alquilas			
Cerrado	7,0	10,0 b	72,6 a	10,5 b	0,11 a	0,26 b	0,14 b
Mata	9,0	13,6 a	56,8 b	20,0 a	0,15 a	0,51 a	0,35 a
SH							
Cerrado	12,0	9,5 b	63,7 a	15,0	0,11	0,32 b	0,24
Mata	12,0	10,5 a	61,9 b	16,0	0,12	0,36 a	0,26

⁽¹⁾ Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tuckey a $p < 0,05$.

⁽²⁾ Aromaticidade = aromáticos / (alquilas + O-álquilas + aromáticos).

⁽³⁾ Hidrofobicidade = (aromáticos + alquilas) / (carbonilas + O-álquilas).

Fonte: Alcântara et al. (2004).

As regiões correspondentes aos grupos orgânicos, apresentam as absorções características em 30, 56, 72, 105, 119, 130, 150 e 175 ppm, respectivamente. Os sinais a 72 ppm e 105 ppm juntamente com 65 e 80-90 são, normalmente, identificados como polissacarídeos. O sinal amplo entre 30 e 55 ppm revela a presença de proteínas ou peptídeos. Os sinais em 56, 119, 130 e 150 ppm representam carbono metoxílico (CH_3O), carbonos aromáticos protonados, carbonos aromáticos substituídos e compostos fenólicos em lignina, respectivamente. A alta intensidade relativa do sinal a 130 ppm para o carbono aromático substituído mostra que a estrutura da lignina é altamente alterada e/ou que o material de outras fontes (p. ex. carvão) está presente no solo. O sinal a 175 ppm é derivado de grupos carboxílicos e aminos em vários compostos (Kögel-Knabner, 1997). Fabbri et al. (1998) assumiram que as estruturas derivadas de lignina são as principais responsáveis pela maioria das absorções na região dos carbonos aromáticos das frações húmicas de solo.

Kögel-Knabner (1997) divide, ainda, os compostos do tipo alquilas nas sub-regiões de 0 a 25, incluindo grupos metílicos e de 25 a 45, os grupos metilênicos (CH_2) de anéis e cadeias alifáticas. A região do carbono do tipo O-alquila (46-110 ppm), por sua vez, pode ser dividida em três sub-regiões: 46-60, incluindo grupos metoxílicos e C_6 de carboidrato e açúcares, além de C_α da maioria de aminoácidos; 60-90 ppm, incluindo estrutura de carboidrato; C_α de alguns aminoácidos e C-O de álcoois; e 90-110 ppm, incluindo carbonos anoméricos de carboidrato. Mahieu et al. (1999) incluíram os fenóis entre 150 e 160 ppm na região dos carbonos aromáticos (110-160 ppm). A região de 160-220 ppm compreende os grupos funcionais acilas (ácidos carboxílicos alifáticos, ácidos carboxílicos aromáticos, amidas e ésteres) e carbonilas (aldeídos e cetonas). Zhang et al. (1999) denominaram as regiões dos grupos orgânicos alquilas (0-50 ppm), O-alquilas (51-105 ppm), aromáticos (106-160 ppm) e carbonilas/acilas (161-200 ppm) respectivamente de: compostos alifáticos, carboidratos, compostos aromáticos, carbonílicos e carboxílicos. Quideau et al. (2000) atribuíram absorção a 21 ppm aos grupos metílicos terminais e a absorção a 31 ppm aos grupos alquilas presentes nos polimetilenos $[(\text{CH}_2)_n]$ de ácidos graxos, ceras e resinas respectivamente. A absorção a 135 ppm corresponde ao carbono substituído de carbonos aromáticos, enquanto as absorções a 147 e 155 ppm ao carbono fenólico. Os grupos funcionais acílicos ($\text{C}=\text{O}$) centraram-se a 173 ppm.

Caracterização estrutural de material vegetal

A dinâmica de decomposição do material vegetal está associada ao seu conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina e taninos. No entanto, apenas um número limitado de dados está disponível sobre a composição química detalhada de espécies comuns de plantas, cujos resíduos são incorporados ao solo. Esses estudos referem-se aos compostos alifáticos, principalmente as cutículas e outros lipídeos. Mas, a composição de ligninas complexas, como os polissacarídeos, não está bem elucidada nos estudos de composição química de tecidos vegetais. Esse fato aplica-se também aos componentes microbianos, especialmente lipídeos e melaninas, cuja estrutura e composição, não são conhecidas com detalhes. Um grande número de técnicas está disponível para análises de compostos específicos em material vegetal e nos resíduos microbianos, e podem ser aplicadas em estudos de biodegradação. Técnicas espectroscópicas não destrutivas, como a RMN de ^{13}C no estado sólido, podem identificar compostos e caracterizar eficientemente a composição química de material vegetal (Kögel-Knaber, 2002). Alterações nos grupos funcionais orgânicos durante a decomposição e a humificação dos resíduos, ao serem identificadas, permitem inferir sobre a dinâmica de decomposição do material vegetal adicionado ao solo (Baldock et al., 1992; Kögel-Knabner, 1997; Zech et al., 1997; Randall et al., 1997).

Composição química de serapilheira, espécies vegetais e partes de plantas

Por meio da análise de 84 espectros, Mahieu et al. (1999) confirmaram a predominância da região de O-alquilas em materiais de plantas, atribuindo à concentração de carboidratos, açúcares simples, amidos e celulose. Este grupo orgânico (O-alquilas) representou 70% a 90% do total de carbono em diferentes amostras de caules e madeira e um mínimo de 38% em serapilheira de folhas e raízes. Alcântara et al. (2004) assinalaram os picos obtidos próximos a 20 ppm em amostras de serapilheira de mata ciliar e material vegetal de cerrado como grupos acetilas (CH_3CO). Para todos os espectros, comprovou-se o predomínio da região das O-alquilas (46-110 ppm), seguida por alquilas, aromáticos e carbonilas.

Kögel-Knabner (2002) mostra diferenças relevantes entre os espectros de folhas e raízes de centeio e palha de trigo. Na palha de trigo, predominam os polissacarídeos (80%) e a concentração de carbonos aromáticos,

principalmente, de ligninas é significativamente inferior à da serapilheira de floresta. A proporção de alquilas (30 ppm), cujos sinais originam-se de lipídios, cutinas e peptídeos, é menor do que aquela verificada nas serapilheiras de coníferas e decíduas. O sinal a 22 ppm é resultado de grupos acetil em hemiceluloses. Resultados similares têm sido obtidos para palhada de outras espécies vegetais e para plantas forrageiras. O espectro de centeio comparativamente ao de palha de trigo mostra picos a 30 e 175 ppm, originários de alquilas, carboxilas e grupos amidos, provenientes de lipídeos e cutinas e, principalmente, de proteínas. As raízes dessas gramíneas distinguem-se pela alta concentração de polissacarídeos e baixo conteúdo de lignina e suberina. Isto é confirmado pela ausência de sinais a 30 ppm e baixa intensidade de sinais característicos de compostos aromáticos.

A variabilidade de composição química de resíduos de plantas é ilustrada na Tabela 2, adaptada de Kögel-Knabner (2002), na qual destacam-se as elevadas concentrações de compostos aromáticos das madeiras de pinus e de coníferas. Nas análises de RMN de ^{13}C com CPMAS foi observada uma grande variabilidade na composição de tecidos de plantas de florestas tropicais. Carbonilas representaram cerca de 5% a 10% do total de carbono. O conteúdo de carbonos aromáticos foi baixo e variou entre 10% e 15%. O conteúdo do carbono O-alquilas da serapilheira de folhas (cerca de 50%) foi menor do que o de madeiras, cascas e raízes (aproximadamente 75%). Correspondentemente, a contribuição de alquilas foi maior nas folhas (20% a 25%). Ligninas e taninos contribuíram para a intensidade dos aromáticos. Alguns constituintes de serapilheira, como os polissacarídeos e proteínas, são facilmente decomponíveis, mas a lignina, os polifenóis e algumas biomacromoléculas alifáticas são relativamente resistentes à quebra microbiana (Zech et al., 1997).

