

Artigo

Diferenciação de Ácidos Húmicos de Diferentes Origens Mediante RMN de ^{13}C via CP/MAS e ATR-FTIR Aliado a Quimiometria

Souza, C. C. B.;* Oliveira, D. F.; Souza, R. S.; Souza, A. F. F.; Costa, T. G. A.; Lima, B. R.; Souza, W. S.; Santos, O. A. Q.; Pinheiro Junior, C. R.; Leite, F. F. G. D.; Moura, O. V. T.; Aguiar, T. C.; Lázaro, M. L.; Lima, A.C. B. P.; García, A. C.

Rev. Virtual Quim., 2021, 13 (2), 371-382. Data de publicação na Web: 18 de Novembro de 2021

<http://rvq.sbg.org.br>

Distinction of Humic Acids from Different Sources Using ^{13}C -NMR CP/MAS and ATR-FTIR Combined to Chemometrics

Abstract: The functions that humic acids (HA) can play in the environment are explained by their structural characteristics. Several spectroscopic techniques combined with chemometrics have been used to obtain a better understanding of its structure. Therefore, this work aimed to structurally characterize HA from different sources through spectroscopic techniques combined with the application of chemometrics to relate the environments where HA is formed and its structural characteristics. The HA were extracted and purified from vermicompost, stabilized compost, organic soil, peat, lake sediment and mineral soil. Structural characterization was performed using FTIR-ATR and CP MAS ^{13}C -NMR and the chemometric analysis of PCA (principal component analysis) and MCR (multivariate curve resolution) was applied to the spectral data. The HA formed in the soil showed a predominance of $\text{C}_{\text{Alq}}\text{-H}$, R and $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$, R structures, suggesting a greater recalcitrance of this material. The AH formed in the peatlands, despite the predominance of $\text{C}_{\text{Alq}}\text{-H}$, R and $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$, R, also showed a high presence of carboxylic carbons in its structure. HA formed by composting, vermicomposting and lake sediment processes have a greater presence of functionalized oxygenated structures ($\text{C}_{\text{Alk}}\text{-O,N}$, $\text{C}_{\text{Alk}}\text{-O}$ and $\text{C}_{\text{Alk}}\text{-di-O}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$ and $\text{C}_{\text{COO}}\text{-H,R}$) which gives them greater lability and hydrophilicity.


Keywords: Humic substances; spectroscopy; PCA; MCR.

Resumo

As funções que os ácidos húmicos (AH) podem exercer no ambiente são explicadas pelas suas características estruturais. Diversas técnicas espectroscópicas aliadas à quimiometria vêm sendo usadas para obter uma compreensão melhor de sua estrutura. Portanto, este trabalho objetivou caracterizar estruturalmente AH de diferentes origens através de técnicas espectroscópicas aliadas a aplicação de quimiometria para relacionar os ambientes de formação dos AH e as suas características estruturais. Os AH foram extraídos e purificados de vermicomposto, composto estabilizado, solo orgânico (Organossolo), turfa, sedimento de lago e solo mineral (Gleissolo). A caracterização estrutural foi realizada mediante FTIR-ATR e RMN de ^{13}C via CP/MAS e a análise quimiométrica de ACP (análise de componentes principais) e CRM (curva de resolução multivariada) foi aplicada aos dados espectrais. Os AH formados no solo apresentaram um predomínio das estruturas de $\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-H,R}$ e $\text{C}_{\text{Aromático}}\text{-H,R}$, sugerindo uma maior recalcitrância desse material. O AH formado nas turfeiras, apesar de apresentar predomínio do $\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-H,R}$ e $\text{C}_{\text{Aromático}}\text{-H,R}$, também apresentou elevada presença de carbonos carboxílicos em sua estrutura. Já os AH formados por processos de compostagem, vermicompostagem e em sedimentos de lagos apresentam predomínio de estruturas oxigenadas funcionalizadas ($\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-O,N}$, $\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-O}$ e $\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-di-O}$, $\text{C}_{\text{Aromático}}\text{-O}$ e $\text{C}_{\text{COO}}\text{-H,R}$) o que lhes conferem uma maior labilidade e hidrofiliidade.

Palavras-chave: Substâncias húmicas; espectroscopia; ACP; CRM.

* Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Rodovia 465 Km 47, CEP: 23970-000, Seropédica-RJ, Brasil.

 camilacostabarrosgmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200153](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200153)

Diferenciação de Ácidos Húmicos de Diferentes Origens Mediante RMN de ^{13}C via CP/MAS e ATR-FTIR Aliado a Quimiometria

Camila da C. B. de Souza,^{a,*} Danielle F. de Oliveira,^a Renato S. de Souza,^a Andressa F. de Souza,^a Tancio G. A. Costa,^a Brisa R. de Lima,^a Wesley dos S. Souza,^a Otavio A. Q. dos Santos,^a Carlos R. P. Junior,^a Fernanda F. G. D. Leite,^b Octávio V. T. de Moura,^a Tamiris C. de Aguiar,^a Marcela L. Lázaro,^b Anne C. B. P Lima,^a Andrés C. García^a

^a Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Rodovia 465 Km 47, CEP 23970-000, Seropédica-RJ, Brasil.

