

# FÓSFORO NUM CAMBISSOLO CULTIVADO COM CANA-DE-AÇÚCAR POR LONGO TEMPO. II - ANÁLISE DE ÁCIDOS HÚMICOS POR RMN <sup>31</sup>P<sup>(1)</sup>

Jader Galba Busato<sup>(2)</sup>, Luciano Pasqualoto Canellas<sup>(3)</sup>, Victor Marcos Rumjanek<sup>(4)</sup> & Ary Carlos Xavier Velloso<sup>(3)</sup>

## RESUMO

Sistemas de manejo da lavoura de cana-de-açúcar que favoreçam a matéria orgânica do solo podem aumentar o conteúdo de nutrientes disponíveis e diminuir a necessidade de aplicação de fertilizantes industriais. Apesar da importância dos componentes orgânicos no fornecimento de P, pouco se conhece sobre a sua dinâmica em ambientes tropicais. O objetivo deste trabalho foi identificar, por meio da ressonância magnética nuclear (RMN <sup>31</sup>P), as espécies de P nos ácidos húmicos de um Cambissolo Háptico Ta eutrófico vértico, localizado no Município de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro, e cultivado com cana-de-açúcar com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. Por meio da análise de RMN <sup>31</sup>P foi possível observar acúmulo de P orgânico em formas mais facilmente mineralizadas nas áreas com preservação de matéria orgânica, tal como P em ligações diésteres. Nas áreas de cana queimada, houve maior participação de espécies orgânicas mais estáveis, como o ortofosfato em ligações monoésteres. Os resultados da espectroscopia de RMN <sup>31</sup>P mostram que, nas áreas com maior aporte de resíduo orgânico (i.e., cana crua e cana queimada com adição de vinhaça), os ácidos húmicos constituem uma reserva importante de P orgânico prontamente disponível. Já, nas áreas de cana queimada, o acúmulo de P orgânico recalcitrante nos ácidos húmicos indica utilização do P-lábil das substâncias húmicas como fonte importante para nutrição das plantas.

**Termos de indexação:** cana crua, substâncias húmicas, vinhaça, solo tropical.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Mestrado em Produção Vegetal do primeiro autor, apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Recebido para publicação em maio de 2004 e aprovado em outubro de 2005.

<sup>(2)</sup> Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: jbusato@uenf.br

<sup>(3)</sup> Professor do Laboratório de Solos, UENF. Bolsista do CNPq. E-mails: canellas@uenf.br; velloso@uenf.br

<sup>(4)</sup> Professor do Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –UFRRJ. CEP 23890-000 Seropédica (RJ). E-mail:rumjanek@ufrj.br

**SUMMARY: PHOSPHORUS IN AN INCEPTSOIL UNDER LONG-TERM SUGARCANE. II - HUMIC ACID ANALYSIS BY NMR <sup>31</sup>P**

*Crop management systems that favor soil organic matter can improve the available nutrient content for plants and reduce the use of industrial fertilizer. Despite the importance of organic compounds as a P source, little is known about its dynamics in tropical environments. The objective of this study was to identify organic P species present in humic acids by NMR <sup>31</sup>P analysis in a fine clay Fluventic Eutrochrepts in Campos dos Goytacazes, in the north of Rio de Janeiro State, Brazil, under long-term sugarcane cultivation with preservation of trash and stillage addition. NMR <sup>31</sup>P showed an accumulation of organic P in more easily mineralizable forms such as P in diester linkages in the areas with organic matter preservation. In the areas where the crop trash was burned prior to harvesting, more stable organic P forms such as orthophosphates in monoester linkages were observed. These results obtained with NMR <sup>31</sup>P would suggest that the humic acids constitute an important pool of labile organic P in the areas with higher organic matter content. In the areas with sugarcane burning, however, the recalcitrant organic P is accumulated in humic acids. This suggests that available P in humic substances is an important source of P for plant nutrition.*

*Index terms: green cane, humic substances, vinasse, tropical soil.*

## INTRODUÇÃO

Uma importante função da matéria orgânica do solo diz respeito ao fornecimento de nutrientes aos vegetais, principalmente em relação ao P, elemento mais limitante no desenvolvimento da agricultura em solos altamente intemperizados de ambientes tropicais (Tiessen & Moir, 1993). Nesses solos, o componente orgânico representa parte considerável do conteúdo disponível de P (Guerra et al., 1996; Turner et al., 2003), que contribui para a nutrição das plantas pela sua mineralização (Siqueira & Moreira, 2001). A identificação das formas orgânicas de P na matéria orgânica pode auxiliar a compreensão da dinâmica desse nutriente e colaborar para o desenvolvimento de uma agricultura menos dependente de insumos industriais.

O desenvolvimento da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN <sup>31</sup>P) possibilitou a identificação das espécies de P do solo e das substâncias húmicas de forma mais simplificada do que os procedimentos por cromatografia (Cade-Menun & Preston, 1996). Nos últimos anos, a utilização da RMN <sup>31</sup>P permitiu a investigação da natureza química do P, possibilitando maior conhecimento sobre as transformações dos compostos fosfatados minerais e orgânicos presentes em vários ambientes (Makarov, 1998; Makarov et al., 2002).