Na região do Cerrado, Carvalho (2005) utilizou RMN de ^{13}C com CPMAS para caracterizar estruturalmente material vegetal proveniente de diferentes plantas de cobertura/adubos verdes (guandu, mucuna-cinza, crotalária juncea, nabo-forrageiro e feijão-bravo-do-ceará). Espectros foram obtidos para o material vegetal intacto (anteriormente ao início do processo de decomposição) (T_0), aos 60 (T_1) e aos 90 dias (T_2) após a colocação de sacolas de serapilheira no campo (Fig. 2). Nos três espectros, observa-se a região de 0-45 ppm, que compreende os grupos alquilas relativos a CH_2 e a CH_3 de ácidos alifáticos e graxos. Nessa região dos espectros, a absorção predominante a 30 ppm corresponde aos CH_2 oriundos de ácidos carboxílicos alifáticos, lipídios e outros biopolímeros alifáticos. A região entre 30 e 60 ppm

Tabela 1. Composição de resíduos vegetais de diferentes espécies por meio de RMN de ^{13}C no estado sólido.

Material vegetal	Carbonila	Aromático	O-alquilas	Alquilas
	(210-160 ppm)	(160-110 ppm)	(110-45 ppm)	(45-0 ppm)
(%)				
Palhada de trigo	2,1	10,7	83,8	3,4
Palhada de cevada	1,2	11,6	83,9	3,0
Palhada de aveia	2,5	13,4	80,7	3,3
Palhada de centeio	3,3	12,6	80,0	4,0
Forragem	5,6	12,4	72,5	9,5
Madeira de pinus	0,7	19,0	78,9	1,4
Madeira de conífera	0,9	18,2	79,0	1,9

Fonte: Kögel-Knaber (2002).

relaciona-se à presença de proteínas ou peptídeos. Alcântara et al. (2004) citam que proteínas podem se sobrepor aos sinais de O-alquilas, registrados na região de 46-110 ppm. A região de 45-110 ppm comprovou representar a maior parte do carbono orgânico nos espectros dos materiais vegetais analisados (Fig. 2). Os maiores sinais nessa região de O-alquilas foram encontrados aproximadamente a 60 ppm, 70 ppm e 100 ppm, para a maioria das espécies vegetais estudadas, e correspondem aos polissacarídeos. A absorção a 70 ppm, presente na maioria das plantas de cobertura, nos três períodos, deve-se aos grupos C-O de carboidratos. A absorção a 105 ppm, também obtida para a maioria dos espectros das espécies vegetais nas três avaliações, é atribuída ao carbono anomérico e está de acordo com a caracterização de outros materiais vegetais por RMN de ^{13}C CPMAS (Golchin et al., 1995; Kögel-Knabner, 1997; Nierop et al., 2001; Alcântara et al., 2004). Na região obtida para carbonos aromáticos (110-160 ppm), incluem-se os fenóis entre 150 e 160 ppm. Os sinais dos espectros em estudo que ocorrem próximos a 130 e 150 ppm representam, respectivamente, os carbonos aromáticos e carbonos fenólicos presentes em lignina. Os sinais obtidos a 130 ppm foram pouco acentuados nos materiais vegetais analisados. A região entre 160 e 220 ppm compreende os grupos funcionais acilas (C=O) de ácidos carboxílicos alifáticos e aromáticos de amida e de éster apareceram em torno de 170 ppm nos espectros obtidos por RMN de ^{13}C CPMAS (Carvalho, 2005).

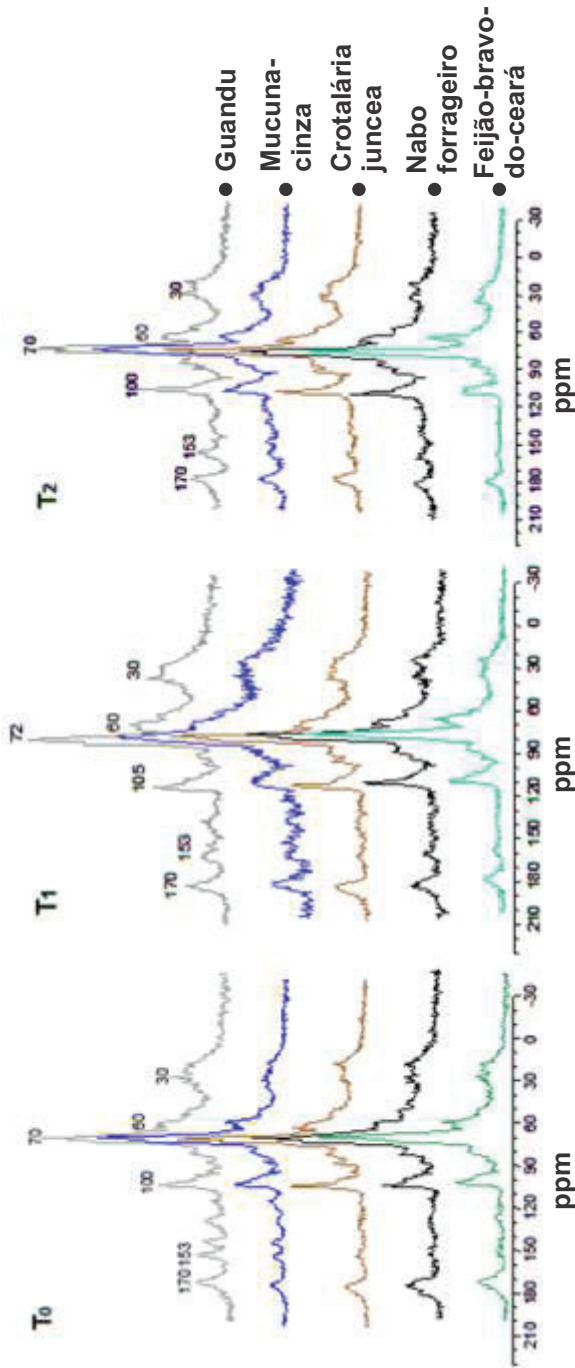


Fig. 2. Espectro de RMN de ^{13}C (CP/MAS) do material vegetal antes do início do experimento de decomposição (T_0) e dos resíduos vegetais aos 60 (T_1) e 90 (T_2) dias do início do experimento de decomposição.

Fonte: Carvalho (2005).

Dinâmica da composição química de resíduos vegetais durante o processo de decomposição

Pesquisas efetuadas em materiais, tanto de tecido vegetal quanto de solo, com natureza diferenciada, têm mostrado que a quantidade relativa de alquilas aumenta durante a biodegradação, principalmente, nas fases iniciais da decomposição (Golchin et al., 1995; Gregorich et al., 1996), enquanto a de O-alquilas diminui. Hopkins et al. (1997) mostrou decréscimo de 60% para 20% do total de carbono O-alquila e aumento de 5% para 19% de alquila no processo de decomposição do centeio. Em geral, a quantidade de componentes aromáticos permanece constante ou mantém tendências variáveis. Os anéis aromáticos de lignina são modificados, as regiões dos compostos fenólicos e da absorção em torno de 112 até 120 ppm decrescem (Preston, 1996; Kögel-Knabner, 1997; Nierop et al., 2001). Quideau et al. (2000) mostraram decomposição preferencial dos carboidratos da serapilheira e aumento em carbonilas (C=O) que é representativo do processo de decomposição oxidativa. Kögel-Knabner (2000) confirma que a decomposição das plantas envolve perda inicial de carboidratos (celulose e hemicelulose), seguida pela lenta transformação de estruturas aromáticas das moléculas de lignina e finalmente do carbono altamente recalcitrante (alquilas).