^b Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Geoquímica, Outeiro São João Batista S/N, CEP 24020-141, Niterói-RJ, Brasil.

*camilacostabarro@gmail.com

Recebido em 15 de Abril de 2020. Aceito para publicação em 27 de Novembro de 2020.

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

2.1. Extração e purificação dos ácidos húmicos de diferentes origens

2.2. Experimentos de FTIR e RMN de ^{13}C via CP/MAS

2.3. Análise de dados e quimiometria

3. Resultados e Discussão

3.1. Comparação da característica estrutural de AH de diferentes origens mediante espectroscopia de FTIR-ATR e quimiometria

3.2. Comparação da característica estrutural de AH de diferentes origens mediante espectroscopia de RMN de ^{13}C via CP/MAS e quimiometria

4. Conclusão

1. Introdução

A identidade estrutural das substâncias húmicas (SH) tem sido debatida mundialmente na ciência do solo, essencialmente por conta das diferentes propriedades e funções que elas podem apresentar. Tais substâncias compreendem uma extraordinária quantidade de moléculas complexas, amorfas, heterogêneas e quimicamente reativas que são produzidas pela decomposição da biomatéria,

devido a reações químicas que acontecem aleatoriamente no grande pool de fragmentos e moléculas da própria biomatéria.¹ Essas moléculas heterogêneas se associam em função de sua forma, tamanho, afinidade química, hidrofobicidade e sua caracterização estrutural está limitada pela força das interações que estabilizam suas associações numa estrutura supramolecular.² O ácido húmico (AH) é uma das frações da SH, que pode associar-se à fração mineral do solo e também estar solúvel na solução, pelo que em termos ambientais

constitui uma fração intermediária no processo de humificação.³

A funcionalidade/bioatividade dos AH nas interações com o solo e a planta, são explicadas pela relação estrutura-propriedade-função. A função da molécula é definida por propriedades compreendidas e geradas por uma estrutura e pela conformação estereoquímica das ligações formadas. A variabilidade e a heterogeneidade estrutural dos AH, tanto organizacional quanto em termos de grupos funcionais, justifica as diversas possibilidades de interações que eles possuem no ambiente.⁴ As características estruturais apresentadas por esses materiais, como tipos de carbono (sp^2 e sp^3), grupamentos funcionais (-COOH, -OH, -NH₂, -C=O), interações entre fragmentos estruturais (π - π , CH- π , van der Waals, ligação de hidrogênio) determinam as propriedades que geram e definem as suas diferentes funções na planta, como indução e repressão da expressão de genes, atividades enzimáticas, estímulos ao sistema radicular e aumento da produção de biomassa. Outra importante função que esses materiais possuem, decorrente de suas características estruturais, é a habilidade de interagir com íons metálicos. Essas interações são favorecidas pela elevada presença de grupos funcionais oxigenados em suas estruturas (COOH, C=O, OH), permitindo a formação de complexos organo-metálicos de alta estabilidade.⁵

Assim, ressalta-se a importância da caracterização estrutural de AH de diferentes fontes, elucidando a forma como o ambiente de formação da matéria orgânica determina as suas características estruturais. Chen e Chiu (2003)⁶ demonstraram que a característica estrutural da matéria orgânica do solo (MOS) é diferenciada de acordo com a sua distribuição granulométrica e com a vegetação do ambiente de formação. Da mesma forma, a característica de AH formados dentro de agregados do solo são influenciadas pelos métodos de manejo agrícola adotados.⁷ Logo, a identificação de conformações estruturais comuns e heterogêneas entre AH de diferentes origens possibilita a predição da funcionalidade das moléculas destes materiais.

Utilizando técnicas de caracterização estrutural como espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear do carbono-13 em estado sólido (RMN de ¹³C), associado a aplicação da quimiometria, é possível realizar uma análise exploratória dos ambientes de formação dos AH relacionado à sua característica estrutural. As técnicas espectroscópicas

de RMN de ¹³C e FTIR mostraram-se satisfatórias para caracterizar e comparar AH de diferentes horizontes e perfis de Espodosolos, possibilitando a elucidação de semelhanças entre perfis e diferenças associadas ao processo de podzolização.⁸ Além disso, a caracterização mediante RMN de ¹³C também possibilita a diferenciação entre AH formados em outros ambientes, como durante a compostagem.⁹