Diferentes componentes de P podem ser observados de forma quantitativa e qualitativa por RMN <sup>31</sup>P com base no ambiente eletrônico em torno dos núcleos de P, tais como: formas de P em ligações monoésteres e diésteres, fosfonato, pirofosfato, polifosfato e ortofosfato inorgânico. O número de

ligações ésteres e a presença ou ausência de ligações C-P (i.e., fosfonatos) são fatores importantes que afetam a frequência de ressonância em material orgânico do solo (Bedrock et al., 1994). De acordo com Cade-Menun & Preston (1996), os sinais entre 19,0 e 20,0 ppm nos espectros de RMN <sup>31</sup>P podem ser atribuídos à presença de fosfonatos e em torno de 6,0 ppm, à presença de ortofosfato inorgânico. Ortofosfatos monoésteres apresentam intervalo de absorção entre 2,0 e 6,0 ppm e compostos diésteres estão próximos a 0 ppm. Sinais de polifosfatos podem ser observados em intervalos entre -18 e -20 ppm. Diversos trabalhos têm apresentado, também, sinais de compostos de P não identificados (Makarov et al., 1997; Turrión et al., 2001; Turner et al., 2003). O quadro 1 apresenta, de forma resumida, atribuições de diferentes compostos de P analisados por RMN <sup>31</sup>P.

Turrión et al. (2001), avaliando solos de floresta de clima temperado, verificaram que o P em ligações monoésteres representou entre 19 e 54 % do P extraído com NaOH, sendo esta a espécie de P orgânico (Po) predominante. Turner et al. (2003) também observaram maior participação de P em ligações monoésteres, entre 29 e 60 % do total de P, em solos sob pastagem de clima temperado.

Adams (1990), estudando solos florestais que sofreram queimadas, observou que a participação do P em ligações diésteres foi maior quanto maior o período sem a ação do fogo. O solo recém-afetado pelo fogo, analisado cinco meses após a queimada, apresentou praticamente todo seu P devido ao componente inorgânico, enquanto a participação desse componente em amostra de longo período sem queima (80 e 250 anos) representou somente 18 %

**Quadro 1. Comparações das atribuições do componente orgânico de P utilizado em espectros de RMN <sup>31</sup>P de acordo com diferentes autores**

Atribuição	Deslocamento químico (ppm)			
	Cade-Menun & Preston (1996)	Solomon et al. (2002)	Outros autores	Estrutura
Fosfonato	15 a 20	19	19 a 20 <sup>(1)</sup>	R-PO <sub>4</sub>
Ortofosfato inorgânico	6 a 8	6,2	6 <sup>(1)</sup>	PO <sub>4</sub>
P monoéster	3 a 6	4,9-5,3	3 a 6 <sup>(1)</sup>	(R-O-PO <sub>3</sub> )
P diéster	1 a (-1)	0-1,5	0 <sup>(1)</sup>	(R-O-PO <sub>2</sub> -O R')
Não identificado A		0,3 a 1	6,6 a 6,8 <sup>(2)</sup>	
Não identificado B		(-0,5) a (-2,2)	-1,2 a -1,7 <sup>(2)</sup>	
Pirofosfato	(-3) a (-6)	(-4,7)	-4 a -5 <sup>(1)</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Polifosfato	(-20)	(-20)	-20 <sup>(1)</sup>	

<sup>(1)</sup> Hawkes et al. (1984). <sup>(2)</sup> Makarov et al. (2004).

do conteúdo total de P. Notou-se, portanto, que, nas áreas com longo período sem a ação do fogo, houve acúmulo de P em ligações diésteres e diminuição da participação do P monoéster.

Em solos de zona tropical subúmida, Solomon et al. (2002) observaram mudança na distribuição dos compostos que continham P graças à cobertura vegetal. Esses autores verificaram que o desmatamento proporcionou aumento da participação das frações orgânicas mais resistentes, originadas do material vegetal, e perda das frações mais lábeis, oriundas do metabolismo microbiano. Mahieu et al. (2002), analisando solos alagados, onde os teores de matéria orgânica são normalmente mais elevados por causa da anaerobiose, concluíram que o aumento da intensidade de cultivo do arroz promovia perdas de formas mais lábeis de P nos ácidos húmicos, tais como os fosfatos em ligações diésteres. Observações semelhantes foram feitas por Tchienkoua & Zech (2003), que verificaram aumento seletivo da participação de formas mais recalcitrantes de P no extrato alcalino com o aumento do cultivo e diminuição do conteúdo de matéria orgânica do solo.

Portanto, a utilização da RMN <sup>31</sup>P possibilita o acompanhamento da distribuição das formas orgânicas de P, considerando o uso e manejo do solo, permitindo maior entendimento sobre a dinâmica desse nutriente no ambiente.

O objetivo deste trabalho foi identificar, por meio da RMN <sup>31</sup>P, as espécies orgânicas de P nos ácidos húmicos de um Cambissolo Háplico Ta eutrófico vértico, localizado no Município de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro, e cultivado com cana-de-açúcar com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo.

vértico, localizado no Município de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro e cultivado com cana-de-açúcar com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo (Busato et al., 2005). Os ácidos húmicos foram isolados de acordo com o procedimento recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), com pré-tratamento das amostras com uma solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e extração com NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> sob atmosfera de N<sub>2</sub> na razão solvente: solo 10:1 (v/v). Os ácidos húmicos foram separados por precipitação em meio ácido (pH = 1,0-1,5) com HCl 6 mol L<sup>-1</sup>, sendo essa operação realizada três vezes. Em seguida, os ácidos húmicos foram tratados com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> - HF 0,3 mol L<sup>-1</sup>, dialisados com água desionizada (membrana 14 Kda, Thomas Sci., Inc.) e secos por liofilização.

