

# Estrutura e natureza química da matéria orgânica do solo

*Ladislau Martin-Neto*

*Amanda Maria Tadini*

*Lucas Raimundo Bento*

*João Vitor dos Santos*

*Débora M. B. Pereira Milori*

### **Introdução**

A relevância do tema matéria orgânica no solo (MOS), dinâmica e reatividade de carbono (C) no solo, os aspectos estruturais da MOS e outros fatores que controlam os teores de C no solo têm crescido, consideravelmente, em função da capacidade que o solo tem de sequestrar C e mitigar as emissões antrópicas de gases do efeito estufa. Iniciativas de painéis e associações internacionais, como do IPCC (COP/ONU), Global Research Alliance on Agricultural Greenhouse Gases (GRA), “4 per 1000 initiative”, e outras ações globais justificam o interesse renovado pelo C do solo há mais de uma década. No Brasil, o Plano Agricultura de Baixa Emissão de Carbono (Plano ABC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é um exemplo materializado com estímulos para produtores rurais que adotam práticas conservacionistas e ações que buscam reduzir as emissões de gases do efeito estufa (período de 2010 a 2020). Mais recentemente, o lançamento do Plano ABC+, com ajustes e avanços, estipulou metas ainda mais ambiciosas para o sequestro de C em nossas lavouras, para o período 2020 a 2030. No País, o mercado de créditos de carbono ligado ao AGRO, incluindo as ações que visam o sequestro de C no solo, vai se configurando como realidade no exterior, com inúmeras iniciativas de empresas e grupos privados multinacionais e nacionais. Iniciativas como as da agricultura de baixo carbono, carne carbono neutro, leite baixo carbono, soja baixo carbono e outras ações similares, associadas ao contexto de mercado ESG (“Environmental, Social and Governance”), são a tônica do presente, sinalizando para o futuro de um AGRO mais produtivo, rentável, socialmente justo e com maior sustentabilidade.

Assim, a importância da MOS nos diversos compartimentos do solo, também se justifica no contexto da busca por uma agricultura mais produtiva e sustentável, ou utilizando o termo mais recente: com intensificação sustentável. Ainda, em relação à agricultura que será praticada no futuro, a que preconiza a máxima ecológica e o mínimo uso de insumos não renováveis nas lavouras. Para os países localizados em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, isso é ainda mais relevante, dado que predominam nos solos a argila, a caulinita (1:1), com baixa capacidade de troca de cátions, onde a MOS assume o papel de ser a matriz mais importante para assegurar a retenção de nutrientes no solo e devido a isso, controla o grau de fertilidade do solo. Nos solos arenosos, degradados ou em via de degradação, o manejo conservacionista e o maior armazenamento de C no solo são críticos para manter a capacidade produtiva e assegurar tetos ainda mais elevados de produtividade dos que os alcançados atualmente nas lavouras do país. Considerando, ainda que no Brasil prevalece as lavouras maciçamente dependentes da chuva, aumentar a retenção e a água disponível do solo é outra contribuição relevante da MOS. Assim, o protagonismo e o interesse renovado sobre a MOS se expandem, e isso é interessante, pois a construção da fertilidade e a melhoria da qualidade de solos têm como pilar principal o maior armazenamento de matéria orgânica (MO), tanto para os dias atuais quanto futuro, onde o aquecimento global deverá ser uma componente a afetar as lavouras.

O manejo conservacionista da MOS vai além, perpassa as práticas que visam aumentar a quantidade de C no solo, o que é imprescindível, mas não suficiente, dado que, além de reter mais C, é relevante manter, o maior tempo possível (persistência do C no solo), os compostos orgânicos, resíduos, palhas e restos de culturas e da pós-colheita que são adicionados ao solo. Como se não bastasse, ainda, existe o desafio de aumentar o tempo de persistência do C no solo num ambiente predominantemente de altas temperaturas e elevada umidade, portanto, com elevada atividade biológica, o que facilita a decomposição da MOS e gera emissões de GEE. Tudo isso amplia o desafio de aumentar, ou até mesmo, manter o conteúdo e melhorar a qualidade da MOS. Assim, entender os aspectos que controlam a estrutura-propriedade-função da MOS e de seus compartimentos é assunto fundamental; por isso, uma série de questões relevantes e complexas devem ser consideradas e investigadas.

Entender, portanto, a natureza química da MOS é um desses aspectos relevantes, pois toda interação com os diversos componentes bióticos e abióticos do solo será modulada pelas estruturas, propriedades químicas, físico-químicas, bioatividade e funções dos compostos orgânicos presentes nos solos. Neste capítulo são discutidos temas relevantes e de relativa complexidade sobre

os modelos que buscam explicar a natureza e a interação da fase orgânica do solo com a fase mineral. Esses temas, muito recentemente, ganharam novos contornos e controvérsia, além dos que já existiam antes. O debate foi retomado e ganhou fôlego em publicações e em artigos publicados em periódicos de grande impacto, como os de Lehmann e Kleber (2015) e Kleber e Lehmann (2019). O aspecto mais controverso discutido é de que substâncias húmicas (considerada a parte humificada e, portanto, mais estável quimicamente da MOS e que vem sendo pesquisada há mais de 100 anos ao redor do mundo, inclusive com uma sociedade internacional renomada fundada em 1981) seria um artefato laboratorial e que não representa o que se imaginava sobre sua gênese, forma, frações, interações, estruturas e propriedades da MOS (Lehmann; Kleber, 2015; Kleber; Lehmann, 2019). Naturalmente, essas publicações de Lehmann e de Kleber vêm sendo duramente questionada por outros autores, como Olk et al. (2019), De Nobili et al. (2020) e Hayes e Swift (2020) e, principalmente, confrontada com toda a história de resultados das substâncias húmicas, incluindo ainda pesquisas publicadas mais recentemente (De Nobili et al., 2020; Novotny et al., 2020; Tadini et al., 2021a, 2021b; Valenzuela; Cervantes, 2021).

Neste capítulo são descritos os resultados disponíveis na literatura nacional e internacional, inclusive os modelos estruturais propostos, bem como as experiências dos próprios autores com trabalhos que foram gerados com uso de uma série de ferramentas analíticas tradicionais, mas também com o uso de técnicas recentes e aparelhos avançados, gerando uma contribuição consistente e atual para o tema.

### **Modelos e estruturas químicas para matéria orgânica do solo**

Estudos sobre isolamento e fracionamento da matéria orgânica do solo (MOS) foram considerados pré-requisitos das pesquisas no início do século XVII. Por volta do século XIX a participação dos microrganismos na formação das substâncias húmicas (SH) começou a ser reconhecida, e foi a partir desse reconhecimento que as SH foram aceitas como provenientes de compostos complexos de natureza sintética resultantes da decomposição de plantas (Hayes; Swift, 2018; Lavalley et al., 2020). Entre 1914 e 1916, o cientista Trusov foi um dos pioneiros a estudar a formação e a transformação do húmus por processos biológicos, concluindo que os componentes da planta são utilizados pelos microrganismos e convertidos em plasma microbiano, com subsequente formação de SH. Suas contribuições ajudaram a desenvolver o conceito fundamentado no papel de polifenóis e quinonas que atuam como precursores na formação das SH por processos de condensação (Hayes; Swift, 2018). Em

1917, o cientista Maillard iniciou estudos de síntese abiótica com as SH. Para isso, avaliou a reação da glicose com a glicina, gerando substâncias aromáticas que assemelhavam aos materiais húmicos presentes no solo, uma rota de síntese de SH que ficou conhecida como reação de Maillard (Burdon, 2001; Hayes; Swift, 2018).

O conceito de que os componentes da MOS eram associações de lignina-proteína cresceu com os estudos da época, e em 1936 o cientista Waksman demonstrou que a lignina oxidada, ao reagir com a caseína (proteína encontrada no leite *in natura*) resultava em produto semelhante aos ácidos húmicos (AH), surgindo o conceito de “ligno-proteína” (Waksman, 1936; Hayes; Swift, 2018). Além disso, durante esse período, começou a crescer o conceito de que os compostos liberados na decomposição microbiana de material orgânico originavam produtos húmicos por meio de processos de síntese química, e que suas estruturas eram constituídas de macromoléculas e polieletrólitos (Stevenson, 1982; Kononova, 1966; Hayes; Swift, 2018).

Entre os séculos XIX e XX, foi proposto o modelo de Wershaw para a síntese de SH, que preconizava que SH eram formadas por estruturas micelares ou pseudo-micelares a partir de interações fracas e condensação de moléculas não polares de cadeias longas, ou seja, a partir da associação de hidrocarbonetos, ésteres e ácidos graxos (Hayes; Swift, 2018). Essa nova visão de estrutura das SH a partir da formação de da agregação de moléculas com diferentes tamanhos (massa molecular) representou um grande avanço comparado com a visão macromolecular tradicional proposta em períodos e teorias anteriores. Esse avanço permitiu o surgimento de novas teorias, destacando a teoria supramolecular, segundo a qual as SH são constituídas de moléculas heterogêneas de diferentes origens que se auto-organizam em conformações supramoleculares por meio de interações intermoleculares e ligações químicas (Piccolo 1996, 2001).

O solo compõe um sistema heterogêneo e reativo quimicamente, o qual pode ser dividido em três fases/compartimentos fundamentais: gasosa, líquida e sólida. Na fase gasosa do solo, ocorre a liberação dos gases gerados em atividades microbianas aeróbicas e anaeróbicas, as quais são responsáveis por consumir e gerar gases, dentre eles o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), mas outros gases encontrados na atmosfera estão presentes em concentrações similares no solo. O acúmulo de  $\text{CO}_2$  pode desencadear alterações químicas, com formação de ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), o qual é instável, dissocia-se rapidamente e pode aumentar a acidez e a capacidade tampão do solo (Wolf, 1994; Sodré, 2012; Wang et al., 2015).

Na fase líquida do solo, encontram-se os íons dissolvidos, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , entre outros, sendo esses íons, por exemplo, responsáveis pela fertilidade e crescimento das plantas (Wolf, 1994; Sodré, 2012). A soluço do solo engloba ainda a matéria orgânica dissolvida (MOD), que possui papel relevante no transporte, complexa o e fluxo de nutrientes até as raízes das plantas (McGill et al., 1986; Kalbitz et al., 2000; Zsolnay, 2003; Gmach et al., 2020), sendo ainda os compostos de carbono no solo mais suscetíveis   lixivia o, portanto, passíveis de movimento vertical do C para o subsolo. A MOD pode, na forma de ânions polares e dissociados, se associar a  ions e minerais do solo, ou seja, ser retida (adsorvida) no solo, constituindo-se, assim, em um “*pool*” de carbono no solo (Gmach et al., 2020; McDowell, 2003). No Brasil, poucos são os estudos que investigam a matéria orgânica dissolvida e suas fun oes no solo (Gmach et al., 2020), e por isso, será mais detalhado em t pico mais à frente.

A fase sólida do solo é formada por componentes orgânicos e minerais, que são responsáveis pela reten o e suprimento de nutrientes   soluço do solo, além de regular a reatividade e atividade química que ocorre no solo (Wolf, 1994). Do ponto de vista da estrutura, a fase sólida pode ser dividida em macroagregados ( $> 53 \mu\text{m}$ ) e microagregados ( $< 53 \mu\text{m}$ ). Os microagregados são formados por moléculas orgânicas ligadas às argilas e cátions polivalentes, que se unem a outros microagregados, formando, assim, os macroagregados, e, por fim, esses macroagregados podem se acumular em torno da matéria orgânica particulada (Wang et al., 2015). No entanto, partículas menores podem ser formadas nesse processo, comumente denominadas colóides ou dispersão coloidal. Esses colóides originam-se da decomposi o de resíduos orgânicos e/ou degrada o de componentes inorgânicos, principalmente de minerais secundários, por exemplo, formando materiais coloidais do tipo argilominerais, silicatos e óxidos e (oxi)hidróxidos de ferro e alumínio (Sodré, 2012; Wang et al., 2015). Assim, quaisquer modifica oes causadas por altera oes antropog nicas e/ou naturais podem interferir na quantidade e natureza química dos compostos orgânicos presentes no sistema solo. A presença no solo de material no est dio coloidal é relevante, notadamente, os colóides orgânicos de solos tropicais, dado que conferem ao solo elevada atividade química, por gerarem cargas negativas e possuírem elevada área de superfície.

Em um passado não muito distante predominaram os estudos que priorizavam as substâncias húmicas como sendo os principais constituintes da MOS, com mais de 100 anos de pesquisas e com uma sociedade científica que leva seu nome, a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas, criada em 1981, nos Estados Unidos. Contudo, em anos mais recentes um crescimento

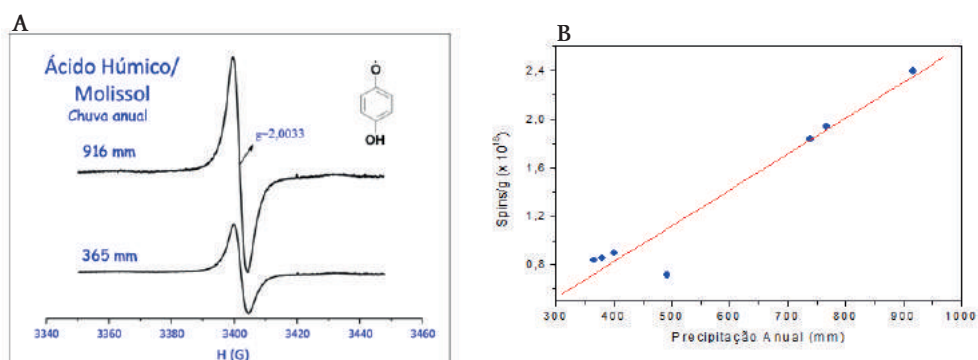
consistente e novas constatações com indicações que quantitativamente as frações dominantes da MOS estariam associadas aos constituintes inorgânicos, como argila e silte, e óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e outros íons metálicos presentes nos solos, e protegidas em macro e microagregados dos solos (Six et al., 2002; Hayes; Swift, 2018; Kögel-Knabner; Amelung, 2021). Este modelo estrutural será devidamente considerado no capítulo 5.

A MOS desempenha três funções básicas: bioquímica, física e química. A função bioquímica é associada ao suprimento de nutrientes e energia para os microrganismos e raízes, notadamente na rizosfera. Na função física, a MOS atua na estabilidade estrutural e formação do solo, enquanto que, quimicamente, é responsável pela complexação de cátions, regulação do pH e capacidade de troca de cátions (CTC) e tamponamento da acidez do solo (Baldock; Skjemstad, 2000). Além dessas funções, existem três principais mecanismos que explicam o acúmulo de MO no solo: preservação seletiva ou bioquimicamente estável de algumas moléculas orgânicas, inacessibilidade espacial dos decompositores aos compostos orgânicos no interior de agregados, e interação de substâncias orgânicas com a argila, minerais e metais encontrados nos solos (Six et al., 2002; Poirier et al., 2018; Kögel-Knabner; Amelung, 2021). Ademais, a MOS pode ser subdividida em dois grupos com diferentes características morfológicas e químicas. O primeiro grupo é constituído de materiais mais lábeis, pouco processados, ou de compostos orgânicos *in natura*, pouco ou semi-decompostos. O segundo grupo corresponde a produtos transformados, também conhecidos como substâncias húmicas (compostos amorfos de coloração amarela a marrom) e não humificadas, com propriedades químicas e físico-químicas bem definidas, como polissacarídeos, polipeptídios, lipídeos e outros (Hayes; Swift, 2020).