Para cultivos na região do Cerrado, a aplicação da RMN de ^{13}C para avaliar material vegetal é ainda limitada. Em trabalho recente nessa região, Carvalho (2005) constatou que os resíduos vegetais de guandu e de mucuna-cinza, com menor proporção de O-alquila (polissacarídeos) e a maior proporção de compostos aromáticos, resultaram em decomposição significativamente mais lenta (período mais longo de reciclagem) em relação aos de feijão-bravo-do-ceará, nabo-forrageiro e girassol (Tabelas 3 e 4).

A relação entre proporção dos compostos do tipo alquilas e O-alquilas no material vegetal de guandu, mucuna-cinza e crotalária juncea não seguiu o comportamento de incremento nos grupos dos alquilas e redução dos O-alquilas (Tabela 4) com a decomposição (Baldock et al., 1992; Golchin et al., 1995; Gregorich et al., 1996; Preston, 1996; Kögel-Knabner, 1997; Nierop et al., 2001). Provavelmente, a rápida biodegradação da maioria dos compostos hidrossolúveis e polissacarídeos dessa região, já tivesse ocorrido nos 60 dias iniciais, quando houve incremento na relação alquilas/O-alquilas dos resíduos das referidas espécies. A partir dos 60 dias predominou o ataque dos compostos estruturais, com a lenta redução de hidrossolúveis fenólicos e

hemiceluloses, e aumento relativo do conteúdo de ligninas e proteínas que pode perdurar por anos, dependendo da natureza do material e da presença dos grupos especializados de microrganismos (Waksman, 1952; Alexander, 1977; Gallardo & Merino, 1993; apud Correia & Andrade, 1999).

Uma hipótese para o “não-incremento no grupo dos alquilas e redução no grupo dos O-alquilas” com a decomposição é que a ação microbiana sobre a lignina, os polifenóis e algumas biomacromoléculas alifáticas relativamente resistentes à quebra (Zech et al. 1997) poderia estar alterando a relação alquilas/O-alquilas. Os microrganismos quebrariam seletivamente essas moléculas mais resistentes e os “fragmentos”, moléculas menores e de mais fácil decomposição aumentariam a proporção de O-alquilas com o tempo (Baldock et al., 1992). O material microbiano, constituído principalmente de carboidratos, também pode estar sendo adicionado no decorrer do tempo ao material de algumas espécies vegetais, sobretudo aquelas de mais difícil decomposição, como o guandu, aumentando a concentração de O-alquilas. Gregorich et al. (1996) atribuíram o acúmulo de alquilas e não de O-alquilas às estruturas microbianas ou aos seus metabólitos. Entretanto, estes autores analisaram a fração leve da matéria orgânica do solo sob cultivo de milho e não, o material vegetal como no presente estudo.

Tabela 3. Tempo necessário para decomposição de 50% e tempo de reciclagem de resíduos vegetais, sem incorporação e com incorporação no solo.

Espécies vegetais	Meia-vida (h) [*]		Tempo de reciclagem (?) ^{**}	
	Sem inc.	Com inc.	Sem inc.	Com inc.
	(Dias)			
Crotalária juncea	97	81	141	118
Feijão-bravo-do-ceará	86	76	123	110
Girassol	77	69	11	99
Guandu	136	107	196	154
Milheto	119	91	172	132
Mucuna-cinza	122	100	175	145
Nabo-forageiro	78	65	112	94
V. espontânea	108	81	156	116

* ($h = \ln 2/k$); ** ($\tau = 1/k$): onde k é coeficiente da equação exponencial ($TR = 100 * e^{k*(t)}$)

Fonte: Carvalho (2005).

Tabela 4. Distribuição relativa (%) dos grupos orgânicos do material e dos resíduos vegetais aos 60 e 90 dias do início do experimento de decomposição, por meio de RMN de ^{13}C CP/MAS.

Espécies vegetais	Porcentagem em relação aos grupos orgânicos											
	Carbonila/acila			Aromático			O-alquila			Alquila		
	0 d	60 d	90 d	0 d	60 d	90 d	0 d	60 d	90 d	0 d	60 d	90 d
Crotalária juncea	7,5 aAB	10,6 aA	4,1 aB	9,9 abA	8,3 bA	5,3 bA	69,2 aA	61,8 aB	70,1 aA	13,4 bB	19,3 bA	20,5 aA
Feijão-bravo	11,0 aA	6,8 aAB	5,9 aB	7,5 bcA	5,9 bA	6,2 bA	65,5 aA	68,4 aA	68,1 aA	16,0 bcB	18,9 bA	19,8 aA
Guandu	11,4 aA	7,8 aAB	4,7 aB	11,7 aA	11,4 aA	11,9 aA	56,4 bB	54,5 bB	64,3 bA	20,5 aB	26,3 aA	19,2 aB
Mucuna-cinza	6,7 aAB	7,5 aA	2,3 aAB	12,1 aA	13,1 aA	10,1 aA	67,5 aA	62,3 aA	67,0 aA	13,7 bB	18,9 bA	20,6 aA
Nabo forrageiro	10,5 aA	7,8 aA	2,9 aB	5,7 cA	7,5 bA	7,7 bA	65,9 aB	67,1 aAB	74,1 aA	17,9 acA	17,6 bA	15,3 bA

Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Carvalho (2005).

Vários estudos buscam estabelecer uma seqüência cronológica para composição dos resíduos. Gregorich et al. (2000) assinalaram a dominância da região O-alquilas num espectro de material vegetal e atribuíram-na à presença de celulose e outros polissacarídeos, proteínas e grupos propilas e metoxilas de ligninas. As grandes diferenças na composição química dos resíduos vegetais ocorreram devido à proporção de intensidade dos sinais observados nas regiões de alquilas e O-alquilas. Os resíduos de alfafa apresentaram mais alquilas e menos O-alquilas do que os de milho.

Golchin et al. (1995) determinaram o maior sinal para a fração densimétrica $< 1,6 \text{ Mg m}^{-3}$ ou fração livre, com espectro similar aos de material vegetal, na região de O-alquilas (46-110 ppm), representando 51-68% do total de carbono. As contribuições de grupos alquilas e aromáticos foram bem menores, com 14-20% e 13-23%, respectivamente.

Gregorich et al. (1996) aplicando a técnica de RMN de ^{13}C com CPMAS indicaram que a camada superficial de solo sob milho, apresentou menor proporção relativa de O-alquilas e alquilas e mais de grupos aromáticos e carboxílicos do que a superfície do solo sob floresta. Uma menor quantidade de carboidratos e maiores concentrações de ésteres na fração leve do solo assinalou estágios mais avançados de decomposição da matéria orgânica. Os autores desta pesquisa atribuíram o acúmulo de alquilas na fração leve do solo sob cultivo de milho às estruturas microbianas ou aos seus metabólitos. Enquanto Preston (1991; 1996) sugere que os fatores climáticos podem exercer maiores efeitos do que a composição original das plantas sobre a natureza dos ácidos húmicos. Elevadas quantidades de chuva e lixiviação excessiva removem fragmentos de lignina, e por isso, atrasam ou impedem o desenvolvimento da sua aromaticidade.

Segundo Kögel-Knabner (2000), a aplicação de RMN com ^{13}C CPMAS mostrou um padrão para a matéria orgânica da superfície de floresta, com acentuada influência dos sinais das plantas que compõem sua serapilheira (polissacarídeos, ligninas e biopolímeros alifáticos). Além disso, esta pesquisa confirma que a decomposição das plantas envolve uma perda inicial de carboidratos (celulose e hemicelulose), seguida pela lenta transformação de estruturas aromáticas das moléculas de lignina e finalmente do carbono altamente recalcitrante (alquilas) corroborando com Baldock et al. (1992).