Por outro lado, mediante a quimiometria, uma disciplina química que aplica algoritmos matemáticos para analisar dados químicos, é possível obter padrões espectrais relacionados às propriedades do ambiente de formação do AH. A quimiometria não consiste em apenas uma ferramenta, senão uma variedade de técnicas como análises multivariadas, dentre elas, análises descritivas, análise de componentes principais (ACP), curvas de resolução multivariada (CRM), etc. A aplicação de ACP a dados espectrais permite detectar quanto uma amostra é diferente de outra mediante agrupamento (*scores*) e quais as variáveis espectrais (*loadings*) que contribuem para esta diferenciação. Ao mesmo tempo, a técnica de CRM permite determinação de vários componentes coexistentes em um sistema químico, fornecendo extração dos espectros puros dos componentes (análise qualitativa), bem como os perfis de concentração de cada componente (análise quantitativa).¹⁰

Estudos realizados de caracterização de AH mediante RMN de ¹³C via CP/MAS e FTIR, aliado a quimiometria tem comprovado as potencialidades desta abordagem de estudo, permitindo a partir do carregamento de espectros puros e a aplicação de técnicas como ACP e CRM, estabelecer relações de estrutura e função entre a matéria orgânica do solo e suas propriedades.^{11,12,13} Diante disso, o objetivo foi obter características estruturais dos AH de diferentes origens através de técnicas de caracterização espectroscópica associadas a aplicação de quimiometria aos dados espectrais para relacionar os ambientes de formação das SH as suas características estruturais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Extração e purificação dos ácidos húmicos de diferentes origens

Os AH extraídos e purificados foram obtidos de diferentes origens, sendo elas: vermicomposto de esterco bovino, composto de cama de frango, solo

orgânico, turfa, sedimento de lago e solo mineral. O vermicomposto de esterco bovino foi processado com minhocas em pilhas sobre o solo durante 50 dias e obtido na Fazendinha Agropecuária da Embrapa Agrobiologia, localizada no município de Seropédica/RJ. O composto utilizado foi obtido a partir da compostagem de cama de frango em leiras com revolvimento manual durante 120 dias, realizada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os solos mineral e orgânico foram classificados de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos como Organossolo e Gleissolo,¹⁴ respectivamente, e coletados em perfis da UFRRJ. O sedimento foi coletado às margens do Lago do Instituto de Agronomia da UFRRJ. A turfa foi obtida a partir de depósito vegetal em relevo plano com grau avançado de humificação.

A extração e purificação dos AH foi realizada de acordo com a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e proposta por Swift (1996).¹⁵ Resumidamente, as amostras foram submetidas à agitação por 16 h com hidróxido de potássio (KOH 0,1 mol L⁻¹) sob atmosfera de N₂ (g) a uma proporção de 1:10 (m/v). Após centrifugação e filtragem, os AH foram separados a partir da acidificação do sobrenadante à pH 1,5 utilizando ácido clorídrico (HCl 6 mol L⁻¹). Os AH precipitados foram agitados por 24 h em contato com uma solução de ácido clorídrico, ácido fluorídrico e água (HCl/HF/H₂O) na proporção de 1:1:98 (v:v:v) para remover os elementos minerais. Após lavagem com água destilada para a remoção da solução ácida, os AH foram transferidos para membrana de diálise SPECTRA/POR® 10 kD, congelados em freezer a -80 °C e liofilizados.

2.2. Experimentos de FTIR e RMN de ¹³C via CP/MAS

Os espectros ATR-FTIR foram obtidos mediante registro na região de número de onda de 400 a 4000 cm⁻¹ com uma resolução espectral de 4 cm⁻¹, coletando em cada medição 32 digitalizações. Para isto foi utilizado um espectrômetro FTIR VERTEX 70/70v (Bruker Corporation, Alemanha) acoplado a um dispositivo de reflexão total atenuada (ATR) de platina diamante, consistente em um disco de diamante que funciona como elemento de reflexão interna. Uma massa de 0,25 g de AH liofilizados foram colocados no cristal ATR para o registro do espectro. Como espectro branco foi utilizado o registro espectral do ar

antes de cada análise. A obtenção e registro dos espectros foi realizada mediante software OPUS-Bruker. Os espectros foram obtidos por triplicata e submetidos a correção da linha base. O algoritmo “smoothing” (Savitsky-Golay) foi utilizado em todos os espectros com o objetivo de aumentar a relação sinal ruído. Os espectros trabalhados foram assinalados em função da localização da banda utilizando a ferramenta “PeakPicking”.