O processo de transformação da MOS em SH começa pela conversão do resíduo vegetal inerte em produtos orgânicos mais processados que gera compostos quimicamente mais estáveis (ricos em anéis aromáticos e quinonas) (Liang et al., 2017) ou estruturas progressivamente protegidas da mineralização em superestruturas, cujas unidades de formação são fracamente associadas a componentes hidrofóbicos (Piccolo, 2016), os quais são mais resistentes à decomposição. Esse processo é conhecido como “humificação” (De Nobili et al., 2020) ou “*síntese secundária*” (Kleber; Lehmann, 2019). As SH geradas nesse processo são adsorvidas hidrofobicamente na argila do solo e/ou adsorvidas quimicamente por óxidos e, quando expostos a alterações conformacionais causadas por ácidos orgânicos liberados das raízes de plantas ou oriundos da degradação microbiana, irão regular o grau de fertilidade do solo e as funções que exercem (bioatividade) sobre as plantas e organismos do solo. Assim,

esses materiais húmicos desempenham um papel importante no crescimento de plantas e na estabilização da estrutura do solo, por meio da formação de complexos organominerais, além de regularem os níveis de contaminantes no solo (Piccolo, 2016). A composição química (natureza química) da MOS reflete a vegetação que lhe deu origem, material de origem do solo, clima e perturbação que ocorrem no solo. Além disso, o C associado a MOS representa o maior reservatório de C terrestre (Lal, 2004; Hatcher et al., 2019; Jiménez-González et al., 2020).

Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) ilustrando a evolução dos aspectos estruturais das substâncias húmicas dos solos, em uma situação real de campo, em função da análise de amostras de solo em uma climosequência na Argentina, onde o principal fator que condiciona a natureza química da MOS é a variação na precipitação pluviométrica anual são apresentados na Figura 1. A partir de 365 mm até 916 mm de precipitação nos solos da climosequência há uma variação de três vezes para o valor do conteúdo dos chamados radicais livres do tipo semiquinona, detectados pela técnica de ressonância paramagnética eletrônica, e que é um indicador amplamente aceito do grau de humificação das substâncias húmicas e matéria orgânica dos solos (Martin-Neto et al., 1998). Ou seja, há uma maior geração de biomassa e uma atividade microbiana mais significativa que resulta no solo em matéria orgânica mais humificada com o aumento da precipitação.



**Figura 1.** Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) de amostras de ácidos húmicos de um Molisol (Soil Taxonomy) do Pampa da Argentina, mostrando sinais dos radicais livres do tipo semiquinona, em duas (365 e 916 mm) situações de precipitação pluviométrica anual (A) e quantificação dos referidos espectros (em spins/g) versus diferentes níveis de precipitação (B).

Fonte: Adaptado de Martin-Neto et al. (1998).

## Substâncias húmicas do solo

### *Aspectos estruturais e modelos*

As substâncias húmicas (SH) podem ser fracionadas de acordo com as características de solubilidade em ácidos húmicos – AH (solúvel em pH básico e insolúvel em pH <2); ácidos fúlvicos – AF (solúvel em toda faixa de pH) e humina – HU (insolúvel em toda faixa de pH) (Stevenson, 1994; Saab; Martin-Neto, 2004; Tadini et al., 2015; Lipczynska-Kochany, 2018; Lavallee et al., 2020).

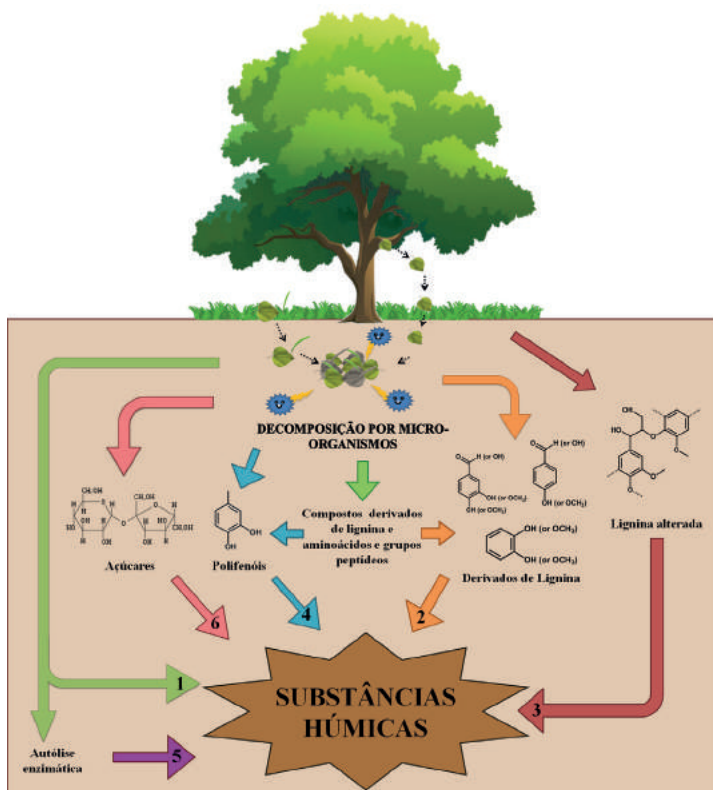
O termo húmus pode ser definido como produtos transformados de uma variedade de substratos orgânicos que são resistentes e/ou resultantes da decomposição por processos de hidrólise ou oxirredução ou síntese microbiana (Waksman, 1936; Baveye; Wander, 2019; Hayes; Swift, 2020). Esses subprodutos de ocorrência natural da MOS têm sido objeto de controvérsias adicionais, atualmente, quanto às suas rotas de síntese e estrutura química (Lehmann; Kleber, 2015; Kleber; Lehmann, 2019).

As primeiras teorias da formação das substâncias húmicas eram centradas na possibilidade de esses grupos de compostos serem resultantes de produtos da decomposição de resíduos vegetais, animais e de resíduos microbianos no solo (Burgues et al., 1963; Flaig, 1972; Hatcher et al., 1981; Stevenson, 1982; Hedges et al., 1984; Piccolo, 1996; Rocha; Rosa, 2003; Dou et al., 2020), conforme ilustrado no diagrama da Figura 2. As principais rotas e sequências de reações de formação das SH no solo podem ser assim descritas:

- (1) **síntese microbiana:** a celulose e resíduos de plantas (sem a presença de lignina) são metabolizados no citoplasma dos microrganismos gerando polifenóis (Huang; Hardie, 2009; Dou et al., 2020);
- (2) **polifenol derivado de lignina:** ocorre a hidrólise da lignina durante a decomposição microbiana, e posteriormente serão oxidados a quinona (Senesi et al., 2009);
- (3) **complexo lignina-proteína:** os resíduos de lignina e proteína podem se combinar e formar um complexo (lignina-proteína) durante a síntese no citoplasma dos micróbios (Waksman, 1936);
- (4) **polifenol microbiano:** os produtos da atividade e do metabolismo microbiano ricos em compostos aromáticos (polifenóis) são oxidados a quinonas ou combinados a aminoácidos e peptídeos formando as SH (Kononova, 1966);
- (5) **autólise:** as substâncias húmicas são geradas a partir de tecidos vegetais e células que sofreram autólise enzimática, condensação e polimerização aleatória;
- (6) **condensação de amida a açúcar:** por essas vias, nas reações enzimáticas sem a presença de lignina, o grupo amida é inserido ao grupo aldeído dos açúcares, são condensados em glicosilamina e, finalmente, polimerizados



na forma de compostos que se assemelham a SH. As rotas 5 e 6 de síntese de SH no solo são baseadas nas reações de Maillard (Stevenson, 1982; Huang; Hardie, 2009).



**Figura 2.** As teorias de formação das substâncias húmicas: (1) síntese microbiana; (2) teoria do polifenol derivados de lignina; (3) teoria do complexo lignina-proteína; (4) teoria do polifenol microbiano; (5) autólise e (6) condensação de amidas a açúcares.

Fonte: Adaptado de Guo et al. (2019) e Dou et al. (2020).

Dentre as teorias e rotas de síntese de SH apresentadas na Figura 2, existem duas teorias principais, as que compõem as vias 2 e 3, que descrevem a formação das SH e suas frações húmicas (Swift, 1999; Piccolo, 2001; Muscolo et al., 2013; Hayes; Swift, 2018; Lipczynska-Kochany, 2018; Hayes; Swift, 2020; Valenzuela; Cervantes, 2021). Na via 2, as SH resultam da oxidação de biopolímeros orgânicos (como ligninas) que são transformados em humina e, em seguida, oxidados e fragmentados em ácidos húmicos e fúlvicos. Já na via 3, as SH são

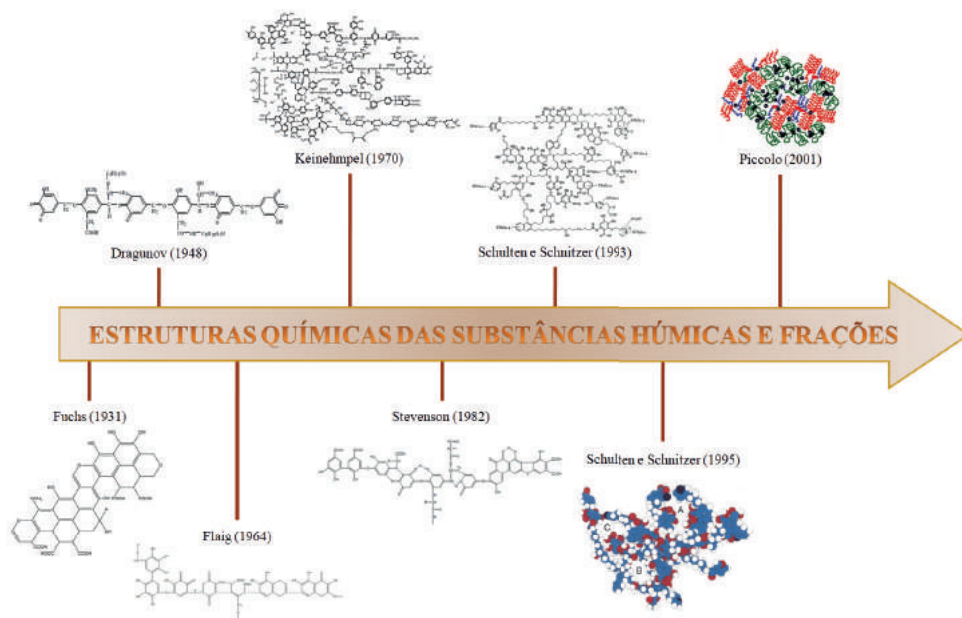
resultantes da condensação abiótica de moléculas de baixa massa molar que formam em estruturas de maior grau de condensação química, como ácidos fúlvicos e húmicos, que, posteriormente, formam a humina (Lipczynska-Kochany, 2018).

Por décadas os cientistas tentaram elucidar a estrutura das substâncias húmicas e algumas propostas de estrutura vêm sendo aceitas, como ilustrado na Figura 3. As primeiras estruturas propostas encontradas na literatura foram:

- (i) a de Fuchs (1931 citado por Kononova, 1966) apresentou uma estrutura constituída de moléculas de lignina, sendo a conversão de lignina a ácidos húmicos realizada por processo físico-químico, em que há perda de grupos funcionais como metoxilo (metóxi) e ganho de grupos carboxílicos, formando complexo lignina-proteína (via 3 de formação);
- (ii) a de Dragunov (1948 citado por Kononova, 1966), as SH consistiam de anéis aromáticos substituídos por grupos hidroxilas e quinonas, além dos resíduos de carboidratos e proteínas ligados ao carbono presente em anéis aromáticos;
- (iii) o modelo proposto por Flaig (1964) preconizava que as SH são uma estrutura composta por anéis fenólicos e quinonas, semelhante ao modelo de Dragunov (1948), porém sem a presença de grupos hidroxilas na estrutura das moléculas húmicas;
- (iv) a de Kleinhempel (1970) representou SH enriquecidas em grupos funcionais, sendo os grupos aromáticos ligados por unidades de nitrogênio (N) e oxigênio (O);
- (v) a de Stevenson (1982) apresentou um modelo semelhante ao de Kleinhempel (1970), em que unidades de N e O ligavam os grupos fenólicos e quinonas, e as hidroxilas aos grupos aromáticos e açúcares e peptídeos aderidos à estrutura húmica, conforme diagrama exibido na Figura 3 (Kononova, 1966; Stevenson, 1982; Schulten; Schnitzer, 1995).

A estrutura dos AH proposta por Schulten e Schnitzer (1993) apresentava grandes porções de estruturas alifáticas na composição das SH, especificamente nos AH (Figura 3). Segundo esses autores, os AH possuem em sua composição uma massa molecular média de 6.651 Daltons ( $1 \text{ Da} = 1 \text{ g mol}^{-1}$ ) com 61,8% de carbono, 5,9% de hidrogênio, 29,8% de oxigênio e 2,5% de nitrogênio, além da presença de grupos funcionais, como: carboxílicos, fenólicos, hidroxilas presentes em álcoois, ésteres carboxílicos, éteres e estruturas heterocíclicas com nitrogênio e grupos do tipo nitrilo. Em 1995, os mesmos autores propuseram um modelo tridimensional para os AH (Figura 3), onde é inferida a presença de espaços vazios capazes de adsorver ou complexar compostos orgânicos, como

pesticidas apolares, carboidratos, lipídeos e metais na estrutura das substâncias húmicas (Schulten; Schnitzer, 1995).



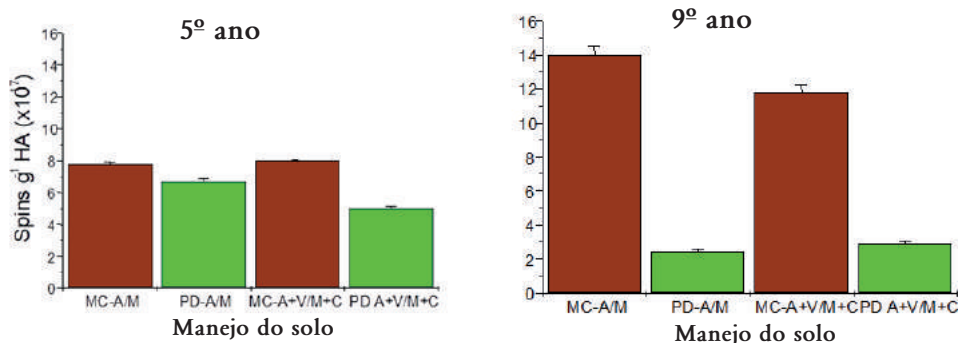
**Figura 3.** Cronologia das propostas de estruturas químicas, grau de condensação e modelos encontrados na literatura para a estrutura, disposição espacial e composição de substâncias húmicas e de suas frações químicas.