Nierop et al. (2001) mostraram que a região dos carbonos aromáticos decresce das raízes para o solo, implicando em uma baixa entrada ou uma rápida degradação de ligninas e taninos no solo.

Considerando a influência da natureza do material no processo de decomposição, Baldock et al. (1992) sugeriram um índice obtido da razão entre alquilas e O-alquilas para explicar a dinâmica de decomposição. Além desta, outras relações entre os grupos orgânicos podem ser utilizadas, como a aromaticidade e a hidrofobicidade, sendo: aromaticidade = aromáticos/(alquila+O-alquila + aromáticos) e hidrofobicidade = (aromáticos + alquila)/(carbonila/acila + O-alquila). Essas três razões têm sido aplicadas em estudos de RMN de ^{13}C CPMAS para complementar as informações obtidas da composição química de material vegetal e de matéria orgânica do solo (por ex. Alcântara et al., 2004; Carvalho, 2005).

No Brasil, em estudo realizado no Rio Grande do Sul com dez sistemas de cultura em plantio direto, Pillon (2000) avaliou alterações estruturais nas frações orgânicas com o avanço da humificação, utilizando a RMN de ^{13}C CPMAS, nos sistemas de cultura pousio/milho, guandu/milho e lablab/milho e numa área de campo nativo como referência. Foram adquiridos espectros das plantas inteiras (milho no primeiro sistema, guandu no segundo e lablab no terceiro), dos resíduos dessas plantas, das frações densimétricas leve livre e leve oclusa e dos ácidos húmicos extraídos. Modificações nas contribuições de alquilas e O-alquilas foram bastante evidentes. Considerando a seqüência planta inteira - ácidos húmicos, houve uma redução progressiva no conteúdo de O-alquilas, acompanhada de aumento no conteúdo de alquila. Dessa forma, a razão O-alquil/alquil diminuiu na ordem planta inteira - ácidos húmicos, demonstrando potencial como medida do grau de decomposição ou humificação de compostos orgânicos, principalmente em estágios iniciais de decomposição.

Outras aplicações de RMN ao estudo de material vegetal

Métodos de RMN in vivo (técnicas não destrutivas) são freqüentemente aplicadas para fornecer informações sobre a concentração absoluta de metabólitos, incluindo sacarose, glicose 6-P e fosfatos inorgânicos, assim como suas mudanças durante transformações bioquímicas nos processos de metabolismo de plantas. Essa técnica também é utilizada para se determinar pH intracelular em uma variedade de células e tecidos. A interface entre a técnica de RMN espectroscópica e de imageamento estabelece um grande potencial de estudo para vários processos fisiológicos, de crescimento, desenvolvimento, fluxo de água e interações ambientais (Bligny & Douce, 2001).

Um potencial de destaque para a técnica de RMN de ^{13}C CPMAS em agroecossistemas é inferir sobre a dinâmica de decomposição de resíduos vegetais adicionados ao solo, seja incorporados ou no sistema plantio direto, com base na sua composição química em relação à natureza dos grupos orgânicos.

Caracterização estrutural da matéria orgânica do solo

A ênfase inicial na utilização de RMN de ^{13}C em estudos de MOS utilizando-se frações extraídas quimicamente, isto é, os ácidos húmicos e fúlvicos, ocorreu principalmente devido à necessidade de se isolar a MOS em frações que fossem solúveis e apresentassem alta concentração de carbono (Preston, 1996). Entretanto, atualmente pode-se afirmar que uma das maiores vantagens dessa técnica, não-destrutiva por princípio, é a não necessidade de extração da matéria orgânica do solo, o que significa que é possível obter espectros de boa resolução mesmo em amostras de solo intacto (ou inteiro). Assim, a técnica tem sido empregada em estudos de MOS utilizando uma ampla gama de materiais: solo intacto, frações físicas de tamanho de partícula e densimétricas, substâncias húmicas extraídas do solo (sem posterior fracionamento), bem como nas frações húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas). De todo modo é importante que se leve em consideração a maior complexidade de aplicação da técnica em solo intacto e frações físicas. Esta complexidade está relacionada principalmente à alta interferência da fração mineral nesse tipo de amostra. Conforme discutido anteriormente, o pré-tratamento das amostras com HF ou HCl é uma alternativa para se reduzir o teor de material inorgânico (cinzas), permitindo assim que se obtenha espectros de melhor resolução, com menos ruído. Esse pré-tratamento, na verdade, concentra a matéria orgânica. Mesmo quando se utiliza a extração química das substâncias húmicas (com ou sem posterior fracionamento em ácidos húmicos e fúlvicos), o que teoricamente representa a concentração do material orgânico, pode haver necessidade de redução do teor de cinzas. A desvantagem do tratamento com ácidos é que, durante o procedimento, pode-se perder também material orgânico, principalmente quando o tratamento é repetido muitas vezes. Dick et al. (2005) em amostras de Latossolo Vermelho (Santo Ângelo, RS e Passo Fundo, RS), Latossolo Bruno (Vacaria, RS) e Latossolo Amarelo (Brasília, DF, Manaus, AM e

Irlanduba, AM) demonstraram que o tratamento com HF repetido oito vezes aumentou as concentrações de carbono e nitrogênio e, como a razão C/N não sofreu modificações consistentes após o tratamento, nenhum dos dois elementos parece ter sido extraído seletivamente, em detrimento do outro, mesmo porque a tendência de diminuição da razão C/N com a profundidade do solo foi mantida. Assim, os autores consideraram que os espectros de RMN de ^{13}C e ^{15}N representavam bem a MOS no solo. No entanto, amostras sem tratamento não foram submetidas à espectroscopia. Alguns anos antes, Gonçalves et al. (2003), ao compararem espectros de amostras de horizontes A e B de Latossolo Vermelho (Santo Ângelo, RS e Passo Fundo, RS), de Latossolo Bruno Bruno (Vacaria, RS) e de Latossolo Amarelo (Brasília, DF), não tratadas e tratadas com HF 10% (com 2, 4, 6 ou 8 repetições), demonstraram que, apesar de altas perdas de carbono, mesmo com oito repetições, não ocorreram alterações consistentes na distribuição dos grupos de carbono, sugerindo que perdas preferenciais de grupos específicos não foram induzidas. Na prática, ainda não há consenso sobre a perda proporcional do material orgânico entre os diferentes grupos de carbono.

Dai & Johnson (1999), por exemplo, demonstraram que carboidratos e carboxilas são preferencialmente extraídos durante a concentração da MOS com HF. Os autores concluem que parece ser prematura a recomendação desse pré-tratamento como rotina objetivando melhorar a qualidade dos espectros de RMN.

Não obstante as maiores dificuldades de utilização da técnica em amostras de solo intacto ou frações físicas e a necessidade de redução do teor de cinzas nessas amostras, bem como em frações extraídas quimicamente, a RMN de ^{13}C com CPMAS tem sido cada vez mais utilizada nos estudos de MOS. Tais estudos, além de contribuir para a elucidação da natureza do material vegetal e sua influência nos processos de formação e decomposição da MOS, têm proporcionado um melhor entendimento sobre a estrutura química da matéria orgânica e sobre os efeitos que as mudanças no uso da terra e nos sistemas de cultivo podem exercer sobre a qualidade da MOS.

Investigações sobre a estrutura química dos componentes da MOS

A MOS não é um componente do solo previsível e facilmente compreensível. Entretanto, o desenvolvimento atual das técnicas de caracterização torna possível quantificar e qualificar os componentes dessa “caixa preta” do solo, levando a um melhor entendimento de sua estrutura química. Neste contexto, a RMN de ^{13}C tem se destacado como uma técnica de grande potencial.