A espectroscopia de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico RMN de ¹³C via CP/MAS foi realizada utilizando o aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ¹³C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, uma massa de 150 mg de AH foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO₂) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de 8 ± 1 kHz. Os espectros foram obtidos em réplica (cinco por cada amostra) e a temperatura ambiente (25±1 °C), pela coleta de mais de 4000 data points para igual número maior de scans a um tempo de aquisição de aproximadamente 34 ms e com recycle delay de 5 s e sequência de pulso cp.av (¹H 90°) (para evitar o efeito de saturação de sinais, os experimentos prévios mostraram tempo de relaxação longitudinais inferiores e 25 ms). O tempo de contato para a sequência em rampa de ¹H ramp foi de 2 ms para contornar incompatibilidades Hartmann-Hahn. A coleta e elaboração espectral foi realizada utilizando o Software Bruker Topspin 2.1 com uma janela de aquisição de -50 ppm até 300 ppm. Os decaimentos livres de indução (FID) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

Os espectros foram divididos em oito regiões de deslocamentos químicos, as áreas dessas regiões foram determinadas após a integração de cada região e expressas como porcentagens da área total. Os deslocamentos químicos ¹³C foram calibrados em relação ao tetrametilsilano (0 ppm) e à glicina (COOH = 176,08 ppm). As regiões foram atribuídas da seguinte forma: C_{Alquil}-H,R de 0-46 ppm; C_{Alquil}-O,N de 46-59 ppm; C_{Alquil}-O de 59-91 ppm; C_{Alquil}-di-O de 91-110 ppm; C_{Aromático}-H,R de 110-142 ppm; C_{Aromático}-O,N de 142-156 ppm; C_{COO}-H,R de 156-186 ppm e C_{C=O} de 186-230 ppm.^{16,17} A razão entre os índices de hidrofobicidade e hidrofiliidade (HB / HI) foi calculada da seguinte forma: HB / HI = (0–46 ppm) + (110–156 ppm) / (46–110 ppm) + (156–186

ppm).^{18,19} O índice de aromaticidade foi determinado pela soma dos carbonos aromáticos ($C_{\text{Aromatico}}^{-\text{H,R}}$ e $C_{\text{Aromatico}}^{-\text{O,N}}$) expressa como porcentagem da área total, e o índice de alifaticidade é calculado subtraindo-se a aromaticidade de 100%.¹⁷

2.3. Análise de dados e quimiometria

Nesse estudo as análises quimiométricas foram realizadas utilizando o software Unscrambler® X 10.3 package (Camo Software AS Inc., Oslo, Norway). O carregamento dos espectros ATR-FTIR gerou uma matriz inicial de samples:variable (06 x 1867). A matriz ATR-FTIR foi submetida a plotagem de linha para inspeção visual e posteriormente a matriz foi transformada mediante “normalization”, “smoothing- Savitsky-Golay” e correção da linha base (baseline correction-baseline offset-linear baseline correction). O carregamento dos espectros RMN de ¹³C via CP/MAS gerou uma matriz inicial de samples:variable (06 x 4096). A matriz RMN de ¹³C via CP/MAS foi submetida a plotagem de linha para inspeção visual e posteriormente a matriz foi transformada mediante “normalization” com o objetivo dimensionar e garantir que todas as análises sejam feitas com os espectros na mesma escala,¹⁰ “smoothing” que tem como objetivo diminuir o ruído dos espectros e correção da linha base (baseline correction-baseline offset-linear baseline correction).

Para obtenção dos espectros médios, a ferramenta utilizada foi a estatística descritiva “descriptive analyses” e então a matriz “results” acessada para plotagem na forma de linha da média obtida na análise. As análises de componentes principais (ACP) foram realizadas a partir da matriz normalizada. O modelo adotado para a ACP utilizou um total de sete componentes, identificação automática de outliers e dados centralizados na média. Foi utilizado um algoritmo NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least Squares algorithm) e uma validação de “cross validation”. Os scores e loadings foram apresentados em gráficos diferentes e estes últimos plotados na forma de linha para a visualização dos pesos na forma de padrão espectral.

A análises de curva de resolução multivariada (CRM) foi realizada para decompor a matriz complexa dos espectros RMN de ¹³C via CP/MAS uma vez que o modelo de ACP já foi estabelecido. As restrições das análises foram estabelecidas para espectros não negativos (non-negative spectra) e concentrações não negativas (non-negative

concentrations). Duas novas matrizes foram obtidas mediante estas análises, uma matriz corresponde à concentração de cada componente e a outra aos espectros puros separados de acordo com o peso de cada componente. Neste estudo, o peso dos componentes apresentados corresponde com o padrão espectral dos dois primeiros componentes.

3. Resultados e Discussão

3.1. Comparação da característica estrutural de AH de diferentes origens mediante espectroscopia de FTIR-ATR e quimiometria