Para caracterizar os componentes de P nos ácidos húmicos, foram obtidos espectros de RMN <sup>31</sup>P em solução alcalina (NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>), observados em aparelho Bruker WM 250 com alta resolução, 101,27 MHz, utilizando-se pulso de 45° com 1,5 s de tempo de relaxação e 0,508 s de aquisição. O ácido fosfórico foi utilizado como referência externa. Os espectros foram obtidos com a seqüência de desacoplamento de prótons (inverse-gate pulse sequence-INVGATE), com vistas em eliminar o efeito NOE e permitir resultados quantitativos. A identificação dos compostos orgânicos de P foi obtida pela comparação com outros trabalhos publicados como referência e pela quantificação realizada por meio da integração da área referente a cada composto.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para extrair os ácidos húmicos, foram utilizadas amostras de um Cambissolo Háplico Ta eutrófico

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para observar as espécies de P nos solos e nas substâncias húmicas por meio de RMN <sup>31</sup>P, é

utilizado, rotineiramente, o NaOH como extrator. Com o uso de solução alcalina é possível obter um conteúdo representativo do fósforo orgânico do solo (Po), favorecendo a avaliação desse compartimento em relação ao P total. A solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> recuperou entre 25 e 49 % do conteúdo total de P, estando os valores entre 75 e 91 % do P solúvel em álcali associados aos ácidos húmicos (Busato et al., 2005). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Makarov et al. (1997), em que o P nos ácidos húmicos extraídos de solos representou de 73 a 90 % do extrato alcalino.

Os espectros de RMN <sup>31</sup>P dos ácidos húmicos extraídos nas camadas de 0–0,20 e 0,20–0,40 m, da área de lavoura de cana-de-açúcar colhida com e sem a queima durante 55 anos são mostrados na figura 1. Já os espectros dos ácidos húmicos isolados da área onde se comparou o efeito da aplicação anual de 120 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de vinhaça, durante 35 anos, encontram-se na figura 2.

A participação de cada classe de composto de P foi obtida por meio da integração eletrônica da área de cada sinal (Quadro 2). Um guia para a interpretação dos espectros, elaborado a partir dos trabalhos prévios de Hawkes et al. (1984); Cade Menun & Preston (1996); Solomon et al. (2002) e Makarov et al. (2004), é encontrado no quadro 1.

Diferentemente da maioria dos trabalhos já realizados, tanto para o extrato alcalino de solos como para as frações isoladas e purificadas das substâncias húmicas, os espectros dos ácidos húmicos da cana crua, na camada de 0–0,20 m, apresentaram pouca diversidade de sinais e, ainda, demonstraram a presença exclusiva de P em ligações diésteres (Figura 1). Essa classe de compostos apresenta baixa densidade de carga e seus grupos fosfatados são protegidos contra interações iônicas fortes, favorecendo a sua degradação por meio da atividade de hidrólise por microrganismos e ocasionando menor acúmulo nos solos (Makarov, 1998; Turrión et al., 2001). Assim, a persistência do P diéster pode ser observada em solos que apresentam restrições à atividade microbiana, tais como: os solos sob inundação, submetidos a baixas temperaturas, ou devidas à acidez (Makarov et al., 1995). Entretanto, Summan et al. (1998) encontraram grande proporção de espécies orgânicas lábeis em solos florestais sob condições favoráveis para o desenvolvimento microbiano, provavelmente pelo maior aporte de material vegetal.

Na área de cana crua (0–0,20 m), 92 % do espectro correspondeu à absorção em 0,84 ppm, atribuído ao P de ácido nucléico e fosfolipídios (Newman & Tate, 1980). Altas proporções de DNA foram encontradas no extrato de NaOH de materiais vegetais (Makarov