Muitos trabalhos utilizando a RMN de ^{13}C com CPMAS têm sido realizados com o objetivo de investigar a estrutura química dos componentes da MOS e, assim, poder elucidar seu comportamento. Fabbri et al. (1998) empregaram RMN de ^{13}C com CPMAS para investigar a estrutura química de ácidos húmicos e huminas provenientes de materiais de solo, sedimentos recentes de lagos, lagoas e mar. Os autores procuravam relações estruturais entre essas duas frações nos diferentes ambientes estudados, fossem eles terrestres ou marinhos. As huminas, correspondentes à fração mais recalcitrante e pouco investigada da MOS, mostraram-se estruturalmente diferentes dos ácidos húmicos, apresentando-se mais ricas em compostos alifáticos, enquanto mais pobres em carboxilas.

Veeken et al. (2000) caracterizaram os ácidos húmicos extraídos de lixo orgânico proveniente da separação seletiva de lixo doméstico municipal na Holanda, a fim de elucidar o processo de compostagem desse material. Os autores ressaltam a importância de se conhecer não só a quantidade, mas também a qualidade da matéria orgânica disponível e solúvel nesse tipo de insumo, para que se possam avaliar os possíveis benefícios de seu uso. A caracterização estrutural dessa fração do material orgânico por RMN de ^{13}C com CPMAS proveu informações quantitativas e qualitativas sobre os grupos orgânicos formadores dos ácidos húmicos.

A RMN de ^{13}C com CPMAS também tem sido utilizada com sucesso na elucidação da formação de horizontes espódicos durante a podzolização, isto é, na gênese dos Espodossolos. Bons exemplos são dois trabalhos realizados na Alemanha: Beyer (1996) empregou a técnica para investigar possíveis efeitos das propriedades do solo na composição da MOS e na formação desses horizontes. Schmidt et al. (2000) utilizaram a RMN de ^{13}C com CPMAS para caracterizar a composição química da MOS em amostras de solo intacto e de frações granulométricas de horizontes espódicos. Na Holanda, a técnica também foi utilizada para avaliar o efeito da vegetação sobre a composição de

horizontes H de espodossolos (Nierop et al., 1999). Outra aplicação da técnica é na elucidação das interações entre MOS e argilo-minerais. Wattel-Koekkoek et al. (2001) compararam a caracterização estrutural da MOS associada à caulinita e à esmectita em amostras de solos caulíníticos e esmectífticos provenientes de vários países. Dick et al. (2000) aplicaram RMN de ^{13}C na caracterização de ácidos húmicos extraídos de um Brunizem e de uma amostra de carvão de mina, a fim de caracterizá-los estruturalmente e, assim, elucidar quais os principais grupos funcionais envolvidos na adsorção dessa fração quando em contato com um Latossolo Roxo distrófico, tratado ou não com oxalato de amônio. A RMN permitiu verificar que o ácido húmico extraído do carvão apresentava um caráter aromático mais acentuado e maior porcentagem de carboxilas, sendo adsorvido em maior quantidade do que aquele extraído do Brunizem.

Em solos de área urbana, Beyer et al. (1996) utilizaram RMN de ^{13}C com CPMAS para identificar possíveis alterações na MOS provocadas pelo uso urbano dos solos, por meio da comparação com os mesmos em sistema natural. Os autores avaliaram áreas como depósitos de lixo, florestas públicas e hortas particulares dentro do perímetro urbano de Kiel (Alemanha). Os resultados encontrados indicam importantes modificações na gênese da MOS em ambiente urbano, como por exemplo alta aromaticidade da MOS total e dos compostos húmicos em área sob horticultura. No Brasil, estudo semelhante foi conduzido por Canellas et al. (2000), que utilizando ^{13}C RMN CPMAS, juntamente com outras técnicas espectrosópicas e microscopia de varredura, caracterizaram físico-quimicamente ácidos húmicos extraídos de composto de resíduos sólidos urbanos e de lodo de estação de tratamento de esgoto. Os autores constataram que a natureza química dos ácidos húmicos em tais fontes não-pedogênicas pode ser considerada “análoga” aos encontrados nas fontes pedogênicas.

Esses trabalhos são exemplos específicos de estudos que objetivavam investigar a estrutura química das frações que compõem a MOS ou sua interação com a fração mineral. No entanto, todos os trabalhos sobre os efeitos de alterações no tipo de vegetação ou nos sistemas de cultivo e nas práticas de manejo do solo sobre a MOS, obrigatoriamente caracterizam-na estruturalmente.

Investigações sobre a influência das mudanças na vegetação e dos sistemas de cultivo sobre a qualidade da MOS

No item “**Dinâmica da composição química de resíduos vegetais durante o processo de decomposição**” foi visto que em muitos estudos de MOS com aplicação da RMN de ^{13}C com CPMAS utiliza-se a seqüência material vegetal - solo inteiro e/ou frações físicas ou extraídas quimicamente. Exemplos são os trabalhos de Golchin et al. (1995); Golchin et al. (1997); Gregorich et al. (1996); Gregorich et al. (2000); Pillon, (2000); Nierop et al. (2001) e Alcântara et al. (2004), os quais demonstram que a composição química da MOS é grandemente influenciada pelo material vegetal que lhe dá origem. Este fato, aliado às técnicas de fracionamento e extração da MOS, permite que sejam realizados estudos sobre o efeito tanto de mudanças no tipo de vegetação (p.ex.: floresta-pastagem), quanto de diferentes sistemas de cultivo sobre a qualidade da MOS. Tais estudos podem subsidiar a adoção de práticas mais conservacionistas, as quais possibilitem a melhoria da qualidade do solo e seu uso sustentável, considerando-se que a MOS é reconhecida como componente-chave da qualidade do solo (Doran, 1997) e da sustentabilidade dos sistemas, sejam eles naturais ou antropizados (agrossilvopastoris).

Golchin et al. (1997) semi-quantificaram os grupos de carbono por RMN ^{13}C com CPMAS presentes em solo intacto, fração < 53m, resíduos remanescentes depois de foto-oxidação da fração < 53m e fração ácidos húmicos. Os autores observaram um decréscimo no conteúdo de carbono aromático e um aumento nos grupos alquilas quando áreas com gramíneas foram ocupadas por floresta, indicando que a matéria orgânica produzida sob floresta é mais enriquecida com alquila do que aquela sob gramíneas. Tais mudanças na composição orgânica resultaram do corte da vegetação e de práticas de manejo que incluem o fogo. Resultado semelhante foi encontrado por Alcântara et al. (2004). Oito anos após a retirada da vegetação de Campo Sujo, predominado por gramíneas, e do subsequente plantio de espécies de mata ciliar, a matéria orgânica extraída do solo passou a apresentar menor proporção de O-alquilas e maior de grupos aromáticos. Esses dois estudos comprovam a influência do tipo de material vegetal adicionado ao solo sobre a composição química da matéria orgânica.

A não detecção de diferenças em estudos comparativos também pode levar a inferências sobre a dinâmica do processo de decomposição. Guggenberger et

al. (1999) investigaram os efeitos do estabelecimento de uma floresta secundária, em uma área de pastagem abandonada, sobre a qualidade da MOS, mediante o fracionamento físico do solo e a extração da MOS por solução de NaOH. O material orgânico extraído foi dissolvido para ser analisado em RMN de ^{13}C em solução. Foram coletadas amostras de solo em áreas de floresta primária, pastagem e floresta secundária com diferentes tempos de estabelecimento (3,5; 12,5 e 18,5 anos) na Costa Rica. O abandono da pastagem com o posterior surgimento da floresta secundária resultou em aumento do teor de carbono em todas as frações, de acordo com o tempo de estabelecimento. No entanto, considerando-se os aspectos qualitativos da MOS, a comparação dos espectros não mostrou diferenças consistentes na caracterização estrutural (RMN de ^{13}C) do carbono extraído por NaOH nas diferentes áreas. Esse resultado foi corroborado por determinações químicas de lignina (oxidação alcalina com CuO) e carboidratos (hidrólise por ácido trifluoroacético) na fração leve da MOS e nas frações separadas por tamanho de partícula. Os autores atribuem o fato à localização da MOS na matriz do solo, já que a composição química das frações permaneceu quase inalterada.