Fonte: Adaptado de Kononova (1966), Stevenson (1982, 1992), Schulten e Schnitzer (1993, 1995), Piccolo (2001), Simpson et al. (2002), Sutton e Sposito (2005) e Drosos et al. (2018).

Ao longo dos anos, contudo, houveram vários questionamentos a respeito das teorias e das estruturas hipotéticas propostas para as SH e suas frações presentes no solo. O modelo mais recente de conformação estrutural e formação de SH encontrado na literatura foi o proposto por Piccolo (2001). Nesse modelo, as SH seriam formadas a partir da união por ligações e interações químicas de moléculas heterogêneas de diferentes origens que se auto-organizam em conformações supramoleculares por meio de interações intermoleculares e ligações químicas entre os grupos químicos de suas unidades que experimentam maior grau de condensação (Piccolo, 1996, 2001). Esse novo modelo e visão de formação e composição das SH é um contraponto ao conceito de estrutura macromolecular (Stevenson, 1982) descrita por diversos estudos na literatura (Piccolo, 2016). Segundo Piccolo (2016), as moléculas húmicas do solo são como biomoléculas degradadas com massas molares menores que

5.540 Da, para ...massa molecular menor que 1000 Da, e em solução que se auto organizam em supraestruturas metaestáveis e heterogêneas por meio de ligações fracas do tipo Van der Waals ( $\pi$ - $\pi$  e CH- $\pi$ ) e ligações de hidrogênio. Na fase aquosa do solo, essas moléculas estão em equilíbrio e são estabilizadas por interação hidrofóbica na superfície de óxidos de ferro e/ou alumínio, ou complexos metálicos presentes no solo. Portanto, o conhecimento da origem, bem como a natureza química do húmus são fundamentais na compreensão da composição química das SH, além de ser fundamental para avaliar a qualidade e a capacidade do solo em resistir às mudanças ambientais. Nos estudos das rotas e processos de síntese de SH no solo, uma das questões mais comentadas por diversos grupos de pesquisa da área são a ausência de um único modelo estrutural, e mecanismo que considere uma única via de formação. Esses fatores não são, todavia, pontos relevantes na compreensão do papel e da importância desse material no solo, que é considerado um sistema heterogêneo, dinâmico e em constante transformação.

Várias pesquisas realizadas no Brasil, a partir de amostras de substâncias húmicas, agregados organominerais e de solos intactos de áreas sob diferentes manejos, especialmente plantio direto e manejo convencional, indicaram que a estrutura química mais plausível para as SHs não seriam macromoléculas de alta massa molecular, mas sim associação molecular de compostos orgânicos de baixa massa molecular, que se unem por ligações mais fracas e de baixa energia (ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio). Uma das evidências para isso é o fato de que, em áreas de plantio direto, o aumento do teor de MOS, especialmente nas camadas superficiais, é acompanhado pela mudança no perfil de massa molar dos compostos orgânicos, que passam a ter menor conteúdo de radicais livres do tipo semiquinona por unidade de carbono, comparadas aos compostos oriundos de áreas sob manejo convencional dos solos (onde houve manutenção ou decréscimo do conteúdo de MOS), sugerindo uma redução do grau de humificação da MOS, não corroborando a teoria clássica de humificação à medida que mais C é armazenado no solo (Figura 4). Os resultados foram explicados pela incorporação de porções alifáticas ou estruturas menos transformadas ao material húmico original existente no solo nas áreas sob plantio direto, indicando haver um “gradiente” no grau de humificação que somente poderia ocorrer em curtos períodos de tempo (menos de 5 anos) em se tratando de estruturas que permitissem a entrada de “*novas moléculas orgânicas*” na estrutura original, o que não se justifica no modelo macromolecular (Bayer et al., 2002a; Pérez-González et al., 2004).



**Figura 4.** Dados da quantificação de radicais livres semiquinona de ácidos húmicos, no 5º e 9º anos de manejo dos solos com plantio direto (PD) e manejo convencional (MC), em um acrisol do Rio Grande do Sul, mostrando o decréscimo do grau de humificação (redução relativa de radicais livres semiquinona).

Fonte: Adaptado de Bayer et al. (2002a).

### *Frações químicas das substâncias húmicas*

De acordo com Stevenson (1994), as SH podem ser separadas conforme a solubilidade em água em três categorias: (i) humina (HU), refere-se à fração insolúvel em todo intervalo de pH e está fortemente ligada à fração mineral do solo; (ii) ácido fúlvico (AF), atribuído a fração solúvel desde a faixa ácida até a alcalina do pH; e (iii) ácido húmico (AH), fração insolúvel em pH na faixa ácida. As frações húmicas são extraídas empregando-se diferentes soluções e solventes e obtendo diferentes rendimentos, teores de cinzas e composições elementares. A extração alcalina com hidróxido de sódio, preconizado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), é o mais eficiente dos procedimentos de separação das SH (Weber et al., 2018; De Nobili et al., 2020).

A composição e características das frações húmicas variam conforme sua estrutura química, sendo que os AF possuem menor conteúdo de carbono e massa molecular (500-1.500 Daltons), conseqüentemente, menores graus de condensação (segundo o modelo macromolecular), comparada às demais frações húmicas, já que os AH possuem maior massa molecular, que varia de 10.000 - 100.000 Daltons, além de maior teor de carbono (Stevenson, 1994; Wolf, 1994; Zech et al., 1997; Guo et al., 2019). Além disso, os AF possuem em sua estrutura maiores quantidades de componentes orgânicos contendo oxigênio, o que permite a essa fração, por ser polar, maior mobilidade e reatividade com os íons metálicos. Por isso, essa fração húmica é caracterizada

pela CTC elevada e alta capacidade de complexar metais, comparada às outras frações, como ácidos húmicos (Santos et al., 2020; Tadini et al., 2020).

A fração denominada HU pode representar de 20% a 50% das SH em massa do carbono presente no solo (Rice; MacCarthy, 1989; Stevenson, 1994; Rice, 2001; Yang et al., 2004; Nichols; Wright, 2006; Tadini et al., 2015), e é denominada, operacionalmente, em muitos estudos na área como “*resíduo*” do fracionamento químico da SH. No entanto, essa fração pode ter aderido em sua estrutura compostos orgânicos hidrofóbicos e biopolímeros inalterados, como lignina, polissacarídeos, carboidratos, além de material inorgânico (Nearpass, 1976; Chiou et al., 2002; Tadini et al., 2015). Estudos reportaram a importância dessa fração, considerada “*resíduo*”, nos processos de agregação e acúmulo de carbono humificado no solo (Benites et al., 2003; Lombardi et al., 2006; Tadini et al., 2015).

As SH e suas frações húmicas têm sido pesquisadas por muitos anos (Schnitzer, 1978; Hatcher et al., 1980; Hartcher; Orem, 1986; Perdue, 1984; Stevenson, 1994; Senesi; Loffredo, 1999; Piccolo, 2002; Sierra et al., 2005; Nebbioso et al., 2015; Tadini et al., 2015, 2018, 2019; Hatcher et al., 2019; Olk et al., 2019; Machado et al., 2020). No entanto, ainda, são objetos de intensa discussão, pesquisa e controvérsia (Nebbioso; Piccolo, 2013; Lehmann; Kleber, 2015; Schaeffer et al., 2015; Hayes; Swift, 2018; García et al., 2019; Kleber; Lehmann, 2019; Dou et al., 2020; De Nobili et al., 2020). Portanto, entender a sua composição química e estrutura molecular é de grande importância em estudos ambientais, especialmente porque essas moléculas estão ativamente envolvidas na ciclagem biogeoquímica dos compostos orgânicos presentes no solo e que, direta e indiretamente, estão relacionados e regulam as mudanças climáticas global (Cotrufo et al., 2015; Liang et al., 2017; Lipczynska-Kochany, 2018; De Nobili et al., 2020; Valenzuela; Cervantes, 2021).

### **Modelo e estrutura da MOS**

As extrações de substâncias húmicas são realizadas, majoritariamente, em meio alcalino com hidróxido ou pirofosfato de sódio, na qual as frações extraídas são classificadas com base na solubilidade em ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina. A principal crítica ao material orgânico extraído é devido a uma suposta criação de artefatos que não seriam observados diretamente no solo, além de que as frações extraídas representam apenas uma fração da MOS e podem não representar a matéria orgânica total. O meio alcalino empregado nas extrações (pH 13) é muito além da faixa de pH verificados naturalmente no solo (pH 3,5-8,5) o que pode causar ionização de frações que não são ionizáveis no pH natural do solo, forçando uma reatividade não realística dos extratos. Além

das críticas às extrações, os modelos de substâncias húmicas são questionados como também o seu caminho de formação e o processo de humificação. O criticismo de Lehmann e Kleber (2015) baseia-se, principalmente, ao modelo de humificação que resultava em uma macromolécula, considerado até então um mecanismo de estabilização da MOS, pela formação de substâncias húmicas de alta massa molecular e estabilidade química conferida pelas ligações duplas resultantes do processo. O modelo de macromolécula já não era o modelo mais aceito, pois a teoria supramolecular é mais abrangente, que ajuda a explicar as variações moleculares encontradas no ambiente, como tamanho, estabilidade e as alterações que sofrem com o meio (Wells, 2015; Bayer et al., 2002a; De Nobili et al., 2020).

Baseado no modelo de que a MOS é humificada e transformada em macromolécula, Lehmann e Kleber (2015) refutaram a ideia da humificação como meio de formação de SH e propõe um modelo de decomposição contínua da MOS. No modelo de decomposição contínua (MDC) a MO é só decomposta por microrganismo, se torna sempre mais polar, mais solúvel em água, portanto, mais acessível aos microrganismos, e o destino é a completa mineralização. Ao mesmo tempo, com o aumento da polaridade do material orgânico no solo, e a transformação dos biopolímeros grandes em pequenos até monômeros, aumenta a susceptibilidade da matéria orgânica a sofrer interações organominerais e formação de agregados, o que poderia aumentar a resiliência no solo (Lehmann; Kleber, 2015). Assim, a MOS, de acordo com o modelo de decomposição contínua é composta por diferentes fragmentos orgânicos e produtos microbiológicos de tamanhos variáveis e em diferentes estágios de decomposição. Neste modelo os produtos do metabolismo anabólico microbiano, após morte celular, são liberados ao solo e decompostos, e não participam de uma síntese secundária ou humificação (processo termodinamicamente desfavorável, segundo os autores).

Quanto à crítica aos procedimentos de extrações alcalinas empregados, é o procedimento mais adotado, mas não o único. Diferentes solventes são empregados para extração, e mesmo com diferentes solventes nenhuma conclusão foi obtida em relação às alterações na composição dos extratos. As diferenças estruturais estão relacionadas com a matriz (solo/compostagem) (Dick; Burba, 1999; Hayes; Clapp, 2001; De Nobili et al., 2020; Audette et al., 2021). Hayes e Swift (2020) defendem que a extração e o fracionamento são procedimentos necessários empregados para obter o entendimento de um material heterogêneo e complexo, classificando as moléculas mais similares em AF, AH e HU. Defendem ainda que os procedimentos de extração são utilizados em outras ciências, como a extração de ácidos nucleicos e o estudo

fora das células, na qual sem a realização desses procedimentos não seria possível determinar sua estrutura e bioquímica (Hayes; Clapp, 2001).

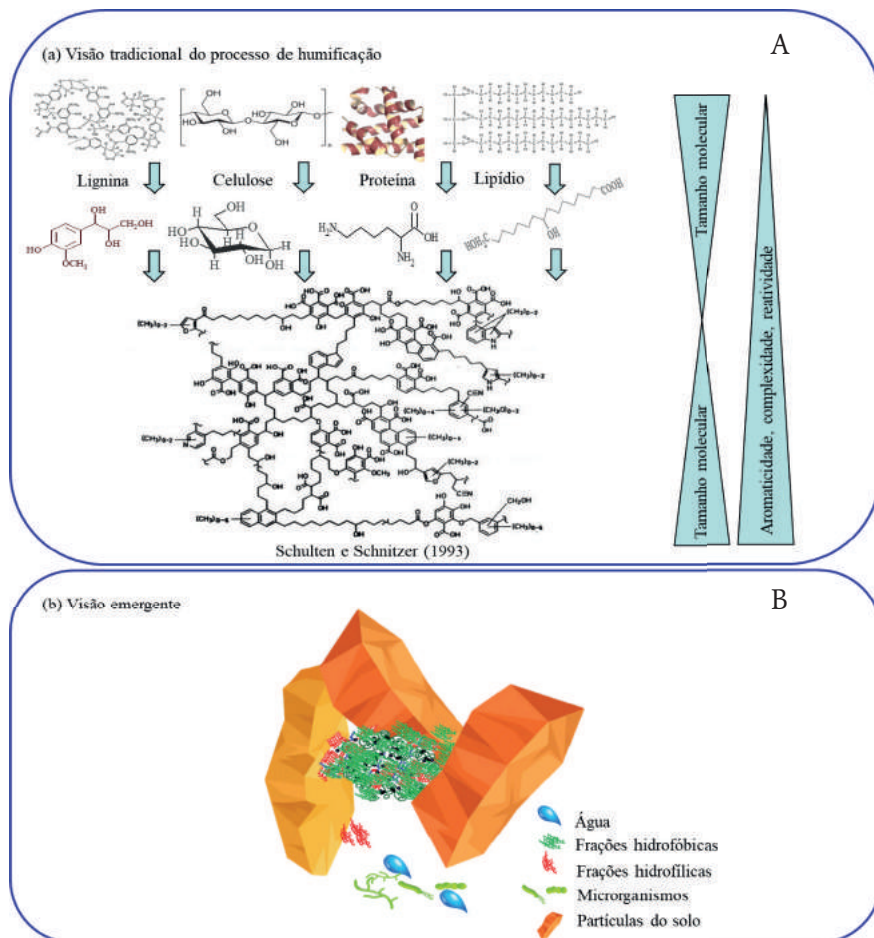
A divergência do emprego do termo humificação em sentidos opostos na literatura também foi motivo às críticas do processo utilizado para o aumento de aromaticidade remetendo a macromoléculas (Boguta et al., 2019; Traversa et al., 2014), outrora utilizado para a oxidação da MO e segregação das frações hidrofóbicas da solução do solo (Song et al., 2013; Spaccini; Piccolo et al., 2018; Piccolo, 2002). Além disso, o uso de definições antigas como a distinção de substâncias húmicas e não húmicas deixa abertura para críticas no processo, pois com os avanços das técnicas analíticas essa distinção não aparentou ser correta. As frações húmicas analisadas são compostos alquílicos derivados de ceras e poliésteres, compostos derivados de lignina, proteínas e carboidratos (Drosos; Piccolo, 2018; Vinci et al., 2020; Savarese et al., 2021), na qual estão organizados como uma associação de pequenas moléculas por meio de ligações do tipo fracas ou agregadas através de interações eletrostáticas com íons metálicos (Nebbioso; Piccolo, 2011; Soares da Silva et al., 2020). Ou seja, mesmo que em via de degradação os compostos identificados mostram relação com os seus precursores. Mas alguns autores defendem a ideia de que as SH se distinguem dos compostos de estrutura definidas (carboidratos, proteínas, lípidos) (De Nobili et al., 2020; Hayes; Swift, 2020), e que estes compostos podem sim compor os extratos húmicos, mas é devido a uma das limitações dos procedimentos de extração em isolar somente SH, por isso os métodos de extração ainda devem ser estudados.