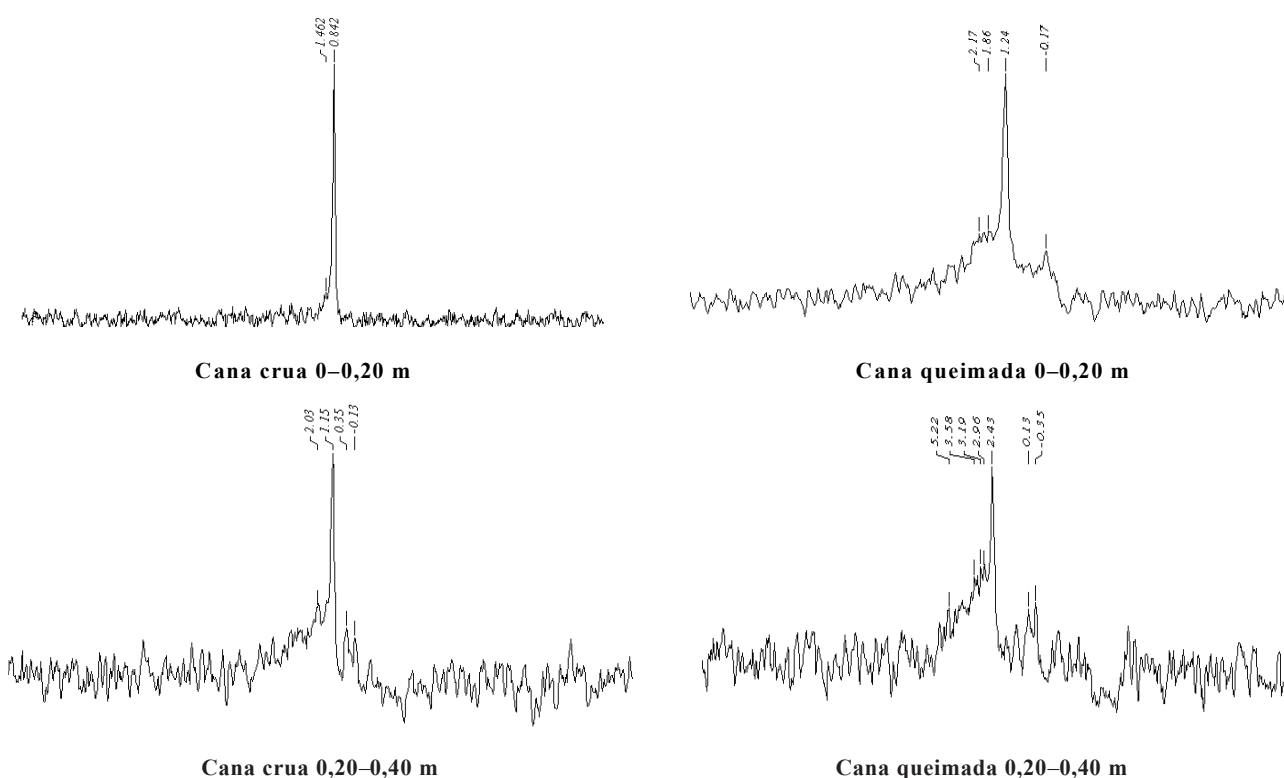


Figura 1. Espectros de RMN <sup>31</sup>P de ácidos húmicos extraídos de um Cambissolo Háplico Ta eutrófico vértico submetido aos manejos de cana crua e cana queimada.

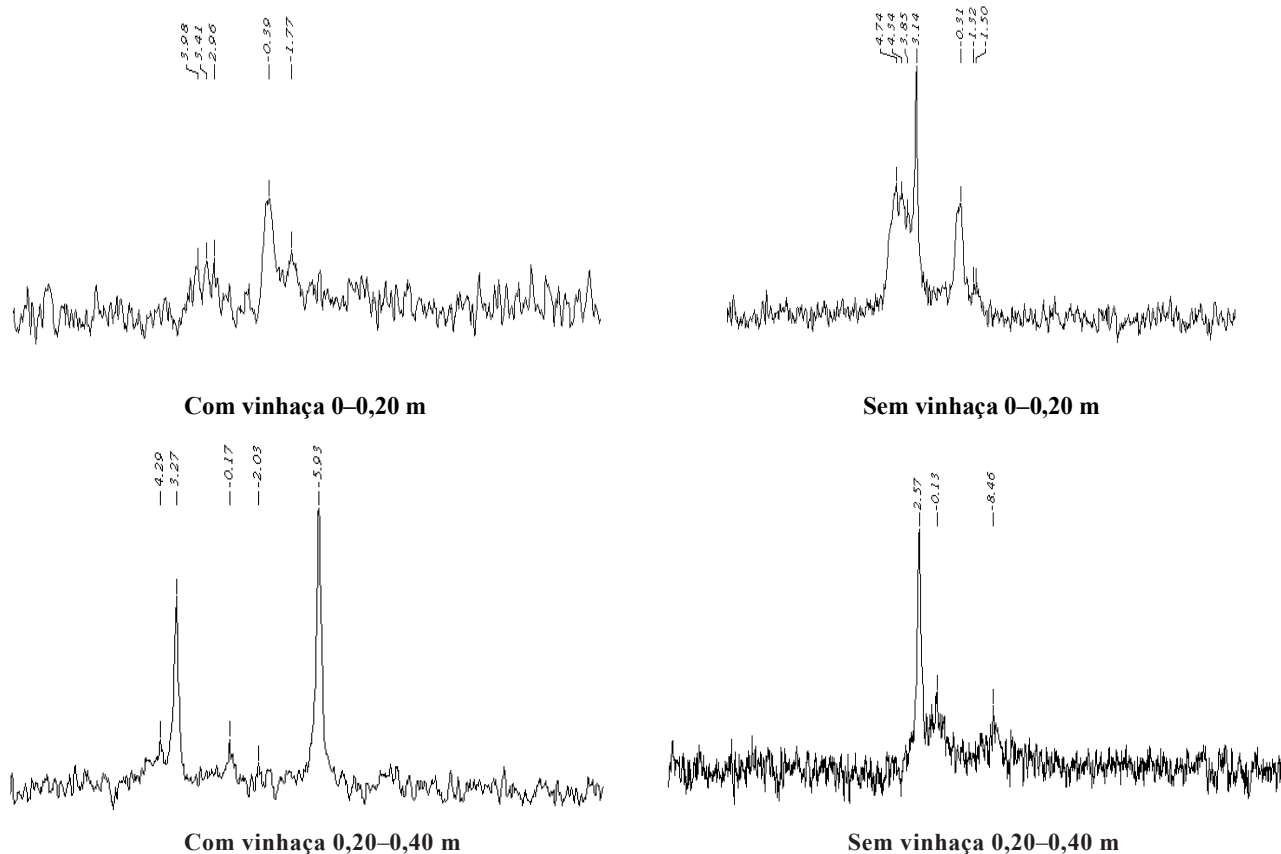


Figura 2. Espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  de ácidos húmicos extraídos de um Cambissolo Háplico Ta eutrófico vértico submetido aos manejos com ou sem aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar.

et al., 2002). O trabalho de Tate & Newman (1982) confirmou a origem do P nos fosfolipídios de extrato alcalino como sendo de resíduos vegetais. O acúmulo de formas mais lábeis de Po nos ácidos húmicos da área de cana crua, principalmente na camada de 0–0,20 m, pode ser determinado pelo equilíbrio entre a entrada de resíduos vegetais e sua conseqüente decomposição por meio dos microrganismos. A não ser que sejam estabilizadas pelos minerais de argila ou pelos ácidos húmicos, as formas lábeis de Po são prontamente mineralizadas no solo. Contribui para essa dinâmica, o maior conteúdo de P disponível no manejo da cana crua (Busato et al., 2005), o que possibilita o acúmulo de formas orgânicas de P lábeis nos ácidos húmicos. Dessa forma, a deposição de palha durante 55 anos favoreceu o aumento da participação de formas orgânicas lábeis de origem vegetal nos ácidos húmicos.