A RMN de ^{13}C com CPMAS foi utilizada por Gregorich et al. (1996) para caracterizar a MOS em dois sistemas, um não antropizado e outro antropizado: floresta e lavoura de milho (25 anos de cultivo). Foram analisadas amostras de resíduos das plantas (espécies florestais e milho), solo intacto da superfície (0-5 cm) e da subsuperfície (30-50 cm) e frações isoladas por densimetria (em solução de NaI) e tamanho de partículas. As diferenças encontradas na qualidade da MOS entre os dois sistemas refletiram os efeitos do desflorestamento e do cultivo contínuo sobre a estrutura da matéria orgânica, como a presença de material mais recalcitrante no subsolo sob cultivo: na subsuperfície do solo sob milho a contribuição relativa de O-alquilas e alquilas é significativamente menor do que no solo sob floresta, ao mesmo tempo em que a de aromáticos e carbonilas é maior.

É consenso que os sistemas de cultivo são determinantes do teor, e conseqüentemente dos estoques, de carbono do solo. No entanto, vários trabalhos se dedicam a mostrar que a qualidade da MOS também é fortemente dependente do manejo do solo. Em estudo comparativo entre um sistema de monocultivo de milho com um sistema de rotação de culturas, baseado no uso de leguminosas, Gregorich et al. (2000) mostraram que a matéria orgânica sob a rotação com leguminosas apresentou maior conteúdo

de carbonos aromáticos em relação à monocultura de milho. Os autores atribuem esse carbono preservado à entrada dos resíduos das raízes das leguminosas, além do C que já existia do milho, resultando em mais C aromático após a decomposição dos carboidratos.

Ácidos húmicos extraídos em amostras de solo de áreas sob plantio direto e convencional estabelecidos há onze anos e de área sob mata nativa foram analisados por RMN de ^{13}C com CPMAS (Martin Neto et al., 1995). A aromaticidade dos ácidos húmicos seguiu a seqüência plantio direto > plantio convencional > mata, o que pode ter ocorrido devido ao acúmulo de ácidos húmicos mais aromáticos no primeiro sistema, provavelmente causado por uma menor taxa de decomposição dos resíduos e de incorporação do carbono nas substâncias húmicas. Ainda no sistema plantio direto, Bayer et al. (2000) avaliaram o efeito de dez sistemas de cultivo, baseados na rotação cultura de inverno/milho em comparação a sistemas pousio/milho, sobre a estrutura da MOS. Os autores, utilizando RMN de ^{13}C com CPMAS e Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), encontraram uma relação estreita e inversa entre a quantidade de resíduos adicionada ao solo pelos sistemas e a aromaticidade dos ácidos húmicos, o que indica a possibilidade de ocorrência da incorporação recente de compostos alifáticos às substâncias húmicas do solo em sistemas com grande potencial de adição de resíduos.

Por outro lado, Pillon (2000), comparando os sistemas de culturas guandu/milho, lablab/milho, pousio/milho entre si e com uma área de campo nativo, observaram que a composição química dos ácidos húmicos, determinada por RMN de ^{13}C com CPMAS e EPR, foi pouco afetada pelos sistemas de cultura, e sugere que isto poderia ter ocorrido, devido à elevada contribuição de produtos do metabolismo microbiano que interagem com a matriz mineral e a maior estabilidade coloidal dos ácidos húmicos. No entanto, no que diz respeito às frações densimétricas, a fração orgânica protegida no interior dos agregados (fração leve oclusa) apresentou maior conteúdo de alquilas e carbono aromático e menor conteúdo de O-alquilas do que a fração leve livre, indicando o maior avanço da decomposição. Nos sistemas guandu/milho e lablab/milho, a incorporação de resíduos menos humificados no interior dos agregados influenciou a composição química da fração leve oclusa. A última apresentou maior conteúdo de O-alquilas e menor de alquilas, em relação ao sistema de referência (pousio/milho), o que está de acordo com a incorporação recente de matéria orgânica menos humificada nos sistemas leguminosas/milho. Esses resultados demonstram que o tipo de material

analisado desempenha um importante papel na detecção de diferenças entre sistemas. Pérez et al. (2004) também não encontraram alterações significativas nos ácidos húmicos extraídos por NaOH de amostras de solo coletadas na camada de 0-5 cm de um Latossolo de São Paulo. Foram comparados diferentes sistemas de cultivo com cinco anos de duração (convencional com milho/pousio, convencional milho em rotação com soja/pousio, direto com milho em rotação com soja/pousio e direto com milho/guandu) com uma área adjacente sob vegetação nativa. Os espectros de RMN de ^{13}C mostraram que a porcentagem relativa de compostos aromáticos esteve em torno de 30% para todas as amostras, independente do sistema de cultivo. No entanto, quando comparados com amostras de área sob vegetação nativa, a porcentagem de aromáticos caiu para 24%, enquanto a porcentagem de alquilas aumentou. Os autores constataram que o efeito do acúmulo constante de resíduos vegetais mostrou ser mais importante do que o tempo de cultivo e sugerem que o alto teor de argila (530 g kg^{-1}) pode ter protegido os complexos MOS-óxidos de ferro contra alterações estruturais.

A RMN de ^{13}C com CPMAS e a EPR foram utilizadas por Dick et al. (2005), para caracterizar a composição química da MOS em perfis de latossolos sob vegetação nativa das regiões Sul, Amazônica e do Distrito Federal. Todos os perfis apresentaram quantidades consideráveis de estruturas consideradas facilmente decomponíveis como O-alquilas, com baixa aromaticidade. Os autores objetivaram ainda investigar a interação organo-mineral nesses solos de mineralogia predominantemente caulinitica e oxidica. Seus resultados demonstraram que a MOS parece ser estabilizada mediante, principalmente, sua interação com os óxidos de ferro e alumínio e a caulinita. O grau de humificação (inferência a partir dos resultados da EPR) demonstrou que a estabilização da MOS pelas interações organo-minerais tende a aumentar em profundidade. Por outro lado, apontam a atuação dos exsudados de raízes e de raízes em decomposição como uma possível causa para a diminuição do grau de decomposição da MOS em profundidade, o que, no entanto, não pôde ser verificado no trabalho.

Assim como alguns dos trabalhos acima relacionados (Dick et al., 2005; Bayer et al., 2000; Pillon, 2000), vários estudos em MOS têm aliado outras técnicas à RMN de ^{13}C com CPMAS. O objetivo muitas vezes é comparativo, mas na maioria dos casos a utilização de duas ou mais técnicas em conjunto é realizada no sentido de se obter resultados sejam complementares, e portanto, mais abrangentes e conclusivos.