Não descartando a possibilidade de formação de adutos no solo, enzimas como lacase e peroxidases, enzimas extracelulares, liberadas nos solos por fungos para obtenção de nitrogênio (N) e carboidratos, são reativas a compostos fenólicos gerando radicais (Hofrichter, 2002). A formação de radicais durante a degradação da lignina foi relacionada com a formação de moléculas policondensadas do tipo “black carbon” e substâncias cíclicas alifáticas (Waggoner et al., 2015; Didonato et al., 2016). Mas a probabilidade de ocorrer em grandes proporções são baixas, mas os trabalhos destacam que é possível ocorrer a formação de substâncias que se distinguem dos precursores. Na avaliação da aromaticidade e idade da MOS por fluorescência induzida por laser e datação de carbono, respectivamente, foi observado que uma matéria orgânica mais aromática não necessariamente é mais antiga (Tadini et al., 2018). Desvinculando paradigmas de que uma MO mais aromática seria mais antiga ou resiliente no solo. Em contrapartida, em processos de compostagem nota-se o aumento das frações de carbono alquil e aril com o tempo (Fialho et al., 2010), na qual pode estar relacionado a incorporação de frações hidrofóbicas e consumo das frações mais lábeis pelos microrganismos.



Com o conhecimento atual, a humificação poderia ser descrita como o acúmulo de frações hidrofóbicas, derivadas da degradação da MO, em que seu acúmulo no solo é resultado do acesso restrito dos microrganismos e suas exoenzimas solúveis em água, devido à proteção física exercida pelos aglomerados e também proteção causada pela natureza química devido a hidrofobicidade (Dungait et al., 2012; Piccolo, 2016). Ainda pode ser descrito como a segregação progressiva de compostos hidrofóbicos da fase aquosa do solo, derivados da transformação biótica e abiótica de biomoléculas liberadas com a morte das células. Esses compostos hidrofóbicos tais como C-alquílicos e C-aromáticos são então adsorvidos na superfície de aluminossilicatos por forças de natureza fraca e dispersiva (Piccolo, 2016). A afinidade mútua por outros compostos hidrofóbicos dirige a uma auto-associação progressiva em multicamadas hidrofóbicas, nos quais resultariam em um acúmulo de C no solo e com certa resiliência devido à proteção química exercida pela exclusão da água e de enzimas solúveis (Piccolo, 2016). A Figura 5b ilustra o que seria essa visão emergente de substâncias húmicas, em contrapartida ao processo de humificação tradicional que durante o decaimento dos biopolímeros aumentava-se a aromaticidade, tamanho molecular e reatividade (Figura 5a).

Há quem atribua a presença da MO no solo somente à interação organomineral, desqualificando a importância química das estruturas. Kögel-Knabner e Amelung (2021) reforçam a ideia de que a MO persiste no solo devido às suas características intrínsecas, pois mesmo uma MO de estrutura termodinamicamente lábil, pode persistir no solo devido a formação de agregado em diferentes escalas, sugerindo que não são as propriedades termodinâmicas da MO em si, mas sim a associação da MO com as superfícies minerais e sua participação em agregados que fornece acúmulo de carbono orgânico a longo prazo. Excluir as características químicas da MO, ou o processo de humificação anteriormente descrito, não explicaria a resiliência da MO ou de substâncias húmicas em turfas, carvão e lignito que estão em ausência ou em baixa presença de minerais, como o caso de solos com caráter predominante arenoso (Hayes; Swift, 2020).



**Figura 5.** Visão do processo tradicional de humificação (A) e visão emergente do processo (B).

Fonte: Adaptado de Schulten e Schnitzer (1993), Lehmann e Kleber (2015), Dungait et al. (2012) e Piccolo (2016).

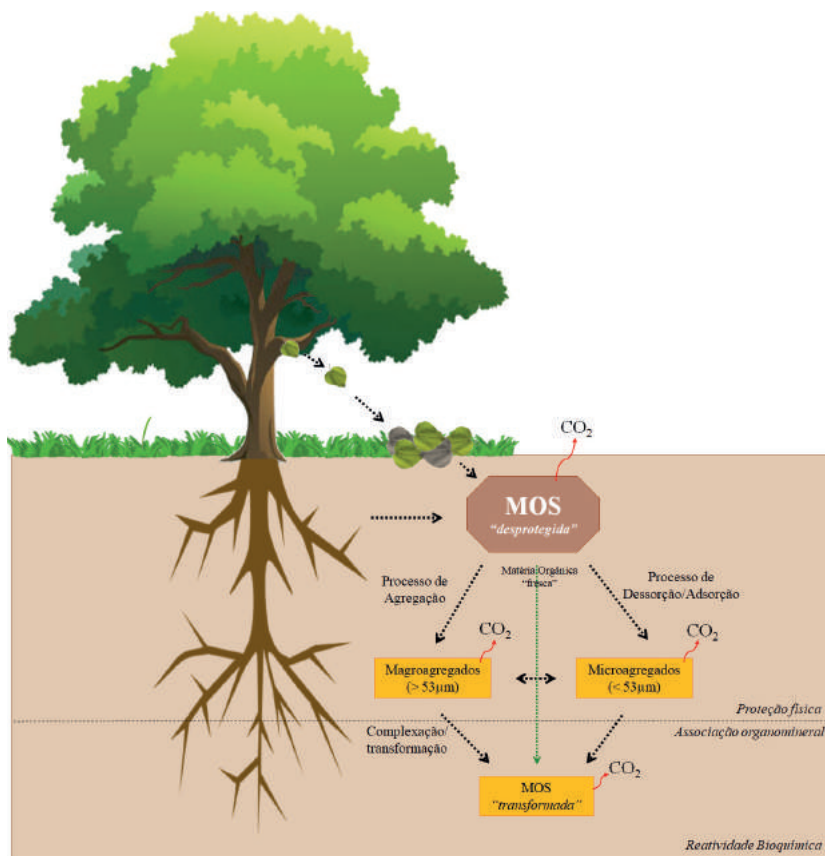
Recentemente, os autores da publicação do modelo contínuo de decomposição da MO propuseram que a resiliência do carbono orgânico no solo é devido a complexidade funcional que depende de três aspectos: 1) a diversidade molecular, 2) a heterogeneidade espacial, e 3) variabilidade temporal do sistema solo (Lehmann et al., 2020). A diversidade molecular da MOS requer um custo energético grande do metabolismo microbiano. Entretanto, moléculas que apresentam estruturas similares à rota metabólica microbiana podem ser utilizadas como fonte de energia para posterior metabolização de moléculas mais distintas. Indiretamente, a diversidade molecular proposta

acaba reconhecendo que a natureza química das moléculas tem função no acúmulo e coincidem com conceitos da humificação (segregação de moléculas hidrofóbicas) e da preservação seletiva (algumas moléculas são preferencialmente degradadas). O que os autores denominam de heterogeneidade espacial, na qual a MO pode estar alocada em um local restrito, remete a conceitos já discutidos da acessibilidade microbiana na literatura (Dungait et al., 2012). A agregação da MO, como a adsorção em minerais ajudam na heterogeneidade espacial aumentando a persistência da MOS. A variabilidade temporal é a degradação que pode ser ocasionada por manejos ou eventos naturais, como a chuva, causando acessibilidade a MO (Lehmann et al., 2020; Schimel et al., 2011).

Não há um consenso sobre a formação das substâncias húmicas, há uma maior aceitação pela teoria supramolecular devido a uma série de evidências como a variação do tamanho estrutural com solvente e pH (Conte; Piccolo, 1999; Piccolo, 2001). Faltam ainda evidências científicas para clarificar os mecanismos de acúmulo de C no solo, e para compreender se depende somente das características dos solos ou as características químicas da MO também interferem. O processo de humificação, como mecanismo de estabilização de C no solo, precisa ser melhor visualizado, o que se torna motivação para o avanço da pesquisa na área, para evolução no conhecimento do processo e gerar tecnologias de acúmulo de C baseadas no processo.

### **Caracterização da MOS obtidas por métodos de fracionamento físico (granulométrico e por densidade) e de amostras de solos intactos**

Os diferentes compartimentos da MOS podem ser sumarizados na Figura 6, cujo diagrama mostra os diferentes estágios de transformação da MOS, e de associações ou reações com os componentes minerais do solo ou de proteção dos compostos orgânicos por agregados do solo.



**Figura 6.** Mecanismo de transformação e proteção física da Matéria Orgânica no solo (MOS).

Fonte: Adaptado de Six et al. (2002).

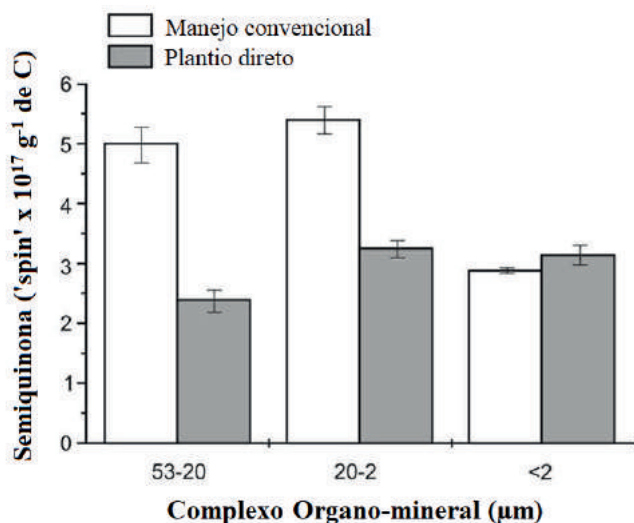
### ***Fracionamento físico por granulometria da MOS***

No processo de identificação dos diferentes compartimentos de C presentes no solo, um dos métodos mais utilizados é a medição do teor de C em cada unidade textural do solo. Assim, a separação granulométrica da MOS por peneiramento engloba pools de C ligados às frações texturais do solo, que se subdividem nas seguintes frações: > 150  $\mu\text{m}$ , 150 a 53  $\mu\text{m}$  (areia); 53 a 20  $\mu\text{m}$  (silte grosso); 20 a 2  $\mu\text{m}$  (silte fino), < 2  $\mu\text{m}$  (argila) (Martin-Neto et al., 1994; Bayer et al., 2000).

Resultados pioneiros com solos molissol da Argentina, com uso de ressonância paramagnética eletrônica em análises de agregados organominerais, permitiram identificar que as frações silte fino e silte grosso contêm material orgânico com maior caráter aromático (identificado pela maior concentração

de radicais livres do tipo semiquinona) do que a fração argila, e que, na fração areia, há material orgânico com menor concentração de grupos aromáticos, sugerindo uma menor estabilidade química intrínseca ao material orgânico (Martin-Neto et al., 1994).

Em um Acrisol do Rio Grande do Sul, foi possível monitorar a concentração de radicais livres semiquinona em agregados organominerais (Bayer et al., 2002b). Nesse trabalho, identificou-se que, em áreas de plantio direto com aumento no conteúdo da MOS, comparados com áreas de manejo convencional, após 9 anos de experimentos, houve redução no conteúdo relativo de radicais livres semiquinona, indicando a incorporação de material quimicamente menos recalcitrante às frações silte fino e silte grosso, mas não na fração argila (que originalmente tinha menor conteúdo de radicais livres, com resultado consistente aos obtidos em solos Molissol, da Argentina). Esse resultado, com agregados organominerais (Figura 7) se alinha às observações feitas com os ácidos húmicos comparando os resultados do 5º e 9º anos de histórico de manejos com plantio direto e convencional, conforme apresentado anteriormente no item 2.1. e publicado por Bayer et al. (2002a).



**Figura 7.** Determinação do conteúdo de radicais livres do tipo semiquinona em amostras de agregados organominerais em áreas sob manejo convencional e plantio direto em um Acrisol, RS, após 9 anos de manejos. A redução no conteúdo de radicais livres nas frações físicas silte grosso (53 a 20 microns) e silte fino (20 a 2 microns) em áreas sob plantio direto, comparativamente às áreas sob manejo convencional, são indicativos da entrada e acúmulo de material orgânico menos transformado.

Fonte: Adaptado de Bayer et al. (2002b).

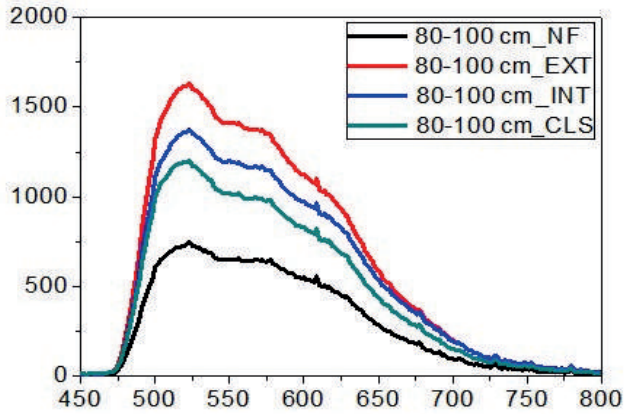
Vale ressaltar, todavia, que, para solos com maiores concentrações de argila e de óxidos e hidróxidos de ferro, as análises de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) em agregados organominerais são menos efetivas em apontar o grau de aromaticidade da MO, em razão das interações magnéticas, especialmente entre íons de ferro (III) que interferem nas medições.

### ***Fracionamento físico por diferenças em densidade***

A MOS pode estar inacessível devido à proteção física, e uma opção para avaliar sua estabilidade é por meio da dispersão com uma solução densa, com uso de iodeto de sódio ou politungstato de sódio (Conceição et al., 2007), a qual irá separar em três frações: inter-agregado (fração leve-livre, FFL), intra-agregado (fração leve-oclusa) e associada aos minerais (fração pesada, FP) (Hassink et al., 1993). Estudos descritos por Angst et al. (2021) através de análises de metadados de resultados publicados, mostraram que a necromassa microbiana é responsável por 50% do carbono estabilizado nas frações de agregados e na matéria orgânica associada aos minerais (MOAM) em agroecossistemas (por exemplo, sistemas integrados), o que implica que compostos ligníticos (por exemplo, biomoléculas vegetais) podem ser responsáveis por 50% da MO que está sendo protegida por esses minerais, que demonstra, assim, a importância do emprego desse fracionamento físico.