Também foi observado na área de cana crua, na camada de 0–0,20 m, outro sinal importante, com ressonância em 1,46 ppm e atribuído ao ácido teicóico (Condrón et al., 1990), responsável por 8 % da área do espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  (Quadro 2). O ácido teicóico é um ortofosfato em ligações diésteres, que corresponde ao glicerol ligado por grupos fosfatos (Guggenberger et al., 1996). Esse composto é

originado exclusivamente de parede celular de bactérias gram positivas (Duckworth, 1977). Da mesma forma que os ácidos nucléicos e fosfolipídios, os ácidos teicóicos podem participar ativamente no fornecimento de P para as plantas, uma vez que são acessíveis ao ataque microbiano e enzimático no solo (Tate, 1984). Em áreas florestais não perturbadas pelo cultivo agrícola, Adams (1990) observou acúmulo de Po em ligações diésteres, mostrando a importância de tais substâncias no fornecimento de P para a manutenção da capacidade produtiva dos vegetais.

Os espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  dos ácidos húmicos sob manejo da cana crua, isolados na camada de 0,20–0,40 m, apresentaram alterações consideráveis em comparação com os extraídos na camada superficial. Se houve predominância de P em ligações diésteres (92 %) nas amostras originadas de 0–0,20 m, na camada de 0,20–0,40 m os sinais de absorção atribuídos a esses compostos, com ressonância em 0,35 e -0,13 ppm, representaram somente 20 % do espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  (Quadro 2). Observou-se também o aumento da participação do ácido teicóico de 8 para 59 % da área integrada dos espectros. Outra diferença representativa nos espectros da cana crua em profundidade foi a presença de um

sinal adicional em 2,03 ppm, campo mais baixo que o normalmente encontrado para diésteres e ácido teicóico (Figura 1). Esse grupamento de P provavelmente encontra-se em ligações monoésteres. No entanto, essa atribuição não é inequívoca e é de difícil interpretação.

No presente trabalho, a absorção em 2,03 ppm foi atribuída como sendo de compostos em ligação monoéster, representando 21 % da área do espectro. Assim, na amostra em profundidade da área de cana crua, foi observada diminuição de P em ligações diésteres provenientes diretamente de resíduos vegetais e aumento de P diéster originado da fração microbiana. Isso revela uma dinâmica de Po acumulado nos ácidos húmicos dependente da quantidade de resíduos vegetais que são depositados no solo.

Rubaek et al. (1999) observaram uma relação linear positiva entre as formas de P disponível e a concentração de espécies de Po em ligações diésteres. A maior participação das formas de P prontamente disponíveis (Canellas et al., 2003; Busato et al., 2005) também foi refletida no acúmulo de formas orgânicas lábeis observado na área de cana crua.

Na área com cana queimada, na camada de 0–0,20 m, foram observadas as mesmas absorções de compostos que os vistos na área de cana crua (Figura 1). Entretanto, a distribuição relativa desses compostos foi diferente, demonstrando uma alteração no ciclo do Po com a queima do material vegetal. A participação de componentes de P diéster de origem vegetal (ácidos nucleicos e fosfolipídios) foi reduzida de 92 %, na área de cana crua, para 17 %, no manejo da cana queimada, nas amostras

de 0–0,20 m (Quadro 2). De forma contrária, a presença de Po lábil de origem microbiana, nessa mesma profundidade, foi favorecida no manejo da cana queimada. Esse componente representou 51 % da área do espectro de RMN <sup>31</sup>P, com um sinal de absorção pronunciado em 1,24 ppm e outro, menos pronunciado, em 1,86 ppm. A presença dominante do ácido teicóico na camada superficial da área de cana queimada pode estar relacionada com a morte de microrganismos e conseqüente extravasamento do material celular, ocasionados pelo fogo. O conteúdo pouco representativo do P microbiano, obtido pelo fracionamento seqüencial (Busato et al., 2005), pode dar suporte a essa hipótese.