Além de outras técnicas espectroscópicas, técnicas isotópicas e termogradativas podem ser utilizadas em conjunto com a RMN de ^{13}C . Quideau et al. (2000) empregaram a medição do ^{14}C , juntamente com a RMN de ^{13}C com CPMAS TOSS, para elucidar a influência da vegetação nos processos de decomposição e formação da MOS. Neste caso, a análise isotópica foi utilizada para se avaliar as taxas de reciclagem do carbono. Golchin et al. (1995) utilizaram três técnicas em conjunto, visando avaliar a estrutura e a dinâmica da MOS em solos sob pastagem e floresta: RMN de ^{13}C com CPMAS, abundância natural de ^{13}C (razão isotópica entre ^{13}C e ^{12}C) e pirólise com espectrometria de massa. Esta última é uma técnica termogradativa, que vem sendo cada vez mais utilizada em estudos de MOS com diferentes enfoques, em conjunto com o RMN de ^{13}C (Beyer, 1996; Fabbri et al., 1998; Zhang et al., 1999; Nierop et al., 1999; Veeken et al., 2000; Nierop et al., 2001b; Wattel-Koekkoek et al., 2001; Canellas et al., 2002; Alcântara et al., 2004) e será detalhada em outro capítulo.

Desafios e Perspectivas

Conforme visto aqui, existem ainda limitações ao emprego da RMN de ^{13}C na pesquisa científica. Tais limitações começam pelo alto custo de aquisição e manutenção dos equipamentos. No Brasil, são poucas as universidades e os centros de pesquisa que dispõem de aparelho para ressonância magnética nuclear. De forma geral, é necessário que a demanda por análises seja alta o suficiente para que se justifique a aquisição do equipamento. Na Ciência do Solo, especificamente, ainda existem algumas limitações de caráter técnico, como a falta de pessoal treinado, tanto para o manuseio do aparelho e realização das determinações, quanto para a interpretação dos resultados. Este quadro está se transformando aos poucos, visto o número crescente de trabalhos com a aplicação de RMN de ^{13}C em estudos de MOS.

A própria ferramenta em si ainda apresenta algumas limitações, conforme discutido anteriormente. Entretanto, muitos têm sido os pesquisadores dedicados ao estudo de alternativas que possam melhorar a resolução dos espectros de RMN e contornar problemas como os altos teores de íons paramagnéticos (como por exemplo o ferro, naturalmente presente nos Latossolos Brasileiros) nas amostras. Com esse esforço, têm sido obtidos

resultados bastante significativos, principalmente no que diz respeito ao melhor entendimento dos processos de formação, decomposição e humificação da MOS, e aos efeitos dos sistemas agrícolas sobre sua qualidade.

Para os próximos anos, as perspectivas são de avanço, não apenas na RMN, bem como em todas as técnicas espectroscópicas, e de maior utilização das mesmas na caracterização estrutural da MOS e da sua dinâmica de decomposição, como ferramenta para se avaliar a sustentabilidade de sistemas naturais e agrícolas.

Referências

ALCÂNTARA, F. A. de; BUURMAN, P.; CURI, N.; FURTINI NETO, A. E.; LAGEN, B. van; MEIJER, E. Changes in soil organic matter composition after introduction of riparian vegetation on shores of hydroelectric reservoirs (Southeast Brazil). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 197-1508, 2004.

BALDOCK, J. A.; OADES, J. M.; WATERS, A. G.; PENG, X.; VASSALO, A. M.; WILSON, M. A. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 16, p. 1-42, 1992.

BARTON, D. H. R.; SCHNITZER, M. A new experimental approach to the humic acid problem. **Nature**, London, v. 198, p. 217-218, 1963.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUCK, J.; CERETTA, C. A. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 53, p. 95-104, 2000.

BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PILLON, C. N.; SANGOI, L. Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-till cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 1473-1478, 2001.

BEYER, L. Soil organic matter composition of spodic horizons in Podzols of the Northwest German Lower Plain. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 181, p. 167-180, 1996.

BEYER, L.; CORDSEN, E.; BLUME, H. P.; SCHLEUSS, U.; VOGT, B.; WU, Q. Soil organic matter composition in urbic anthrosols in the city of Kiel, NW-Germany, as revealed by wet chemistry and CPMAS ^{13}C NMR spectroscopy of whole soil samples. **Soil Technology**, Cremlingen, v. 9, p. 121-132, 1996.

BLIGNY, R.; DOUCE, R. NMR and plant metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 4, p. 191-196, 2001.

CANELLAS, L. P.; MORAES, A. A.; RUMJANEK, V. M.; GARCIA, M. R.; GURIDI, F.; SANTOS, G. A.; VELLOSO, A. C. X.; BRAZ-FILHO, R. Structural features of humic acids isolated from soils amended with urban organic residues: na elemental composition, ^{13}C NMR and Py-GC/MS analysis. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 26, p. 333-341, 2002.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; MORAES, A. A.; RUMJANEK, V. M.; OLIVARES, F. L. Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. Métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN de C^{13} com CPMAS) e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 741-750, 2000.

CARVALHO, A. M. de. **Uso de plantas condicionadoras com incorporação e sem incorporação no solo**: composição química e decomposição dos resíduos vegetais; disponibilidade de fósforo e emissão de gases. 2005. 199 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília.

CERETTA, C. A. **Fracionamento de N orgânico, substâncias húmicas e caracterização de ácidos húmicos de solo sem sistemas de cultura sob plantio direto**. 1995. 127 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CERETTA, C. A.; BAYER, C.; DICK, D. P.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L. A. Métodos espectroscópicos. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 293-330.

CONTE, P.; PICCOLO, A. Quantitative differences in evaluating soil humic substances by liquid- and solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, p. 339-352, 1997.

CONTE, P.; PICCOLO, A.; LAGEN, B. van; BUURMAN, P.; JAGER, P. A. Quantitative aspects of solid-state ^{13}C -NMR spectra of humic substances from soils of volcanic systems. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, p. 327-338, 1997.

CORREIA, M. E. F.; ANDRADE, A. G. de. Formação de serapilheira e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 197-225.

DAI, K'O H.; JOHNSON, C. E. Applicability of solid-state ^{13}C CPMAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. **Geoderma**, Amsterdam, v. 93, p. 289-310, 1999.

DICK, D. P.; GOMES, J.; BAYER, C.; BODMAN, B. Adsorção de ácidos húmicos em Latossolo Roxo natural e tratado com oxalato de amônio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 285-294, 2000.

DICK, D. P.; GONÇALVES, C. N.; DALMOLIN, R. S. D.; KNICKER, H.; KLAMT, E.; JÖGEL-KNABNER, I.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L. Characteristics of soil organic matter of different Brazilian Ferralsols under native vegetation as a function of soil depth. **Geoderma**, Amsterdam, v. 124, p. 319-333, 2005.

DICK, D. P.; MANGRICH, A. S.; MENEZES, S. M. C.; PEREIRA, B. F. Chemical and spectroscopical characterization of humic acids from two South Brazilian coals of different ranks. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 13, p. 177-182, 2002.

DIXON, W. T.; CHAEFER, J.; SEFCIK, M. D.; STEJSKAL, E. O.; MCKAY, R. A. Total suppression of sidebands in CPMAS ^{13}C NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 49, p. 341-345, 1982.

DORAN, J. W. Soil quality and sustainability. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Informação de solos na globalização do conhecimento sobre o uso das terras: anais**. Rio de Janeiro: SBSC: EMBRAPA-CNPS: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 1 CD-ROM.

FABBRI, D.; MONGARDI, M.; MONTANARI, L.; GALETTI, G. C.; CHIAVARI, G.; SCOTTI, R. Comparison between CPMAS ^{13}C NMR and pyrolysis-GC/MS in the structural characterization of humins and humic acids of soil and sediments. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlim, v. 362, p. 299-306, 1998.

GOLCHIN, A.; OADES, J. M.; SKJEMSTAD, J. O.; CLARKE, P. Structural and dynamic properties of soil organic matter as reflected by ^{13}C natural abundance, pyrolysis mass spectrometry and solid-state ^{13}C NMR spectroscopy in density fractions of an oxisol under forest and pasture. **Australian Journal of Soil Research**, Victoria, v. 33, p. 59-76, 1995.