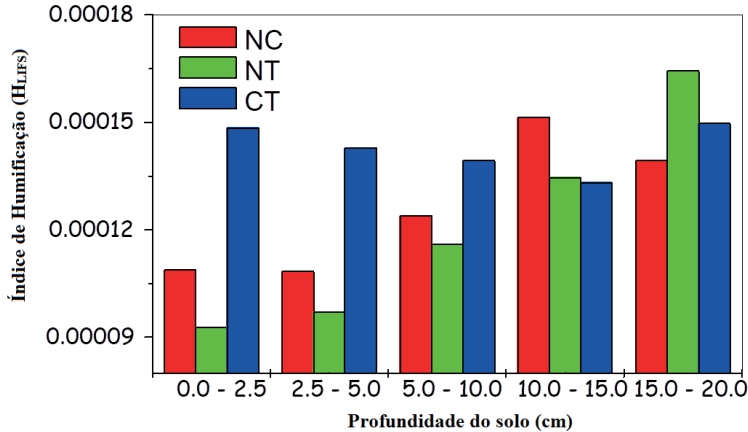
### ***Modelo estrutural da MO em solos intactos***

A tentativa de obter informações estruturais (químicas) da MOS em amostras de solos intactos, sem o uso do fracionamento químico ou físico, muitas vezes, se mostraram inviáveis devido às interferências das componentes minerais prevalentes nos solos, como ocorrem com as espectroscopias de ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética eletrônica, entre outras técnicas mais utilizadas (Milori et al., 2002; González-Pérez et al., 2007). Assim, na busca de ferramentas analíticas que pudessem viabilizar análises qualitativas da MOS com amostras de solos intactos (Figura 8), sem quaisquer fracionamentos físico ou químico, foi desenvolvido por pesquisadores brasileiros, de forma inédita, o uso da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS, do inglês Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy) (Milori et al., 2006; González-Pérez et al., 2007; Tadini et al., 2018; Tadini et al., 2021a). Esse desenvolvimento facilitou muito a obtenção de informações sobre o índice de humificação ( $H_{LIFS}$ ) da MOS (Figura 9) e vem tendo seu uso ampliado consideravelmente graças à facilidade de seu uso.



**Figura 8.** Esquema geral do conceito que a técnica espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS) utiliza com vista parcial do equipamento, indicando que o processo de humificação privilegia moléculas com cadeia fechada de maior estabilidade química e a indicação do cálculo do índice de humificação.

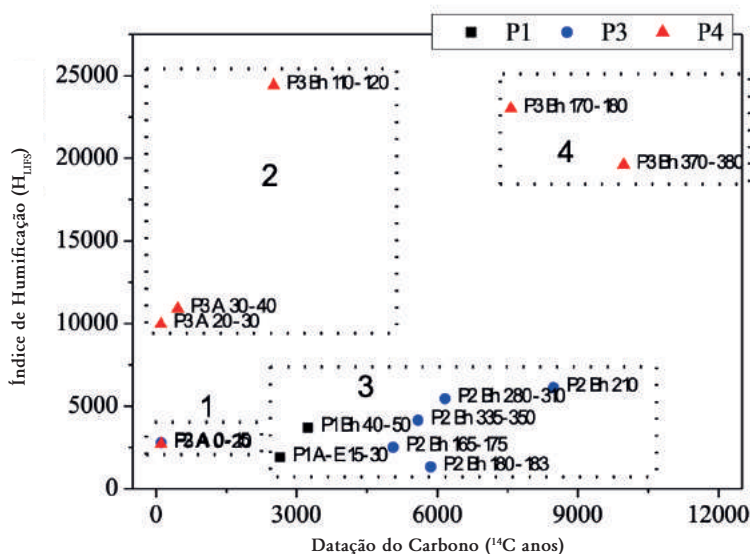
Fonte: Adaptado de Milori et al. (2002, 2006) e Tadini et al. (2021a).



**Figura 9.** Gráfico mostrando o índice de humificação ( $H_{LIFS}$ ) obtido pela espectroscopia de fluorescência induzida por laser (LIFS), em amostras de solos intactos, até 20 cm de profundidade, em áreas de solos não cultivados (NC, vegetação nativa), sob plantio direto (NT) e sob manejo convencional (CT), em um Acrisol do Rio Grande do Sul.

Fonte: Adaptado de Milori et al. (2006).

Ao correlacionar o índice de humificação ( $H_{LIFS}$ ) e a datação do carbono ( $^{14}C$ ), Tadini et al. (2018) verificaram que a matéria orgânica dos Espodosolos amazônicos é constituída por quatro tipos: humificada, recalcitrante e antiga; lábil e jovem; pouco humificada e antiga; humificada e jovem (Figura 10). Com isso, ficou demonstrado que o processo de humificação não tem associação direta com a idade da matéria orgânica nos Espodosolos amazônico.

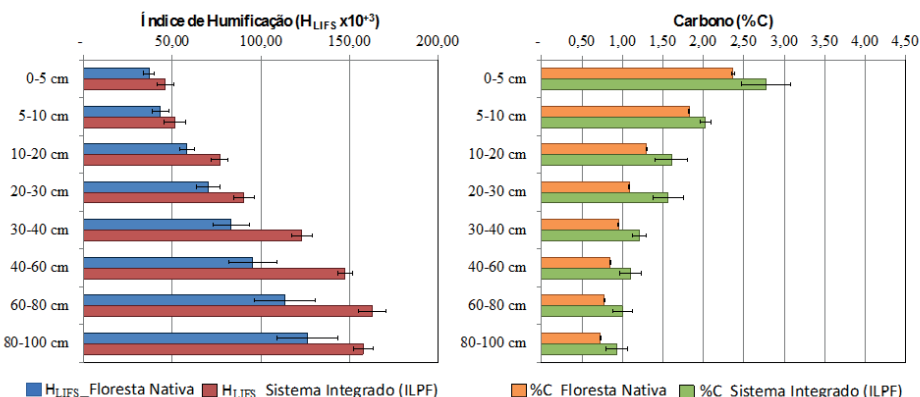


**Figura 10.** Gráfico de correlação do índice de humificação ( $H_{LIFS}$ ) dos solos amazônicos em função da datação de carbono ( $^{14}C$ ).

Fonte: Adaptado de Tadini et al. (2018).

Em recente estudo, Tadini et al. (2021a) observaram em um solo Latossolo Vermelho-Amarelo de textura média em São Carlos, SP, em áreas sob sistemas integrados lavoura-pecuária-floresta (ILPF) comparado com área de vegetação nativa, um grau de humificação da MOS superior na área de ILPF comparado com a vegetação nativa. Esse fato pode ser explicado graças ao grande volume de biomassa produzido e submetido à população diversificada de agentes biológicos (macrofauna e microrganismos) em áreas sob ILPF, levando a um material mais transformado quimicamente (Figura 11).





**Figura 11.** Gráficos que ilustram a relação entre o índice de humificação ( $H_{LIFS}$ ) com o teor de C em diferentes camadas de solo de áreas sob sistema integração lavoura-pecuária-floresta (ILPF) e floresta nativa, em experimento de longa duração da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP.

Fonte: Adaptado de Tadini et al. (2021a).

### Matéria orgânica dissolvida

A matéria orgânica dissolvida (MOD) é onipresente no ambiente terrestre, mas compreende apenas uma pequena fração da matéria orgânica do solo (MOS) (McGill et al., 1986). Por outro lado, possui papel importante, pois representa a fração mais móvel e reativa, controlando uma série de processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem no solo (Kalbitz et al., 2000; Zsolnay, 2003). Para fins operacionais, a MOD é definida como moléculas orgânicas de diferentes massas moleculares que passam por um filtro com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  (Zsolnay, 2003). Comparada às outras frações da MOS, o estudo da MOD ainda é restrito no contexto internacional, e incipientes em condições tropicais como no Brasil (Gmach et al., 2020). No entanto, encontram-se algumas revisões que enfatizam suas fontes e sumidouros; biodegradação; sorção pelos componentes do solo; transporte e importância ambiental (Kalbitz et al., 2000; Marschner; Kalbitz, 2003; McDowell, 2003; Bolan et al., 2011; Kaiser; Kalbitz, 2012; Gmach et al., 2020).

### Fontes e composição química da MOD do solo

As fontes da MOD do solo são distintas, mas com grandes contribuições via fotossíntese (Gmach et al., 2020). Os “pools” de carbono, ou seja, os reservatórios incluem fotossintatos recentes, como a serrapilheira, precipitação interna e escoamento (no caso de florestas), plantas em decomposição,

exsudatos de raízes e metabólitos microbianos, sendo todas fontes de carbono recente (McDowell, 2003; Gmach et al., 2020). Além disso, é destacada uma porção advinda das substâncias húmicas, como carbono mais antigo (Sanderman et al., 2008).

A MOD do solo é uma mistura de compostos solúveis em água, que apresenta em sua composição carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, vários cátions, entre outros, com uma ampla faixa de reatividade química (Gmach et al., 2020). Por outro lado, uma vez que o carbono representa cerca de 60% a 70% da matéria orgânica, a MOD é frequentemente quantificada por seu conteúdo de carbono, denominado carbono orgânico dissolvido (COD), extraído do solo com água ou soluções salinas (Provenzano et al., 2010). Ademais, assim como para as substâncias húmicas (SH), definir sua composição é uma tarefa difícil, visto a sua heterogeneidade (Van Den Berg et al., 2012).

De maneira geral, a MOD do solo é classificada em lábil e recalcitrante (Von Lützwow et al., 2007). A MOD lábil compreende aqueles compostos de baixa massa molecular, como carboidratos (glicose, frutose e outros), ácidos orgânicos e proteínas (Kaiser et al., 2001). Já a MOD recalcitrante consiste em macromoléculas de alta massa molecular, como os polissacarídeos provenientes da degradação da celulose e hemicelulose, que compõem parte da fração estável da MOS (Marschner; Kalbitz, 2003). Neste sentido, alguns autores defendem que fontes de carbono recente (“*carbono fresco*”) são as que mais contribuem para a composição da MOD (Wang et al., 2016). Em contraste, outros estudos mostraram maior contribuição advinda da matéria orgânica estável (Sanderman et al., 2008; De Troyer et al., 2011).

Cabe ressaltar que grande parte das moléculas na MOD não fazem parte de uma “*solução verdadeira*”, mas sim de uma dispersão coloidal (1 nm a 1 µm), representando o estado intermediário entre uma solução verdadeira (<1nm) e uma suspensão (>1µm) (Yan et al., 2018). Adicionalmente, alguns fatores-chave controlam a solubilidade destes colóides orgânicos no solo. O primeiro fator a destacar é sua carga elétrica líquida. A alta densidade de carga favorece a solubilidade da matéria orgânica do solo (Tipping e Hurley, 1992). Logo em seguida, destaca-se o pH da solução do solo. O aumento do potencial hidrogeniônico provoca o aumento da desprotonação de grupos orgânicos, culminando no aumento de mais cargas negativas (Andersson et al., 2000). Portanto, compostos mais lábeis e reativos tendem a constituir a maior fração do MOD no solo.

A composição molecular da MOD é importante para compreensão do seu destino no ambiente. Por outro lado, esta análise pode ser desafiadora devido

à baixa concentração dos componentes individuais na mistura e ao grande número de moléculas distintas (Nebbioso; Piccolo, 2013). Estudos mostram que uma única amostra de MOD pode conter milhares de moléculas diferentes (Hertkorn et al., 2016). No entanto, grandes avanços têm sido observados com o passar dos anos. É necessário reconhecer que nenhuma técnica de análise isolada pode detectar 100% da composição em âmbito molecular, visto que matrizes ambientais são altamente complexas. Para isto, o emprego de um conjunto de técnicas auxilia no melhor entendimento da estrutura química a partir da caracterização e da quantificação dos compostos à base de carbono presentes na MOD.

As técnicas analíticas incluem a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), fluorescência molecular e ressonância magnética nuclear (RMN), sendo todas largamente empregadas no estudo da estrutura química da MOD. Além disso, a análise de isótopos estáveis de carbono ( $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e datação por radiocarbono ( $^{14}\text{C}$ ) podem fornecer informações relevantes sobre a fonte de carbono, reatividade e destino no ambiente. Ademais, grande destaque tem sido dado atualmente para a espectrometria de massas de alta resolução, como a espectrometria de massa de ressonância de íon ciclotron com transformação de Fourier (FT-ICR-MS). Através desta técnica é possível a identificação e a quantificação do número de moléculas presentes em uma determinada amostra (Sanderman et al., 2008; Nebbioso; Piccolo, 2013; Hertkorn et al., 2016; Roth et al., 2019).

### ***Mecanismos que regulam a dinâmica da MOD no solo***

A dinâmica da MOD do solo é diferente daquela em corpos aquáticos. No ambiente terrestre a biomassa de produtores primários é maior e amplamente controlada por interações entre os componentes bióticos e abióticos (Bolan et al., 2011). Além disso, o reservatório da MOD é resultado de diversos processos, sejam químicos (sorção e complexação), físicos (lixiviação e eluviação) e biológicos (biodegradação e biotransformação), moderados pelo pH do solo, teor de argila, atividade microbiana, carbono orgânico, temperatura e umidade, onde a intensidade destes processos variam de acordo com o uso e manejo do solo (Kalbitz et al., 2000; Bolan et al., 2011; Kaiser; Kalbitz, 2012; Gmach et al., 2020).

A MOD atua como agente quelante, formando complexos com metais (nutrientes ou não), e poluentes orgânicos. Este fenômeno pode ser benéfico ou maléfico, dependendo da constante de estabilidade do complexo formado. Com isto, a MOD atua diretamente na translocação de nutrientes e poluentes no solo (Chien et al., 2021).

Adentrando nestes aspectos, a MOD pode ser retida (sorvida) na fase sólida do solo, os óxidos hidratados de ferro e alumínio (tipo de argila) (Kothawala et al., 2009; Saidy et al., 2015). Este processo diminui sua mobilidade e forma um “*escudo*” contra a biodegradação, retenção essa intensificada no subsolo devido aos maiores teores de sorvente (argila) (Kalks et al., 2020). Isto ocorre devido à carga elétrica positiva destes minerais com a diminuição do pH do solo (solos mais ácidos), que sorvem com os polieletrólitos carregados negativamente do material orgânico (Jansen et al., 2005). Tendo isto em mente, este processo de sorção da MOD na fase sólida do solo (proteção física) é reconhecido como um mecanismo que contribui para o acúmulo e estabilização da MOS (Kaiser; Guggenberger, 2000; Saidy et al., 2015).