Na camada superficial da área de cana queimada, foi observada a presença de um sinal com ressonância em 2,17 ppm referente ao inositol fosfato, que correspondeu a 32 % da área do espectro de RMN <sup>31</sup>P (Quadro 2). As formas de Po em ligações monoésteres são caracterizadas pela alta densidade de cargas e maior interação com óxidos, hidróxidos e argila no solo (Guggenberger et al., 1996; Makarov et al., 2004). Isso faz com que esses compostos sejam protegidos da degradação, ocasionando o seu acúmulo na maioria dos solos (Condrón et al., 1990). O P em ligações monoésteres no ácido húmico extraído do solo amostrado na camada de 0,20–0,40 m predominou amplamente sobre os demais compostos. Sinais representativos de fosfato de inositol corresponderam a 73 % do espectro e, ainda, houve participação de 8 % de açúcar fosfatado (myoinositol), com ressonância observada em 5,22 ppm (Quadro 2). Zech et al. (1985) encontraram proporções maiores de P monoéster em profundidade, quando comparadas às de subsuperfície. O menor

**Quadro 2. Distribuição dos compostos de fósforo nos ácidos húmicos extraídos de um Cambissolo Háplico Ta eutrófico vértico submetido a diferentes manejos da cultura da cana-de-açúcar**

Sistema de cultivo	Deslocamento químico (ppm)						Relação di/monoéster
	P em ligação monoéster			P em ligação diéster		Não identificado	
	Açúcares	Mono-nucleotídeo	Inositol fosfato	Ácido teicóico	Ortofosfato diéster		
5 a 5,9	3,8 a 5	2 a 3,5	1 a 2	1 a -1	-1 a -2,1	-5,5 a -8,5	
0–0,20 m							
Cana crua	-	-	-	8 %	92 %	-	1
Cana queimada	-	-	32 %	51 %	17 %	-	0,3
Com vinhaça	-	10 %	20 %	-	51 %	19 %	0,7
Sem vinhaça	-	50 %	23 %	-	21 %	6 %	0,3
0,20–0,40 m							
Cana crua	-	-	21 %	59 %	20 %	-	0,5
Cana queimada	8 %	-	73 %	19 %	-	-	0
Com vinhaça	-	9 %	32 %	-	9 %	-	0,3
Sem vinhaça	-	-	68 %	-	17 %	-	0,3

aporte de material vegetal na área de cana queimada, com o aumento da profundidade, indica que as formas de P preferencialmente acumuladas nos ácidos húmicos são encontradas em ligação monoéster.

O acúmulo de P em formas mais estáveis no solo em profundidade, a maior proporção de P em ligação diéster de origem microbiana e, ainda, uma menor participação da fração Po de origem vegetal reforçam o conceito de que os manejos que preservam os resíduos vegetais ocasionam, além da maior disponibilidade de P, acúmulo de reservas desse nutriente mais prontamente disponível nas frações humificadas.

Canellas et al (2003) verificaram maior grau de humificação na matéria orgânica na área de cana queimada em relação à área de cana crua. O processo de formação das substâncias húmicas na área com 55 anos de preservação do palhicho permite indicar a presença de ácidos húmicos menos evoluídos quimicamente. O elevado grau de humificação da matéria orgânica nos solos sob manejo da cana queimada, em ambas as profundidades, pode ter colaborado para o acúmulo de formas de Po mais estáveis nos ácidos húmicos. A dinâmica de acúmulo das formas orgânicas de P pode, nesse caso, ser controlada pelo grau de humificação da matéria orgânica do solo.

Assim, a estabilização de formas orgânicas de P no manejo da cana queimada reflete o baixo conteúdo de P disponível na solução do solo, bem como na predominância de formas de P retidas com alta energia no solo (Quadro 2 e Figura 1). A baixa concentração de Po lábil nos ácidos húmicos isolados do solo na área de cana queimada, na camada de 0,20–0,40 m, também pode indicar que as formas mais disponíveis de Po estão suprindo a solução do solo, ao contrário do que ocorre no manejo da cana crua, em que os ácidos húmicos estão sendo depositários de formas de Po lábeis.

A aplicação de vinhaça na área de produção de cana-de-açúcar durante 35 anos proporcionou mudanças representativas na distribuição das espécies de P nos ácidos húmicos (Figura 2).

Na camada de 0–0,20 m, na área com aplicação de vinhaça, foi observado um sinal pronunciado no espectro de RMN <sup>31</sup>P em -0,39 ppm, característico de P em ligação diéster. Esse sinal foi responsável por 51 % da área do espectro e correspondeu à maior parte do Po presente (Quadro 2). No solo que não recebeu a vinhaça, na mesma profundidade, o P relacionado com o mononucleotídeo foi o que apresentou maior participação nos ácidos húmicos. Esse componente, com ressonância entre 3,85 e 4,74 ppm, correspondeu a 50 % da área do espectro. Observou-se que a aplicação de vinhaça durante 35 anos favoreceu o compartimento microbiano e proporcionou maior conteúdo de P disponível no solo (Busato et al., 2005).

Nos manejos da cana com e sem aplicação de vinhaça, o número de sinais obtidos pela RMN <sup>31</sup>P foi maior que nas áreas de cana crua e cana queimada. A complexidade química dos componentes de Po nos ácidos húmicos dessas áreas indica que as substâncias húmicas têm sofrido menor evolução. Essa idéia pode ser comprovada por meio do menor grau de humificação da matéria orgânica desses solos (Canellas et al., 2003). Esta conclusão também tem suporte na participação representativa de sinais de compostos não identificados, presentes nas áreas com e sem adição de vinhaça, nas amostras retiradas na camada de 0–0,20 m, com ressonâncias entre -1,32 e -1,77 ppm. Essas formas foram responsáveis pela participação de 19 % na área com aplicação de vinhaça e 9 % na área sem aplicação (Quadro 2) e referem-se à presença de compostos intermediários da decomposição vegetal. Esses valores são maiores que os apresentados por Solomon et al. (2002), que corresponderam a 3 a 8 % do P extraído, e por Makarov et al. (2004), que observaram participações variando de 0,4 a 7,9 %.