Os espectros FTIR dos AH de origens diferentes apresentaram um padrão semelhante entre si, indicando uma semelhança na composição dos grupamentos funcionais dos AH mesmo tendo sido formados em condições diferentes (Figura 1). Bandas de absorção intensas foram observadas em aproximadamente 3660-3284 cm^{-1} , porém com menor expressão no AH de solo mineral. Essas bandas estão associadas a presença de estiramentos de -OH e/ou -NH, que podem corresponder aos grupos funcionais: álcool, ácidos carboxílicos e/ou aminas.²⁰ O mesmo padrão foi observado para a banda entre 2850-2970 cm^{-1} , indicando a presença de ligações do C-H associada a alcanos, que também teve menor expressão no solo mineral. As bandas que são observadas entre 1500 e 1680 cm^{-1} estão associados a C=C, indicando a presença de alcenos e anéis aromáticos.³ Essas bandas foram mais intensa nos AH de vermicomposto, solo orgânico e turfa. Apenas nas amostras de AH do vermicomposto e sedimento foi observada bandas entre 1690-1760 cm^{-1} , associada a ligações do tipo C=O e indicando a presença de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos.²¹ A banda intensa em $\sim 1.030 \text{ cm}^{-1}$ é característico de estiramentos -OH de álcoois alifáticos e polissacarídeos.²² Na região de 1000 a 400 cm^{-1} aparecem as bandas características das impurezas minerais (caulinita e gibbsita) e quartzo, os quais são mais evidenciados nos AH de solo mineral e orgânico.²³

O espectro médio dos espectros de FTIR-ATR dos AH está ilustrado na Figura 2A e reafirma o padrão espectral característico dos AH entre todas as amostras analisadas. Entretanto, ao comparar cada espectro analisado com o médio é possível verificar que o espectro do solo mineral apresenta a

maiores diferenças, evidenciando a maior diferença estrutural desse AH para os demais. As semelhanças e diferenças entre os AH formados pode ser explicada pela ACP (94% da variação total explicada) realizada a partir dos dados espectrais e mostrada na Figura 2B e 2C. Observa-se na ACP que o AH extraído de solo mineral foi o que mais se diferenciou das demais amostras, se posicionando a valores negativos na PC-1 (87% do total de variância explicado) e na PC-2 (7% do total de variância explicado). A partir dos resultados observados na PC-1, o AH extraído do solo orgânico e o AH extraído do solo mineral foram as únicas amostras que apresentaram carregamento negativo, separando essas duas amostras das demais. A banda $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ e entre 1000 a 400 cm^{-1} no carregamento negativo da PC-1 (Figura 2B) demonstra que a forte presença de estiramentos -OH (pertencentes a álcoois alifáticos e polissacarídeos) e de impurezas minerais na estrutura dos AH extraídos do solo mineral e orgânico é o que diferencia essas amostras das demais, indicando uma característica estrutural mais alifática e com um menor número de grupos funcionais.^{23,24}

O carregamento positivo da PC-2 demonstra que os AH extraídos do vermicomposto e do sedimento guardam semelhança entre si devido à presença de vibrações de estiramentos -OH e/ou -NH ($\sim 3268\text{ cm}^{-1}$) e estiramentos de -CH e -CH₃ ($\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ e 2851 cm^{-1}) (pertencentes a álcoois, ácidos carboxílicos e amidas).²⁵ Enquanto que o carregamento negativo da PC-2 demonstra que os AH extraídos do composto da cama de frango e da turfa guardam semelhança entre si devido à presença de ligações de grupamentos C=C aromáticos, C=O de amidas I, -COO- e amida II do material peptídico (bandas $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ até $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$), sugerindo que a humificação durante a compostagem e a formação de turfas produz uma estrutura mais aromática e funcionalizada.^{3,26,27}

3.2. Comparação da característica estrutural de AH de diferentes origens mediante espectroscopia de RMN de ¹³C via CP/MAS e quimiometria

Os espectros dos AH obtidos através do RMN de ¹³C via CP/MAS são mostrados na Figura 3. Observa-se um padrão espectral para todos os