A contribuição da MOD para o sequestro de carbono nos solos requer conhecimentos sobre sua taxa de biodegradação, pois durante a decomposição da matéria orgânica, parte do carbono é perdido na forma de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para a atmosfera (De Troyer et al., 2011). Com isto, frações mais lábeis são a principal fonte de alimento para os microrganismos, ao passo que as mais recalcitrantes persistem por mais tempo (Von Lützw et al., 2007). Assim, a maior degradação da MOD pode diminuir sua estabilização no solo e influenciar no sequestro de carbono. Este efeito pode ser intensificado em regiões de clima tropical, devido ao aumento dos fluxos de  $\text{CO}_2$  pela atividade microbiana acelerada. No entanto, este efeito ainda é pouco investigado em solos tropicais (Gmach et al., 2020).

Outro processo importante a se analisar é sua passagem da MOD pelo perfil do solo, onde seu destino é influenciado pelas interações entre carbono orgânico, fases minerais e microrganismos (Kalks et al., 2020). O teor da MOD nas diferentes camadas orgânicas e mineral também é influenciado pelas características sazonais, vegetacionais, pedológicas e microbianas (Lee et al., 2018). Nesta perspectiva, a MOD das camadas superficiais (horizonte O) são as principais fontes de carbono orgânico no subsolo (camada mineral), onde ficam adsorvidas, por processos físico-químicos. Kalbitz e Kaiser (2008) estimaram que a contribuição do COD para os reservatórios de carbono do solo nos horizontes B e C em um Podzol variou de 25 a 66% do estoque total de carbono.

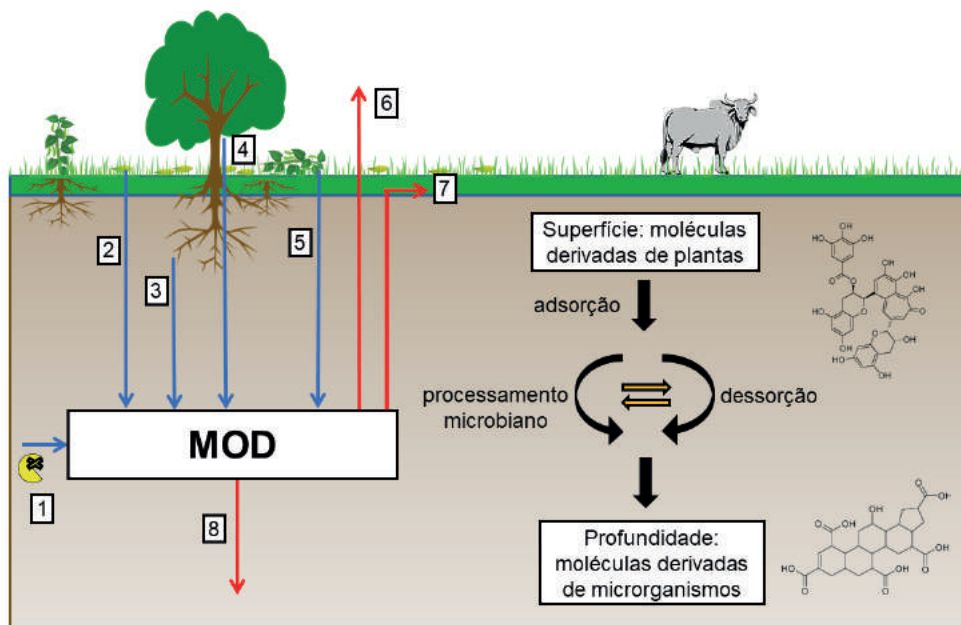
A composição da MOD na superfície do solo é caracterizada pela presença de fenóis derivados de lignina, ao passo que no subsolo encontram-se maiores teores de carboidratos e compostos ricos em nitrogênio. Neste sentido, o solo atuaria em relação a MOD como um sistema cromatográfico, onde os compostos mais sortivos (reativos) são retidos na superfície e os mais móveis são lixiviados (Guggenberger; Kaiser, 2003; Kaiser et al., 2004). No entanto, após cerca de

uma década destes trabalhos, Kaiser e Kalbitz (2012) propuseram um modelo diferente para o movimento vertical da MOD no solo. Segundo esses autores, a MOD na superfície do solo possui uma assinatura de radiocarbono moderna, em contraste do subsolo que possui depleção em radiocarbono, o que indica a presença de carbono mais antigo. Portanto, a MOD no subsolo, rica em carboidratos, e tendo uma assinatura de material mais degradado, sugere mais a presença de produtos de degradação do que fonte de nutrientes. Nesta lógica, os conceitos que explicam estes aspectos é que a MOD fresca na superfície é adsorvida e sofre decomposição microbiana. Com o passar do tempo, os metabólitos (facilmente dessorvíveis) migram para camadas subjacentes, onde novos compostos que são introduzidos, e mais fortemente sorvíveis, ocupam o lugar na superfície.

Assim, o transporte da MOD no perfil do solo não seria apenas resultado de uma separação físico-química, mas também do processamento microbiano. A degradação lenta da MOD no subsolo, deixando-a envelhecer, associada ao aumento da idade do radiocarbono, contrasta suposições de que as raízes são a principal fonte de carbono nestes horizontes. Com isso, os autores constataram que a matéria orgânica dissolvida mais antiga reside na parte mais jovem do perfil do solo, onde esta teoria foi comprovada por Leinemann et al. (2018) em experimentos de laboratório. Neste sentido, juntamente com as entradas e saídas da MOD no solo, segue na Figura 12 as principais ideias da sua dinâmica ao longo do perfil.

### ***Importâncias agronômica e ambiental***

O estudo da MOD do solo vem ganhando destaque com o passar dos anos, principalmente no exterior. A abordagem deste tópico em solos brasileiros ainda é incipiente (Gmach et al., 2020). A MOD é um componente-chave no ciclo biogeoquímico do carbono e está entre os reservatórios de material orgânico mais reativos na superfície da Terra. A maior parte da MOD é mineralizada ou sorvida, com pequena parte atingindo os corpos aquáticos, onde sua concentração e dinâmica no solo é altamente suscetível às mudanças antrópicas, sendo mais sensível à perturbação do que a MOS como um todo (Kaiser; Kalbitz, 2012). Ademais, este componente pode atuar tanto como sumidouro ou como fonte de dióxido de carbono para a atmosfera, e, portanto, exercendo influência no aquecimento global.



**Figura 12.** Representação esquemática das principais entradas e saídas da matéria orgânica dissolvida (MOD) no sistema, bem como sua dinâmica com o perfil do solo. Entrada (setas azuis): 1 - lise microbiana; 2 - serrapilheira; 3 - exsudatos de raízes; 4 - precipitação interna; 5 - plantas em decomposição. Saída (setas vermelhas): 6 - degradação microbiana; 7 - escoamento superficial, e, 8 - lixiviação. Dinâmica com o perfil do solo: a MOD na superfície é composta por moléculas orgânicas derivadas de plantas, com alto nível de insaturação, como polifenóis e outros compostos com alta aromaticidade (devido ao maior teor de lignina nos tecidos vegetais) que são adsorvidas nos minerais e sofrem processamento microbiano. A MOD em profundidade, resultado da dessorção e percolação da superfície, é altamente insaturada, mas não aromática e provinda de moléculas derivadas de microrganismos, como alicíclicos ricos em carboxila.

Fonte: Kalbitz et al. (2000), Marschner e Kalbitz (2003), McDowell (2003), Bolan et al. (2011), Kaiser e Kalbitz (2012), Roth et al. (2019) e Gmach et al. (2020).

A MOD é essencial para estabilizar a matriz do solo, além de atuar nos processos de imobilização, mineralização e translocação de nutrientes, sorção, imobilização e degradação de poluentes orgânicos, como também servir de substrato para os microrganismos do solo. Desta forma, o conhecimento das multifuncionalidades da MOD pode auxiliar na escolha de estratégias para magnificar seus impactos positivos e reduzir os negativos no solo, principalmente no Brasil, onde as práticas de manejo conservacionistas tem ganhado visibilidade, como o sistema plantio direto, intensificação de

pastagens e integração lavoura-pecuária-floresta (Gmach et al., 2020). Neste quesito, abordagens que interligam tanto as propriedades químicas como físicas e biológicas do solo são necessárias para alcançar a melhor compreensão dos processos que regula os níveis no solo de matéria orgânica dissolvida, bem como o ciclo, a dinâmica e as formas e fluxos no ambiente.

### **Considerações Finais**

Apesar de mais de um século de pesquisas e trabalhos científicos, a natureza e estrutura química da matéria orgânica dos solos (MOS) precisa ainda ser elucidada, pois acumula controvérsia científica. A mais recente questiona os processos e rotas de síntese das substâncias húmicas no solo. Assim, dada a relevância e implicações da controvérsia para os aspectos ligados a natureza química da MOS, optou-se por apresentar de forma mais didática possível toda a evolução do conceito das substâncias húmicas (item 2.1). Ainda, foi discutido um item específico “Conceitos recentes sobre a estrutura da MOS” para apresentar os aspectos mais controversos, bem como as recentes publicações que se contrapõem às críticas aos modelos até então aceitos. Também foram discutidos os aspectos ligados aos métodos de fracionamento físico da MOS, com agregados organominerais e frações obtidas por diferenças de densidade, com contribuições de condições de agregação dos solos, e estudos recentes e técnica inédita que fornece informações sobre a estrutura da MO em amostras de solos intactos. Dados e associações de um tópico pouco monitorado e entendido, particularmente no Brasil, sobre a matéria orgânica dissolvida e suas contribuições para a fertilidade do solo e seu papel no acúmulo da MOS, em função das diferentes práticas de manejos de solos e sistemas de cultivos adotados nas lavouras do Brasil foram incluídos nas discussões

É necessário ressaltar que nos últimos anos houve uma imensa mudança em relação aos aspectos de acúmulo da MO nos solos do Brasil, com demonstrações de situações e técnicas de cultivo e manejo do solo que levam ao sequestro de carbono, um modo eficaz de reduzir o efeito estufa e o aquecimento global. Foram apresentados os aspectos e mecanismos de estabilização da MOS relevantes para se entender e elencar as práticas de manejo de solo e sistemas de cultivo que causam maior armazenamento de carbono no sistema solo-planta. Em um passado não muito distante (~25 a 30 anos), quando predominavam no Brasil o uso intensivo de máquinas e as práticas pouco conservacionistas de manejo do solo, como aração e gradagem intensivas, as pesquisas eram quase que essencialmente relacionadas às perdas da MOS e às situações que acarretavam a degradação do solo. Com a ampla adoção de práticas de manejo do solo mais conservacionistas, especialmente o sistema de plantio direto, e outras

boas práticas de manejos das culturas, observa-se uma mudança relevante nesse quadro, e as possibilidades de grande recuperação da MOS em solos degradados e a manutenção e aumento da MOS, especialmente em áreas de solos de cerrados. O sequestro de carbono em solos de cerrado é uma grande conquista da agricultura brasileira, pois se tratava de algo pouco provável nas condições de manejo de solos tropicais implementadas há algumas décadas. Este fato ganha ainda mais notoriedade graças a recente publicação de Nicoloso e Rice, 2021, onde através de análises de metadados de 121 experimentos de campo, de 19 países e 6 continentes, demonstraram que áreas de clima mais quente, como os do Brasil, tem melhores condições para aumentar o sequestro de C no solo. Assim, os aspectos ligados a associação organomineral, a proteção de compostos orgânicos em macro e microagregados do solo, e a própria recalcitrância (bio) química da MOS, especialmente em ambientes de manejos conservacionistas, são aspectos relevantes que determinam a natureza química da MOS, pois, além das implicações agrônômicas importantes, estão ligadas à persistência (tempo de meia vida) de compostos orgânicos no solo, e que mereceram maior atenção nos itens abordados neste capítulo. Em adição, do ponto de vista acadêmico, é muito importante entender os aspectos químicos tradicionais e os mais avançados e aceitos atualmente sobre a estrutura química da MOS, para poder avançar e consolidar conhecimentos inéditos sobre os efeitos das diferentes práticas de manejos, combinações de culturas agrícolas, associadas com pastagens e florestas, como nos sistemas integrados ILPF e em sistemas agroflorestais, entre outras promissoras estratégias de manejo do solo nos trópicos.

Quanto aos aspectos atuais e tendências de pesquisas sobre estruturas químicas da MOS e suas frações, identificados no país e especialmente no exterior, e com base na percepção dos autores, é preciso destacar que é necessário:

- 1) Utilização de métodos espectroscópicos e cromatográficos para identificações de constituintes químicos da MOS e suas frações, por exemplo:  $^{13}\text{C}$  ressonância magnética nuclear, modos mono e bidimensional; métodos cromatográficos avançados com uso ou não de pirólise e em combinação com espectrometria de massa (GC-MS); “Electrospray Ionization - Fourier Transform - Ion Cyclotron Resonance - Mass Spectrometry” (ESI-FT-ICR-MS), “Nano Secondary Ion Mass Spectrometry” (NanoSIMS).
- 2) Experimentos com utilização de compostos químicos marcados, como isótopos de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  e outros, em experimentos controlados em laboratório, casa de vegetação ou em campo (lisímetros e outras condições que permitam controle), em estudos da transformação, transporte e incorporação da MO em solos;



- 3) Estudos de datação de  $^{14}\text{C}$  em ambientes naturais e em situações que permitam estimar o tempo de vida dos compostos orgânicos nos solos;
- 4) Métodos de imagens com resolução atômica ou subatômica e uso de Microscópio Eletrônico, Microscópio de Força Atômica (ou de tunelamento), Microscópio Confocal de Varredura a Laser, entre outros.
- 5) Combinação de experimentos de incubação em condições controladas em laboratório ou em campo e estudos de modelagem da MOS, com projeções futuras sobre as condições de acúmulo e de tempo de meia vida dos compostos orgânicos nos solos;
- 6) Experimentos de campo de longa duração para diferentes sistemas de manejos nos diferentes biomas do Brasil, especialmente em situações que indiquem o acúmulo e sequestro de carbono no solo, como práticas essenciais para o entendimento de mudanças na dinâmica e estrutura da MOS;
- 7) Ampliação de análises sobre a estabilidade química da MOS em propriedades rurais privadas nos diferentes biomas do Brasil, como aspecto importante para estimar o tempo de vida de compostos orgânicos sequestrados nos solos.

Enfim, inúmeras oportunidades para as pesquisas sobre MOS e seus aspectos químicos e estruturais se mantêm e estão associadas a iminente consolidação do mercado de créditos de carbono no solo, em um contexto global, com pagamento de créditos aos produtores rurais que adotam práticas conservacionistas de manejos dos solos e plantas, com identificação de sequestro de carbono, e como mais uma estratégia vinculada aos mecanismos de compensação de emissões de gases do efeito estufa por indústrias e outras empresas, setor em que o Brasil tem muito a contribuir e a ganhar.