GOLCHIN, A.; CLARKE, P.; BALDOCK, J. A.; HIGASHI, T.; SKJEMSTAD, J. O.; OADES, J. M. The effects of vegetation and burning on the chemical composition of soil organic matter in a volcanic ash soil as shown by ^{13}C NMR spectroscopy. I. Whole soil and humic acid fraction. **Geoderma**, Amsterdam, v. 76, p. 155-174, 1997.

GONÇALVES, C. N.; DALMOLIN, R.; DICK, D. P.; KNICKER, H.; KLAMT, E.; KÖGEL-KNABNER, I. The effect of 10%HF treatment on the resolution of CPMAS ^{13}C NMR spectra and on the quality of organic matter in Ferralsols. **Geoderma**, Amsterdam, v. 116, p. 373-392, 2003.

GONZÁLEZ-VILA, F. J.; LENTZ, H.; LÜDEMANN, H. D. FT- ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 72, p. 1063-1070, 1976.

GREGORICH, E. G.; DRURY, C. F.; BALDOCK, J. A. Changes in soil carbon under long-term maize in monoculture and legume-based rotation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 32, p. 21-31, 2000.

GREGORICH, E. G.; MONREAL, C. M.; SCHNITZER, M.; SCHULTEN, H. R. Transformation of plant residues into soil organic matter: chemical characterization of plant tissue, isolated soil fractions, and whole soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, p. 680-693, 1996.

GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. Soil organic matter composition under primary forest, pasture, and secondary forest succession, Région Huetar Norte, Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 124, p. 93-104, 1999.

HEMMINGA, M. A.; BUURMAN, P. NMR in soil science. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, p. 221-224, 1997.

HOPKINS, D. W.; CHUDEK, J. A.; WEBSTER, E. A.; BARRACLOUGH, D. Following the decomposition of ryegrass labeled with ^{13}C and ^{15}N in soil by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 48, p. 623-631, 1997.

KENTGENS, A. P. M. A practical guide to solid-state NMR of half-integer quadrupolar nuclei with some applications to disordered systems. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, p. 271-306, 1997.

KINCESH, P.; POWLSON, D. S.; RANDALL, E. W. ^{13}C -NMR studies of organic matter in whole soils, I. Quantification possibilities. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 46, p. 125-138, 1995a.

KINCESH, P.; POWLSON, D. S.; RANDALL, E. W. ^{13}C -NMR studies of organic matter in whole soils, II. A case study of some Rothamstead soils. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 46, p. 125-138, 1995b.

KÖGEL-KNABER, I. ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, p. 243-270, 1997.

KÖGEL-KNABER, I. Analytical approaches for characterizing soil organic matter. **Organic Geochemistry**, Elmsford, v. 31, p. 609-625, 2000.

KÖGEL-KNABER, I. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 139-162, 2002.

MAHIEU, N.; POWLSON, D. S.; RANDALL, E. W. Statistical analysis of published Carbon-13 CPMAS NMR spectra of soil organic matter. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 63, p. 307-319, 1999.

MARTIN NETO, L.; BONAMANGA, T. J.; COLNAGO, L. A.; PANEPUCCI, H. C.; VIEIRA, E.; MIYASAWA, M. Efeitos de diferentes manejos do solo sobre as substâncias húmicas: avaliação com ressonância magnética nuclear. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25., 1995, Viçosa, MG. **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**: resumos expandidos. Viçosa, MG: SBCS: UFV, 1995. v. 4, p. 1810-1812.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade em sistemas agrícolas. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 1-8.

NEYROD, J. A.; SCHNITZER, M. The chemistry of high molecular weight fulvic acid fractions. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 52, p. 4123-4132, 1972.

NIEROP, K. G. J.; BUURMAN, P.; LEEUW, J. W. de. Effect of vegetation on chemical composition of H horizons in incipient podzols as characterized by ¹³C NMR and pyrolysis-GC/MS. **Geoderma**, Amsterdam, v. 90, p. 111-129, 1999.

NIEROP, K. G. J.; PULLEMAN, M. M.; MARINISSEN, J. C. Y. Management induced organic matter differentiation in grassland and arable soil: a study using pyrolysis techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 755-764, 2001a.

NIEROP, K. G. J.; VAN LAGEN, B.; BUURMAN, P. Composition of plant tissues and soil organic matter in the first stages of a vegetation succession. **Geoderma**, Amsterdam, v. 100, p. 1-24, 2001b.

PÉREZ, M. G.; 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. Characterisation of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. **Geoderma**, Amsterdam, v. 118, p. 181-190, 2004.

PILLON, C. N. **Alterações no conteúdo e na qualidade da matéria orgânica do solo induzidas por sistemas de cultura em plantio direto.** 2000. 232 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PRESTON, C. M. Using NMR to characterize the development of soil organic matter with varying climate and vegetation. In: STABLES isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1991. p. 27-36.

PRESTON, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. **Soil Science**, Baltimore, v. 161, p. 144-166, 1996.

QUIDEAU, S. A.; ANDERSON, M. A.; GRAHAM, R. C.; CHADWICK, O. A.; TRUMBORE, S. E. Soil organic matter processes: characterization by ^{13}C NMR and ^{14}C measurements. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 138, p. 19-27, 2000.

RANDALL, E. W.; MAHIEU, N.; IVANOVA, G. I. NMR studies of soil, soil organic matter and nutrients: spectroscopy and imaging. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, p. 307-326, 1997.

SCHMIDT, M. W. I.; KNICKER, H.; KÖGEL-KNABNER, I. Organic matter accumulating in Aeh and Bh horizons of a Podzol - chemical characterisation in primary organo-mineral associations. **Organic Geochemistry**, Elmsford, v. 31, p. 727-734, 2000.

SCHMIDT-ROHR, K.; SPIESS, H. W. **Multidimensional solid-state NMR and polymers.** San Diego: Academic Press, 1994. 123 p.

SCHOLES, M. C.; POWLSON, D.; TIAN, G. Input control of organic matter dynamics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, p. 25-47, 1997.

SILVA, J. E.; LEMAINSKI, J.; RESK, D. V. S. Perdas de matéria orgânica e suas relações com a capacidade de troca catiônica em solos da região dos cerrados do oeste baiano. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 541-547, 1994.

SKJEMSTAD, J. O.; CLARKE, P.; TAYLOR, J. A. The removal of magnetic materials from surface soils. A solid state ^{13}C CPMAS NMR study. **Australian Journal of Soil Research**, v. 32, p. 1215-1229, 1994.

SLICHTER, C. P. **Principles of magnetic resonance**. Berlin: Spring Verlag, 1990. 264 p.

SWIFT, M. J.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. **Decomposition in terrestrial ecosystems**. Oxford: Blackwell, 1979. 372 p. (Studies in ecology, 5).

VEEKEN, A.; NIEROP, K.; WILDE, V. de; HAMELERS, B. Characterisation of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, p. 33-41, 2000.

VEEMAN, W. S. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, p. 225-242, 1997.

WATTEL-KOEKKOEK, E.; GENUCHTEN, P. P. L. van; BUURMAN, P.; LAGEN, B. van. Amount and composition of clay-associated soil organic matter in a range of kaolinitic and smectitic soils. **Geoderma**, Amsterdam, . 99, p. 27-49, 2001.

WILSON, M. A. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to organic matter in whole soils. In: MacCARTHY, P. (Ed.). **Humic substances in soil and crop sciences**. Madison: ASA: SSSA, 1990. p. 221-260.

WILSON, M. A. **NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry**. Oxford: Pergamon, 1987. 353 p.

ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, M. T.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, p. 117-16, 1997.

ZHANG, J.; ZHAI, J.; ZHAO, F.; TAO, Z. Study of soil humic substances by cross-polarization magic angle spinning ^{13}C nuclear magnetic resonance and pyrolysis-capillary gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 378, p. 177-182, 1999.