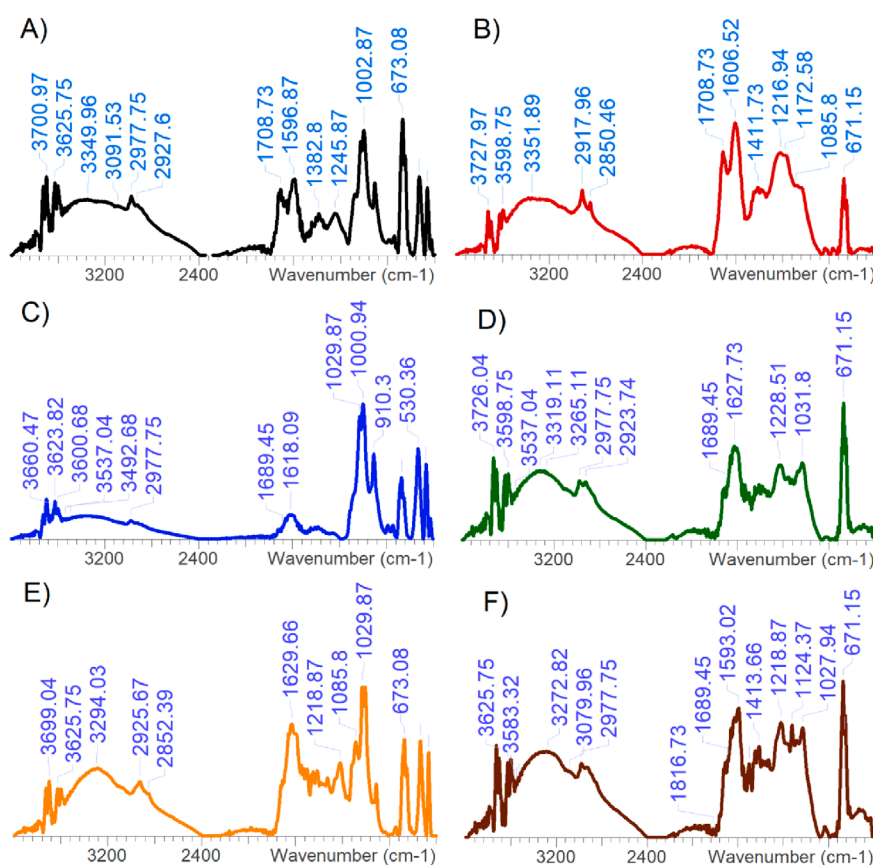


Figura 1. Espectros de Infravermelho de ácidos húmicos de solo orgânico (A); turfa (B); solo mineral (C); sedimento (D); composto (E) e; vermicomposto (F)

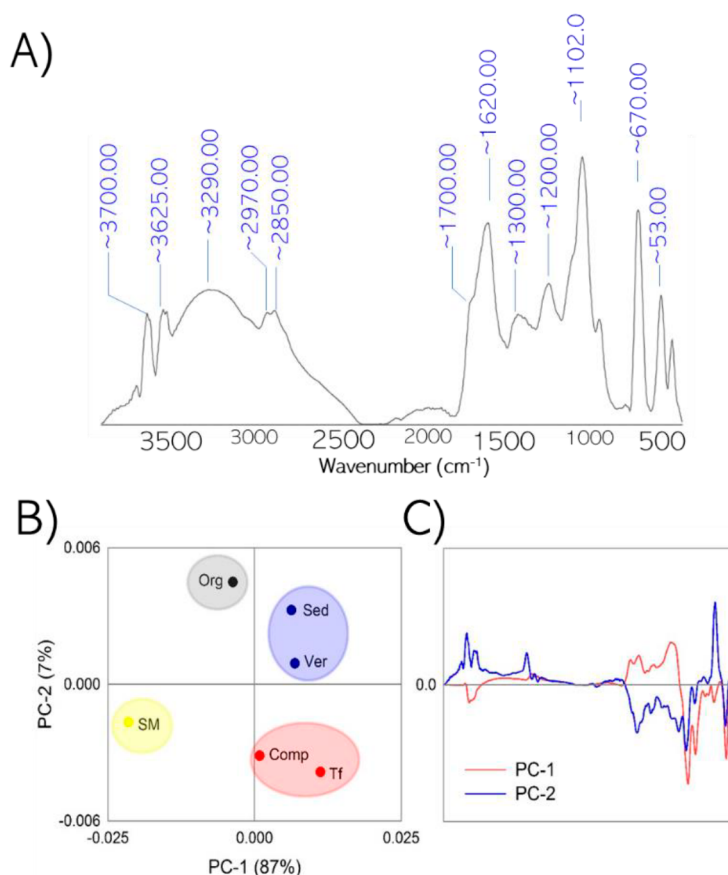


Figura 2. Espectro médio obtido por quimiometria dos espectros de FTIR dos AH (A). Análise dos componentes principais (ACP) realizada a partir dos dados espectrais de FTIR dos AH, sendo os scores (B) e os loadings da PC-1 (C) e da PC-2 (D) do espectro puro. Org: solo orgânico; Comp: composto de cama de frango; Tf: turfa; Ver: vermicomposto de esterco bovino; Sed: sedimento; SM: solo mineral

tratamentos e uma assinatura espectral típica de AH em todos os espectros analisados, conforme já demonstrado por García *et al.* (2019).²⁸ Os picos na região de 0-45 ppm indicam a presença de $-CH_3$ terminal, pertencente à cadeia de carbonos alifáticos não substituídos, representando estruturas alifáticas não funcionalizadas. A região de 45-60 ppm indica a presença de cadeia de carbonos alifáticos substituídos pertencentes a polissacarídeos e/ou polipeptídeos. Na região de 60-90 ppm são detectados os carbonos alifáticos que pertencem aos fragmentos de celulose e hemicelulose, bem como fragmentos de lignina. A região de 90-110 ppm representam os carbonos alifáticos ligados ao oxigênio pertencentes a carbonos anoméricos de carboidratos, e lignina. Na região 110-140 ppm indica a presença de carbonos aromáticos, enquanto na região de 140-160 ppm a presença de carbonos aromáticos funcionalizados, ligados ao oxigênio ou nitrogênio. Na região de 160-190 ppm a presença

de carbonos carboxílicos, e na região de 190-230 ppm a presença de carbonila.^{29,30}