## Referências

- ANDERSSON, S.; NILSSON, S. I.; SAETRE, P. Leaching of dissolved organic carbon (DOC) and dissolved organic nitrogen (DON) in mor humus as affected by temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 1-10, 2000.
- ANGST, G.; MUELLER, K. E.; NIEROP, K. G. J.; SIMPSON, M. J. Plant- or microbial derived? A review on the molecular composition of stabilized soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 156, 108189, 2021.
- AUDETTE, Y.; VORONEY, R. P.; LONGSTAFFE, J. G.; GILLESPIE, A. W.; SMITH, D. S. Validation and comparisons of NaOH and Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> extraction methods for the characterization of organic amendments. *Soil Science Society of America Journal*, v. 85, p. 273-285, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/saj2.20195>.
- BALDOCK, J. A.; SKJEMSTAD, J. O. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic Geochemistry*, v. 31, p. 697-710, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00049-8).
- BAVEYE, P. C.; WANDER, M. The (bio) chemistry of soil humus and humic substances: Why is the “new view” still considered novel after more than 80 years? *Frontiers in Environmental Science*, v. 7, p. 35-36, 2019.
- 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 Tillage Research*, v. 53, p. 95-104, 2000.

- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; SAAB, S. C.; MILORI, D. M. B. P.; BAGNATO, V. S. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. *Geoderma*, v. 105, p. 81-92, 2002a.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P. R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. *Plant and Soil*, v. 238, p. 133-140, 2002b.
- BENITES, V. M.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. A. **Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo.** Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2003. 7 p. (Embrapa Solos. Comunicado técnico, 16).
- BOGUTA, P.; D'ORAZIO, V.; SENESI, N.; SOKOŁOWSKA, Z.; SZEWCZUK-KARPISZ, K. Insight into the interaction mechanism of iron ions with soil humic acids. The effect of the pH and chemical properties of humic acids. *Journal of Environmental Management*, v. 245, p. 367-374, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.098>.
- BOLAN, N. S.; ADRIANO, D. C.; KUNHIKRISHNAN, A.; JAMES, T.; MCDOWELL, R.; SENESI, N. Dissolved organic matter: biogeochemistry, dynamics, and environmental significance in soils. *Advances in Agronomy*, v. 110, p. 1-75, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385531-2.00001-3>.
- BURDON, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Science*, v. 166, p. 752-769, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00004>.
- BURGUES, A.; HURST, H. M.; WALKDEN, S. B.; DEAN, F. M.; HIRST, M. Nature of humic acids. *Nature*, n. 4894, 1963.
- CHIEN, S. W. C.; WANG, H. H.; CHEN, Y. M.; WANG, M. K.; LIU, C. C. Removal of heavy metals from contaminated paddy soils using chemical reductants coupled with dissolved organic carbon solutions. *Journal Hazardous Materials*, v. 403, 123549, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123549>.
- CHIOU, C. T.; KILE, D. E.; RUTHERFORD, D. W.; SHENG, G.; BOYD, S. A. Sorption of selected organic compounds from water to a peat soil and its humic-acid and humin fractions: potential sources of the sorption nonlinearity. *Environmental Science Technology*, v. 34, p. 1254-1258, 2002.
- CONCEIÇÃO, P. C.; BOENI, M.; DIECKOW, J.; BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J. Eficiência da poltungstato de sódio no fracionamento densimétrico da matéria orgânica do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 31, p. 1301-1310, 2007.
- CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformational arrangement of dissolved humic substances. influence of solution composition on association of humic molecules. *Environmental Science Technology*, v. 33, p. 1682-1690, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/es9808604>.
- COTRUFO, M. F.; SOONG, J. L.; HORTON, A. J.; CAMPBELL, E. E.; HADDIX, M. L.; WALL, D. H.; PARTON, W. J. Formation of soil organic matter via biochemical and physical pathways of litter mass loss. *Nature Geoscience*, v. 8, p. 776-779, 2015.
- DE NOBILI, M.; BRAVO, C.; CHEN, Y. The spontaneous secondary synthesis of soil organic matter components: A critical examination of the soil continuum model theory. *Applied Soil Ecology*, v. 154, 103655, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103655>.
- DE TROYER, I.; AMERY, F.; VAN MOORLEGHEM, C.; SMOLDERS, E.; MERCKX, R. Tracing the source and fate of dissolved organic matter in soil after incorporation of a <sup>13</sup>C labelled residue: A batch incubation study. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, p. 513-519, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.016>.
- DICK, D. P.; BURBA, P. Extraction kinetics and molecular size fractionation of humic substances from two brazilian soils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 10, p. 146-152, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50531999000200013>.
- DIDONATO, N.; CHEN, H.; WAGGONER, D.; HATCHER, P. G. Potential origin and formation for molecular components of humic acids in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 178, p. 210-222, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.01.013>.
- DOU, S.; SHAN, J.; SONG, X.; CAO, R.; WU, M.; LI, C.; GUAN, S. Are humic substances soil microbial residues or unique synthesized compounds? A perspective on their distinctiveness. *Pedosphere*, v. 30, p. 159-167, 2020.
- DROSOS, M.; NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Humeomics: A key to unravel the humic pentagram. *Applied Soil Ecology*, v. 123, p. 513-516, 2018.
- DROSOS, M.; PICCOLO, A. The molecular dynamics of soil humus as a function of tillage. *Land Degradation and Development*, v. 29, p. 1792-1805, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ldr.2989>.
- DUNGAIT, J. A. J.; HOPKINS, D. W.; GREGORY, A. S.; WHITMORE, A. P. Soil organic matter turnover is governed by accessibility not recalcitrance. *Global Change Biology*, v. 18, p. 1781-1796, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02665.x>.
- FIALHO, L. L.; SILVA, W. T. L.; MILORI, D. M. B. P.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L. Characterization of organic matter from composting of different residues by physicochemical and spectroscopic methods. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1927-1934, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.039>.

- FLAIG, W. Effects of micro-organisms in the transformation of lignin to humic substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 28, p. 1523-1535, 1964. DOI: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(64\)90003-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(64)90003-1).
- FLAIG, W. Biochemical factors in coal formation. In: YON GAERTNER, H. R.; WEHNER, H. (ed.). *Advances in organic geochemistry*. Oxford-Braunschweig: Pergamon Press, 1972. 197-232 p.
- GARCÍA, A. C.; VAN TOL DE CASTRO, T. A.; SANTOS, L. A.; TAVARES, O. C. H.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L.; GARCÍA MINA, J. M. Structure-property-function relationship of humic substances in modulating the root growth of plants: A Review. *Journal Environmental Quality*, v. 48, p. 1622-1632, 2019.
- GMACH, M. R.; CHERUBIN, M. R.; KAISER, K.; CERRI, C. E. P. Processes that influence dissolved organic matter in the soil: A review. *Science Agricola*, v. 77, e20180164, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0164>.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; MILORI, D. M. B. P.; COLNAGO, L. A.; MARTIN-NETO, L.; MELO, W. J. A. Laser-induced fluorescence spectroscopic study of organic matter in a Brazilian Oxisol under different tillage systems. *Geoderma*, v. 138, p. 20-24, 2007.
- GUGGENBERGER, G.; KAISER, K. Dissolved organic matter in soil: Challenging the paradigm of sorptive preservation. *Geoderma*, v. 113, p. 293-310, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00366-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00366-X).
- GUO, X.; LIU, H.; WU, S. Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions. *Science of the Total Environment*, v. 662, p. 501-510, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.137>.
- HASSINK, J.; BOUWMAN, L. A.; ZWART, K. B.; BLOEM, J.; BRUSSAARD, L. Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and c and n mineralization in grassland soils. *Geoderma*, v. 57, p. 105-128, 1993.
- HATCHER, P. G.; BREGER, I. A.; MATTINGLY, M. A. Structural characteristics of fulvic acids from Continental Shelf sediments. *Nature*, v. 285, p. 560-562, 1980.
- HATCHER, P. G.; MACIEL, G. E.; DENNIS, L. W. Aliphatic structure of humic acids; a clue to their origin. *Organic Geochemistry*, v. 3, p. 43-48, 1981.
- HATCHER, P. G.; OREM, W. H. Structural interrelationships among humic substances in marine and estuarine sediments - as delineated by cross-polarization/magic angle spinning carbon-13 NMR. In: SOHN, M. L. (ed.). *Organic Marine Geochemistry*. Washington: American Chemical Society, v. 305, 1986. p. 142-157. DOI: <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0305.ch009>.
- HATCHER, P. G.; WAGGONER, D. C.; CHEN, H. Evidence for the existence of humic acids in peat soils based on solid state <sup>13</sup>C NMR. *Journal of Environmental Quality*, v. 48, p. 1571-1577, 2019.
- HAYES, M. H. B.; CLAPP, C. E. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Science*, v. 166, p. 723-737, 2001.
- HAYES, M. H. B.; SWIFT, R. S. An appreciation of the contribution of Frank Stevenson to the advancement of studies of soil organic matter and humic substances. *Journal Soils Sediments*, v. 18, p. 1212-1231, 2018.
- HAYES, M. H. B.; SWIFT, R. S. Vindication of humic substances as a key component of organic matter in soil and water. *Advances in Agronomy*, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.05.001>. v. 163, p. 1-37.
- HEDGES, J.; ERTEL, J. R. The lignin component of humic substances: Distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 48, p. 2065-2074, 1984.
- HERTKORN, N.; HARIR, M.; CAWLEY, K. M.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; JAFFÉ, R. Molecular characterization of dissolved organic matter from subtropical wetlands: A comparative study through the analysis of optical properties, NMR and FTICR/MS. *Biogeosciences*, v. 13, p. 2257-2277, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5194/bg-13-2257-2016>.
- HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 454-466, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2).
- HUANG, P. M.; HARDIE, A. G. Formation mechanisms of humic substances in the environment. In: SENESI, N.; XING, B. S.; HUANG, P. M. (ed.). *Biophysico-chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems*. John Wiley & Sons, New York: 2009. p. 41-109.
- JANSEN, B.; NIEROP, K. G. J.; VERSTRATEN, J. M.; Mechanisms controlling the mobility of dissolved organic matter, aluminium and iron in podzol B horizons. *European Journal of Soil Science*, v. 56, p. 537-550, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2004.00686.x>.
- JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; ALMENDROS, G.; WAGGONER, D. C.; ÁLVAREZ, A. M.; HATCHER, P. G. Assessment of the molecular composition of humic acid as an indicator of soil carbon levels by ultra-high-resolution mass spectrometric analysis. *Organic Geochemistry*, v. 143, 104012, 2020.

- KAISER, K.; GUGGENBERGER, G. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 711-725, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00046-2).
- KAISER, K.; KALBITZ, K. Cycling downwards - dissolved organic matter in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 52, p. 29-32, 2012.
- KAISER, K.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. Seasonal variations in the chemical composition of dissolved organic matter in organic forest floor layer leachates of old-growth Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands in northeastern Bavaria, Germany. **Biogeochemistry**, v. 55, p. 103-143, 2001.
- KAISER, K.; GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L. Changes in dissolved lignin-derived phenols, neutral sugars, uronic acids, and amino sugars with depth in forested HaplicArenosols and RendzicLeptosols. **Biogeochemistry**, v. 70, p. 135-151, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:Biog.0000049340.77963.18>.
- KALBITZ, K.; KAISER, K. Contribution of dissolved organic matter to carbon storage in forest mineral soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 171, p. 52-60, 2008.
- KALBITZ, K.; SOLINGER, S.; PARK, J.H.; MICHALZIK, B.; MARTZNER, E. Controls on the dynamics of organic matter in soils: a review. **Soil Science**, v. 165, p. 277-304, 2000.
- KALKS, F.; LIEBMANN, P.; WORDELL-DIETRICH, P.; GUGGENBERGER, G.; KALBITZ, K.; MIKUTTA, R.; HELFRICH, M.; DON, A. Fate and stability of dissolved organic carbon in topsoils and subsoils under beech forests. **Biogeochemistry**, v. 148, p. 111-128, 2020.
- KLEBER, M.; LEHMANN, J. Humic substances extracted by alkali are invalid proxies for the dynamics and functions of organic matter in terrestrial and aquatic ecosystems. **Journal of Environmental Quality**, v. 48, p. 207-216, 2019.
- KLEINHEMPEL, D. Contribution to the theory of the condition of humic substances. **Albrecht-Thaer-Arch**, v. 14, p. 3-14, 1970.
- KÖGEL-KNABNER, I.; AMELUNG, W. Soil organic matter in major pedogenic soil groups. **Geoderma**, v. 384, 114785, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114785>.
- KONONOVA, M. M. **Soil Organic Matter: Its Nature, Its Role in Soil Formation and in Soil Fertility**. Pergamon Press, Oxford: 1966. 450 p.
- KOTHAWALA, D. N.; MOORE, T. R.; HENDERSHOT, W. H. Soil Properties Controlling the Adsorption of Dissolved Organic Carbon to Mineral Soils. **Soil Science of Society American Journal**, v. 73, p. 1831-1842, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2008.0254>.
- LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science**, v. 304, p. 1623-1627, 2004.
- LAVALLEE, J. M.; SOONG, J. L.; COTRUFO, M. F. Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral associated forms to address global change in the 21st century. **Global Change Biology**, v. 26, p. 261-273, 2020.
- LEE, M. H.; PARK, J. H.; MATZNER, E. Sustained production of dissolved organic carbon and nitrogen in forest floors during continuous leaching. **Geoderma**, v. 310, p. 163-169, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.07.027>.
- LEHMANN, J.; KLEBER, M. The contentious nature of soil organic matter. **Nature**, v. 528, p. 60-68, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature16069>.
- LEHMANN, J.; HANSEL, C. M.; KAISER, C.; KLEBER, M.; MAHER, K.; MANZONI, S.; NUNAN, N.; REICHSTEIN, M.; SCHIMEL, J. P. Persistence of soil organic carbon caused by functional complexity. **Nature Geoscience**, v. 13, p. 529-534, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41561-020-0612-3>.
- LEINEMANN, T.; PREUSSER, S.; MIKUTTA, R.; KALBITZ, K.; CERLI, C.; HÖSCHEN, C.; MUELLER, C. W.; KANDELER, E.; GUGGENBERGER, G. Multiple exchange processes on mineral surfaces control the transport of dissolved organic matter through soil profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 118, p. 79-90, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.12.006>.
- LIANG, C.; SCHIMEL, J.; JASTROW, J. The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. **Nature Microbiology**, v. 2, 17105, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.105>.
- LIPCZYNSKA-KOCHANY, E. Humic substances, their microbial interactions and effects on biological transformations of organic pollutants in water and soil: A review. **Chemosphere**, v. 202, p. 420-437, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.104>.
- MACHADO, W.; FRANCHINI, J. C.; GUIMARÃES, M. F.; FILHO, J. T. Spectroscopic characterization of humic and fulvic acids in soil aggregates, Brazil. **Heliyon**, v. 6, e04078, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04078>.
- MARSCHNER, B.; KALBITZ, K. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. **Geoderma**, v. 113, p. 211-235, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00362-2](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00362-2).
- MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A. E.; TRAGHETA, D. G. Effects of cultivation on ESR spectrum of organic matter from soil size fractions of a mollisol. **Soil Science**, v. 157, p. 365-372, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-199406000-00003>.