Maiores participações de componentes em ligação monoéster foram observadas na área sem aplicação de vinhaça, na camada de 0–0,20 m (Quadro 2). Esses compostos, mais estáveis, em razão da elevada densidade de cargas, representaram 73 % da área do espectro de RMN <sup>31</sup>P nesse manejo. Graças à sua maior resistência à mineralização, o acúmulo dessas formas de Po nos ácidos húmicos forma uma reserva de Po pouco disponível no solo. Como o P nos ácidos húmicos da área sem vinhaça (0–0,20 m) correspondeu em torno de 28 % do conteúdo total (Quadro 2) e como grande parte do Po (73 %) encontra-se em compostos pouco disponíveis, acredita-se que as substâncias húmicas possam servir como uma fonte desse nutriente para a solução. De forma contrária, na área com aplicação de vinhaça, graças ao maior conteúdo de P disponível, a fração húmica serve como reserva de P em formas lábeis. Isso indica que a aplicação de vinhaça na área alterou a dinâmica desse nutriente no solo.

A presença de sinais de absorção referentes a pirofosfato, com ressonância entre -5,5 e -8,5 ppm nos manejos com e sem aplicação de vinhaça, na camada de 0,20–0,40 m, pode ser explicada, em parte, pela hidrólise do Po durante a concentração da solução para a espectroscopia ou, mais provavelmente, pela liberação do ortofosfato associado com o material húmico (Makarov, 1998). Esses valores são maiores que os observados por Solomon et al. (2002), que encontraram participações do pirofosfato variando de 2 até 6 % em extrato alcalino. A maior participação de pirofosfato em análises de RMN <sup>31</sup>P foi observada em horizontes subsuperficiais, sendo esta forma considerada relativamente estável no solo (Makarov, 1998).

Um importante ponto de discussão na maioria dos estudos de RMN <sup>31</sup>P é a relação entre ortofosfato

diéster e monoéster, como resultado de vários efeitos naturais e artificiais, podendo informar quanto à presença de formas mais ou menos disponíveis dos componentes de Po. Comparações quanto ao conteúdo das frações monoésteres e diésteres nos ácidos húmicos extraídos de vários solos mostram certa relação entre a distribuição do Po e a evolução das substâncias húmicas. Todavia, a concentração real dos componentes diésteres do solo pode ser subestimada e as formas monoésteres superestimadas, quando analisadas em extrato alcalino. Esse processo deve-se à quase completa hidrólise do RNA e à parcial hidrólise dos fosfolipídios em monoéster (Makarov et al., 2002). A utilização dessa relação, visando estimar a proporção de P lábil no solo, deve considerar as transformações ocasionadas pelos extratores (Makarov et al., 2002), uma vez que sua natureza química pode interferir nos resultados, levando a conclusões equivocadas.

Os valores da relação diéster/monoéster, excluindo ácido teicóico, foram calculados para os ácidos húmicos extraídos do solo sob investigação (Quadro 2).

Na camada de 0–0,20 m, os valores obtidos desta relação variaram de 0,3 até 1. Já nas amostras obtidas na camada de 0,20–0,40 m, a variação foi de 0,3 até 0,5, não sendo observada, no manejo da cana queimada, participação de componentes diésteres. Esses valores são compatíveis aos observados em extrato de solos tropicais da Etiópia, que apresentaram variação de 0,13 até 1, sendo os maiores valores referentes às áreas de florestas não perturbadas e os menores originados de solos sob intenso cultivo agrícola (Solomon et al., 2002).

A avaliação dos resultados desta relação possibilita concluir que a classe predominante na área de cana crua, na camada de 0–0,20 m, representa o P em ligação diéster. O decréscimo desta relação no manejo da cana queimada, na mesma camada, revela maior participação de formas pouco disponíveis de Po, em virtude do menor aporte de material vegetal. Na área com aplicação de vinhaça, foi observada maior valor da relação diéster/monoéster quando comparada à área sem a aplicação. Já na camada de 0,20–0,40 m, o manejo da cana queimada não apresentou participação de P e ligação diéster e, nas áreas com e sem aplicação de vinhaça, não se observou diferença na relação diéster/monoéster, indicando participações semelhantes desses compostos em subsuperfície. As alterações observadas na relação diéster/monoéster refletem as modificações nos compostos contidos no Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar com a preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo.

## CONCLUSÕES

1. A espectroscopia de RMN <sup>31</sup>P demonstrou que a preservação da palha e a adição de vinhaça

alteraram a participação e a distribuição das formas orgânicas de P nos ácidos húmicos.

2. Compostos fosfatados orgânicos facilmente mineralizáveis foram acumulados nos ácidos húmicos extraídos dos manejos da cana crua (0–0,20 e 0,20–0,40 m) e cana com vinhaça (0–0,20 m).

3. Nos manejos da cana queimada e cana sem vinhaça, em ambas as camadas, houve participação representativa de formas orgânicas mais estáveis nos ácidos húmicos.

## AGRADECIMENTO

Ao International Fundation of Science (c3391-1), pelo auxílio financeiro.

## LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.A. <sup>31</sup>P-NMR identification of phosphorus compounds in neutral extracts of mountain ash (*Eucalyptus regnans* F. Muell.) soils. *Biol. Biochem.*, 22:419-421, 1990.
- BEDROCK, C.N.; CHESHIRE, M.V.; CHUDEK, J.A.; GOODMAN, B.A. & SHAND, C.A. Use of <sup>31</sup>P NMR to study the forms of phosphorus in peat soils. *Sci. Total Environ.*, 152:1-8, 1994.
- BUSATO, J.G.; CANELLAS, L.P. & VELLOSO, A.C.X. Fósforo num Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. I: Fracionamento seqüencial. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:935-945, 2005.
- CADE-MENUN, B.J. & PRESTON, C.M. A comparison of extraction procedures for <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Soil Sci.*, 161:770-785, 1996.
- CANELLAS, L.P.; VELLOSO, A.C.X.; MARCIANO, C.R.; RAMALHO, J.F.G.P.; RUMJANEK, V.M.; REZENDE, C.E. & SANTOS, G.A. Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:935-944, 2003.
- CONDON, L.M.; MOIR, J.O.; TIESSEN, H. & STEWART, J.W.B. Critical evaluation of methods for determining total organic phosphorus in tropical soils. *Soil Sci.*, 54:1261-1266, 1990.
- DUCKWORTH, M. Teichoic acids. In: SUTHERLAND, I., ed. *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. London, Academic Press, 1977. p.177-208.
- GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L.; SANTOS, G.A. & FERNANDES, M.S. Conteúdo de fósforo orgânico em amostras de solos. *Pesq. Agropec. Bras.*, 31:291-299, 1996.
- GUGGEMBERGER, G., CHRISTENSEN, B.T., RUBAEK, G. & ZECH, W. Land-use and fertilization effects on P forms in two European soils: Resin extraction and <sup>31</sup>P NMR. *Europ. J. Soil Sci.*, 47:231-239, 1996.



- HAWKES, G., POWLSON, D.S.; RANDALL, E.W. & TATE, K.R.A.  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance study of the phosphorus species in alkali extracts of soils from long-term fields experiments. *J. Soil Sci.*, 35:35-45, 1984.
- MAHIEU, N.; OLK, D.C. & RANDAL, E.W. Multinuclear magnetic resonance analysis of two humic acid fractions from lowland rice soils. *J. Environ. Quality*, 3:21-430, 2002.
- MAKAROV, M.I. Organic phosphorus compounds in Alpine Soils is the Northwestern Caucasus. *Eur. Soils Sci.*, 31:778-786, 1998.
- MAKAROV, M.I.; GUGGENBERGER, G.; ALT, H.G. & ZECH, W. Phosphorus status of Eutric Cambisols polluted by P-containing immissions: Results of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy and chemical analysis. *Z. Pflanzenernahr.*, 158:293-298, 1995.
- MAKAROV, M.I.; HAUMAIER, L. & ZECH, W. Nature of soil organic phosphorus: An assessment of peak assignments in the diester region of  $^{31}\text{P}$  spectra. *Soil Biol. Biochem.*, 34:1467-1477, 2002.
- MAKAROV, M.I.; HAUMAIER, L.; ZECH, W. & MALYSHEVA, T.I. Organic phosphorus compounds in particle-size fractions of mountain soils in the Northwestern Caucasus. *Geoderma*, 118:101-114, 2004.
- MAKAROV, M.I.; MALYSHEVA, T.I.; HAUMAIER, L.; ALT, H.G. & ZECH, W. The forms of phosphorus in humic and fulvic acids of Alpine Soils in the Northern Caucasus. *Geoderma*, 80:61-73, 1997.
- NEWMAN, R.H. & TATE, K.R. Soil phosphorus characterization by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 11:835-842, 1980.
- RUBAEK, G.H.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. & CHRISTENSEN, B.T. Organic phosphorus in soil size separates characterized by phosphorus  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance and resin extraction. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:1123-1132, 1999.
- SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. *Biologia e bioquímica do solo*. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2001. 291p.
- SOLOMON, D.; LEHMAMN, J.; MAMO, T.; FRITZSCHE, F. & ZECH, W. Phosphorus compounds and dynamics as influenced by land use changes in the sub-humid Ethiopian highlands. *Geoderma*, 105:21-48, 2002.
- SUMMAN, M.; AMELUNG, W.; HAUMAIER, L. & ZECH, W. Climatic effects on organic phosphorus in the North American Great Plains identified by phosphorus- $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. *Soil Sci. Am. J.*, 62:1580-1586, 1998.
- TATE, K.R. The biological transformation of P in soil. *Plant Soil*, 76:245-256, 1984.
- TATE, K.R. & NEWMAN, R.H. Phosphorus fractions of a climosequence of soils in New Zealand Tussock Grassland. *Soil Biol. Biochem.*, 14:191-196, 1982.
- TCHIENKOUA, Z. & ZECH, W. Chemical and spectral characterization of soil phosphorus under three land uses from an Andic Palehumut in West Cameroon. *Agric., Ecosy. Environ.*, 100:193-200, 2003.
- TIESSEN, H. & MOIR, J.O. Characterization of available P by sequential extraction. *In: CARTER, M. R.*, ed. *Soil sampling and methods of analysis*. Boca Raton, Lewis, 1993. p.75-86.
- TURNER, B.L.; MAHIEU, N. & CONDRON, L.M. The phosphorus composition of temperate pasture soils determined by NaOH-EDTA extraction and solution  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Org. Geochem.*, 34:1199-1210, 2003.
- TURRION, M.B.; GALLARDO, J.F.; HAUMAIER, L.; GONZÁLES, M.I. & ZECH, W.  $^{31}\text{P}$  NMR characterization of phosphorus fractions in natural and fertilized forest soils. *Ann. For. Sci.*, 58:89-98, 2001.
- ZECH, W.; ALT, H.G.; ZUCKER, A. & KÖGEL, I.  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic investigations of NaOH extracts from soils with different land use in Yucatan (Mexico). *Z. Pflanz.*, 150:119-123, 1985.