A quantidade relativa de estruturas obtidas a partir da espectroscopia RMN de ^{13}C via CP/MAS (Figura 4A) mostra predomínio de fragmentos alifáticos atribuíveis a estruturas de lipídeos e carboidratos ($C_{Alquil}-H,R$) em todas as amostras. Observa-se que o AH de solo orgânico apresentou predomínio das estruturas predominantemente apolares de característica hidrofóbica ($C_{Alquil}-H,R$ e $C_{Aromatico}-H,R$). O AH de solo mineral apresentou um predomínio expressivo do $C_{Alquil}-H,R$ com relação aos outros tipos de carbono, indicando maior presença de estruturas alifáticas que contribuem para maior alifaticidade desse AH e podem estar relacionadas a uma substância húmica ainda no estágio inicial de humificação (Figura 4B). O AH da turfa e de solo orgânico foram os que apresentaram maior participação de $C_{Aromatico}-H,R$ na sua estrutura e, por isso, apresentaram maior aromaticidade (Figura 4B). Já o AH de vermicomposto e de composto de

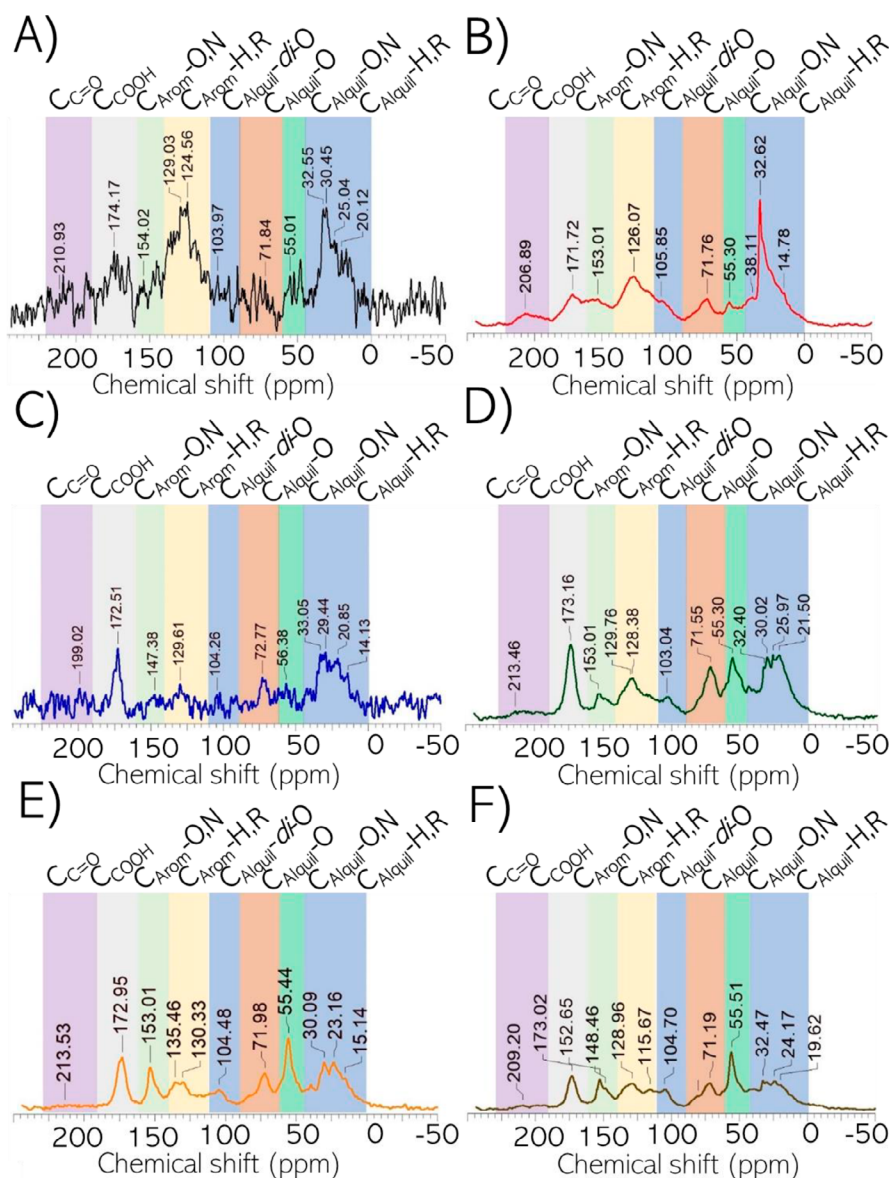


Figura 3. Espectro de ressonância magnética nuclear RMN de ¹³C via CP/MAS dos ácidos húmicos de diferentes origens. A: solo orgânico; B: turfa; C: solo mineral; D: sedimento; E: composto de cama de frango; F: vermicomposto de esterco bovino

cama de frango foram os que apresentaram maior participação de C_{Alquil}-O,N e C_{Aromático}-O,N em suas estruturas, indicando que estes apresentam maior quantidade de grupamentos O-H (carboxilas, álcoois, fenóis) e N-H (amino, amida).