- MARTIN-NETO, L.; ROSSEL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. *Geoderma*, v. 81, p. 305-311, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(97\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(97)00089-X).
- MCDOWELL, W. H. Dissolved organic matter in soils - Future directions and unanswered questions. *Geoderma*, v. 113, p. 179-186, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00360-9](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00360-9).
- MCGILL, W. B.; CANNON, K. R.; ROBERTSON, J. A.; COOK, F. D. Dynamics of soil microbial biomass and water-soluble organic C in Breton L after 50 years of cropping to two rotations. *Canadian Journal Soil Science*, v. 66, p. 1-19, 1986. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjss86-001>.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, v. 167, p. 739-749, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.ss.0000038066.07412.9c>.
- MILORI, D. M. B. P.; GALETI, H. V. A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy. *Soil Science Society American Journal*, v. 70, p. 57-63, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.10.010>.
- MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 129, p. 57-63, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.012>.
- NEARPASS, D. C. Adsorption of piclorambyhumic acids and humin. *Soil Science*, v. 121, p. 272-277, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-197605000-00003>.
- NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Basis of a humeomics science: Chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules*, v. 12, p. 1187-1199, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm101488e>.
- NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): A critical review. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 405, p. 109-124, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6363-2>.
- NEBBIOSO, A.; VINCI, G.; DROSOS, M. Unveiling the molecular composition of the unextractable soil organic fraction (humins) by humeomics. *Biology Fertility Soils*, v. 51, p. 443-451, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0991-y>.
- NICHOLS, K. A.; WRIGHT, S. F. Carbon and nitrogen in operationally defined soil organic matter pools. *Biology Fertility of Soils*, v. 43, p. 215-220, 2006.
- NICOLOSO, R.; RICE, C. W. Intensification of no-till agricultural systems: An opportunity for carbon sequestration. *Soil Science Society of America Journal*, v. 85, p. 1395-1409, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/saj2.20260>.
- NOVOTNY, E. H.; TURETTA, A. P. D.; RESENDE, M. F.; REBELLO, C. M. The quality of soil organic matter, accessed by <sup>13</sup>C solid state nuclear magnetic resonance, is just as important as its content concerning pesticide sorption. *Environment Pollution*, v. 266, 115298, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115298>.
- OLK, D. C.; BLOOM, P. R.; PERDUE, E. M.; CHEN, Y.; MCKNIGHT, D. M.; FARENHORST, A.; SENESI, N.; CHIN, Y.-P.; SCHMITT-KOPLIN, P.; HERTKORN, N.; HARIR, M. Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters. *Journal of Environmental Quality*, v. 48, p. 217-232, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2019.02.0041>.
- PERDUE, E. M. Analytical constraints on the structural features of humic substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 48, p. 1435-1442, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90400-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90400-9).
- PÉREZ-GONZÁLEZ, 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. Characterization of humic acids from a Brazilian oxisol under different tillage systems by EPR, <sup>13</sup>C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma*, v. 118, p. 181-190, 2004.
- PICCOLO, A. Humus and Soil Conservation. In: PICCOLO, A. (ed.). *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 225-264.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, v. 166, p. 810-832, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00007>.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, v. 75, p. 57-134, 2002.
- PICCOLO, A. In memoriam Prof. F. J. Stevenson and the question of humic substances in soil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 3, 23, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0076-2>.
- PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; DROSOS, M.; VINCI, G.; COZZOLINO, V. The Molecular Composition of Humus Carbon: Recalcitrance and Reactivity in Soils. In: GARCIA, C.; NANNIPIERI, P.; HERNANDEZ, T. (ed.). *The Future of Soil Carbon*. Elsevier [London]: 2018. p. 87-124.

- POIRIER, V.; ROUMET, C.; MUNSON, A. D. The root of the matter: Linking root traits and soil organic matter stabilization processes. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 120, p. 246-259, 2018.
- PROVENZANO, M. R.; CARICASOLE, P.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Dissolved organic matter extracted with water and a saline solution from different soil profiles. *Soil Science*, v. 175, p. 255-262, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1097/SS.0b013e3181e457a6>.
- RICE, J., MACCARTHY, P. Isolation of humin by liquid-liquid partitioning. *Science of the Total Environment*, v. 81-82, p. 61-69, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(89)90111-3).
- RICE, J. A. Humin. *Soil Science*, v. 166, p. 848-857, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00009>.
- ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. *Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas*. São Paulo: Ed. Unesp, 2003. 147 p.
- ROTH, V. N.; LANGE, M.; SIMON, C.; HERTKORN, N.; BUCHER, S.; GOODALL, T.; GRIFFITHS, R. I.; MELLADO-VÁZQUEZ, P. G.; MOMMER, L.; ORAM, N. J.; WEIGELT, A.; DITTMAR, T.; GLEIXNER, G. Persistence of dissolved organic matter explained by molecular changes during its passage through soil. *Nature Geoscience*, v. 12, p. 755-761, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0417-4>.
- SAAB, S. C.; MARTIN-NETO, L. Studies of semiquinone free radicals by ESR in the whole soil, HA, FA and humin substances. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, p. 34-37, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000100007>.
- SAIDY, A. R.; SMERNIK, R. J.; BALDOCK, J. A.; KAISER, K.; SANDERMAN, J. Microbial degradation of organic carbon sorbed to phyllosilicate clays with and without hydrous iron oxide coating. *European Journal Soil Science*, v. 66, p. 83-94, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejss.12180>.
- SANDERMAN, J.; BALDOCK, J. A.; AMUNDSON, R. Dissolved organic carbon chemistry and dynamics in contrasting forest and grassland soils. *Biogeochemistry*, v. 89, p. 181-198, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10533-008-9211-x>.
- SANTOS, J. V.; FREGOLENTE, L. G.; MOUNIER, S.; HAJJOU, H.; FERREIRA, O. P.; MOREIRA, A. B.; BISINOTI, M. C. Fulvic acids from Amazonian anthropogenic soils: Insight into the molecular composition and copper binding properties using fluorescence techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 205, 111173, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111173>.
- SAVARESE, C.; DROSOS, M.; SPACCINI, R.; COZZOLINO, V.; PICCOLO, A. Molecular characterization of soil organic matter and its extractable humic fraction from long-term field experiments under different cropping systems. *Geoderma*, v. 383, 114700, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114700>.
- SCHAEFFER, A.; NANNIPIERI, P.; KÄSTNER, M.; SCHMIDT, B.; BOTTERWECK, J. From humic substances to soil organic matter-microbial contributions. In honour of Konrad Haider and James P. Martin for their outstanding research contribution to soil science. *Journal Soils Sediments*, v. 15, p. 1865-1881, 2015.
- SCHIMEL, J. P.; WETTERSTEDT, J. Á. M.; HOLDEN, P. A.; TRUMBORE, S. E. Drying/rewetting cycles mobilize old C from deep soils from a California annual grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, p. 1101-1103, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.01.008>.
- SCHNITZER, M. Humic substances: Chemistry and Reactions. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. (ed.). *Developments in Soil Science*. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 1-64.
- SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. A State-of-the-art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, v. 80, p. 29-30, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01139754>.
- SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften*, v. 82, p. 487-498, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01134484>.
- SENESE, N., LOFFREDO, E. The chemistry of soil organic matter. *Soil Physical Chemistry*, v. 2, p. 239-370, 1999. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssabookser8.c1>.
- SENESE, N.; XING, B.; HUANG, P. M. *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 884 p.
- SIERRA, M. M. D.; GIOVANOLA, M.; PARLANTI, E.; SORIANO-SIERRA, E. J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*, v. 58, p. 715-733, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.038>.
- SIMPSON, A. J.; KINGERY, W. L.; HAYES, M. H. B.; HUMPFER, M. S. E.; KERSSEBAUM, P. D. R.; HOFMANN, M. G. M. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*, v. 89, p. 84-88, 2002.
- SIX, J.; CONANT, R. T.; PAUL, E. A.; PAUSTIAN, K. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturatin of soils. *Plant and Soil*, v. 241, p. 155-176, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016125726789>.

- SOARES DA SILVA, L.; CONSTANTINO, I. C.; BENTO, L. R.; TADINI, A. M.; BISINOTI, M. C.; BOSCOLO, M.; FERREIRA, O. P.; MOUNIER, S.; PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; CORNÉLIO, M. L.; MOREIRA, A. B. Humic extracts from hydrochar and Amazonian Anthrosol: Molecular features and metal binding properties using EEM-PARAFAC and 2D FTIR correlation analyses. *Chemosphere*, v. 256, 127110, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127110>.
- SODRÉ, F. F. Química do solo: Uma introdução. *Artigos Temáticos do AQUA*, v. 1, p. 17-29, 2012.
- SONG, X. Y.; SPACCINI, R.; PAN, G.; PICCOLO, A. Stabilization by hydrophobic protection as a molecular mechanism for organic carbon sequestration in maize-amended rice paddy soils. *Science of the Total Environment*, v. 458-460, p. 319-330, 2013. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2013.04.052](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.052).
- SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Amendments with humified compost effectively sequester organic carbon in agricultural soils. *Land Degradation and Development*, v. 31, p. 1206-1216, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/ldr.3524>.
- STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition and reaction*. New York: John Wiley, 1982. 390 p.
- STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition and reaction*. 2<sup>nd</sup>. New York: John Wiley, 1994. 390 p.
- SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental Science Technology*, v. 39, p. 9009-9015, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/es050778q>.
- TADINI, A. M.; NICOLODELLI, G.; MOUNIER, S.; MONTES, C. R.; MILORI, D. M. B. P. The importance of humin in soil characterisation: a study on Amazonian soils using different fluorescence techniques. *Science of the Total Environment*, v. 537, p. 152-158, 2015.
- TADINI, A. M.; NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; ISHIDA, D. A.; MONTES, C. R.; LUCAS, Y.; MOUNIER, S.; GUIMARÃES, F. E. G.; MILORI, D. M. B. P. Soil organic matter in podzol horizons of the Amazon region: Humification, recalcitrance, and dating. *Science of the Total Environment*, v. 613-614, p. 160-167, 2018.
- TADINI, A. M.; NICOLODELLI, G.; MARANGONI, B. S.; MOUNIER, S.; MONTES, C. R.; MILORI, D. M. B. P. Evaluation of the roles of metals and humic fractions in the podzolization of soils from the Amazon region using two analytical spectroscopy techniques. *Microchemical Journal*, v. 144, p. 454-460, 2019.
- TADINI, A.; MOUNIER, S.; MILORI, D. M. B. P. Modeling the quenching of fluorescence from organic matter in Amazonian soils. *Science of the total environment*, v. 698, 134067, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134067>.
- TADINI, A. M.; XAVIER, A. A. P.; MILORI, D. M. B. P.; OLIVEIRA, P. P. A.; PEZZOPANE, J. R. M.; BERNARDI, A. C. C.; MARTIN-NETO, L. Evaluation of soil organic matter from integrated production systems using laser-induced fluorescence spectroscopy. *Soil Tillage Research*, v. 211, 105001, 2021a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.105001>
- TADINI, A. M.; MARTIN-NETO, L.; GORANOV, A. I.; MILORI, D. M. B. P.; BERNARDI, A. C. C.; OLIVEIRA, P. P. A.; PEZZOPANE, J. R. M.; COLNAGO, L. A.; HATCHER, P. G. Chemical characteristics of soil organic matter from integrated agricultural systems in southeastern Brazil. *European Journal Soil Science*, v. 73, e13136, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejss.13136>.
- TIPPING, E.; HURLEY, M. A. A unifying model of cation binding by humic substances. *Geochimical Cosmochimica Acta*, v. 56, p. 3627-3641, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90158-F](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90158-F).
- TRAVERSA, A.; D'ORAZIO, V.; MEZZAPESA, G. N.; BONIFACIO, E.; FARRAG, K.; SENESI, N.; BRUNETTI, G. Chemical and spectroscopic characteristics of humic acids and dissolved organic matter along two Alfisol profiles. *Chemosphere*, v. 111, p. 184-194, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.063>.
- VALENZUELA, E. I.; CERVANTES, F. J. The role of humic substances in mitigating greenhouse gases emissions: Current knowledge and research gaps. *Science of the Total Environment*, v. 750, 141677, 2021.
- VAN DEN BERG, L. J. L.; SHOTBOLT, L.; ASHMORE, M. R. Dissolved organic carbon (DOC) concentrations in UK soils and the influence of soil, vegetation type and seasonality. *Science of the Total Environment*, v. 427-428, p. 269-276, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.069>.
- VINCI, G.; MAZZEI, P.; DROSOS, M.; ZACCONE, C.; PICCOLO, A. Molecular characterization of ombrotrophic peats by humeomics. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 7, 18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00184-6>.
- VON LÜTZOW, M.; KÖGEL-KNABNER, I.; EKSCHEMITT, K.; FLESSA, H.; GUGGENBERGER, G.; MATZNER, E.; MARSCHNER, B. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 39, p. 2183-2207, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.007>.
- WAGGONER, D. C.; CHEN, H.; WILLOUGHBY, A. S.; HATCHER, P. G. Formation of black carbon-like and alicyclic aliphatic compounds by hydroxyl radical initiated degradation of lignin. *Organic Geochemistry*, v. 82, p. 69-76, 2015.

- WAKSMAN, S. A. **Humus origin, chemical composition, and importance in nature**. Baltimore: Williams & Wilkins, 395 p., 1936.
- WANG, E.; CRUSE, R. M.; ZHAO, Y.; CHEN, X. Quantifying soil physical condition based on soil solid, liquid and gaseous phases. **Soil and Tillage Research**, v. 146, p. 4-9, 2015.
- WANG, X. G.; LI, C.; LUO, Y.; HUA, K. K.; ZHOU, M. H. The impact of nitrogen amendment and crop growth on dissolved organic carbon in soil solution. **Journal of Mountain Science**, v. 13, p. 95-103, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11629-015-3556-0>.
- WEBER, J.; CHEN, Y.; JAMROZ, E.; JAMROZ, E.; MIANO, T. Preface: humic substances in the environment. **Journal of Soils and Sediments**, v. 18, p. 2665-2667, 2018.
- WELLS, M. Conductivity-dependent flow field-flow fractionation of fulvic and humic acid aggregates. **Chromatography**, v. 2, p. 580-593, 2015.
- WOLF, J. D. **Soil solution chemistry: applications to environmental science and agriculture**. New York: John Wiley, 1994, 360 p.
- YAN, J.; MANELSKI, R.; VASILAS, B.; JIN, Y. Mobile colloidal organic carbon: An underestimated carbon pool in global carbon cycles? **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, 148, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00148>.
- YANG, Z.; SINGH, B. R.; SITAULA, B. K. Fractions of organic carbon in soils under different crop rotations, cover crops and fertilization practices. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v. 70, p. 161-166, 2004.
- ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p. 117-161, 1997.
- ZSOLNAY, Á. Dissolved organic matter: Artefacts, definitions, and functions. **Geoderma**, v. 113, p. 187-209, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00361-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00361-0).