Essa diferença observada no espectro do RMN de ¹³C via CP/MAS pode ser confirmada pela ACP aplicada aos dados espectrais demonstrada na Figura 5 (80% da variação total explicada). A PC-1 (53% do total de variância explicado) separou principalmente os AH de solo orgânico e de turfa dos AH de sedimento, vermicomposto e composto. Os AH de solo orgânico e turfa (carregamento negativo) apresentaram semelhança por possuírem

predominância das estruturas C_{Alquil}-H,R e C_{Aromático}-H,R, conferindo uma propriedade hidrofóbica à esses AH. Já os AH de sedimento, vermicomposto e composto (carregamento positivo) assemelharam-se pela presença das estruturas alifáticas e aromáticas oxigenadas (C_{Alquil}-O,N; C_{Alquil}-O; C_{Alquil}-di-O; C_{Ar}-O) e do carbono carboxílico (C_{COO}-H,R). A presença de grupamentos -OH (hidroxilas), -C=O (carbonilas) e -COOH (carboxilas) conferem as substâncias húmicas capacidade de interagir com cátions, como as bases trocáveis do solo e íons metálicos, contribuindo assim para elevar a capacidade de troca catiônica (CTC) do solo.³¹⁻³³ Esse resultado indica que essas estruturas

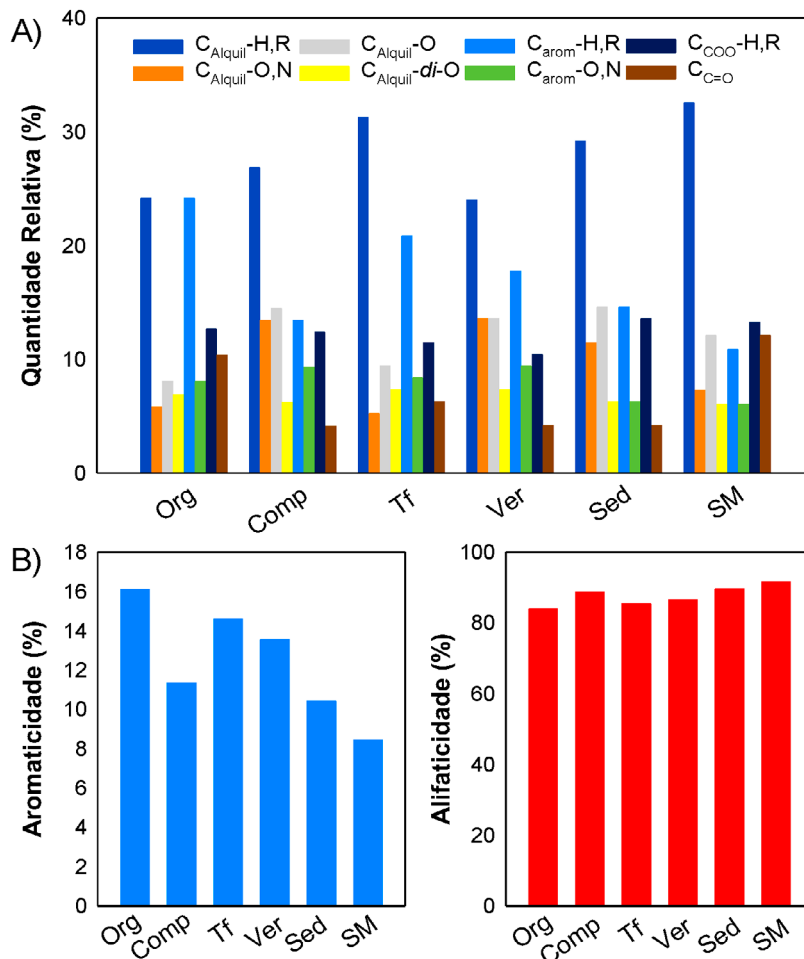


Figura 4. Quantidade relativa (%) dos tipos de carbono (A) e Índice de aromaticidade e alifaticidade (B) obtidas a partir da integração de diferentes regiões no RMN de ^{13}C via CP/MAS presentes nos AH de diferentes origens. Org: solo orgânico; Comp: composto de cama de frango; Tf: turfa; Ver: vermicomposto de esterco bovino; Sed: sedimento; SM: solo mineral

de AH assemelham-se por apresentarem uma maior funcionalização e, conseqüentemente, uma propriedade mais lábil. Corroborando com o observado nos espectros de FTIR, A PC-2 (27% da variação total explicada) evidencia que o AH do solo mineral foi o que mais se diferenciou das outras amostras pela predominância das estruturas $C_{Alquil-H,R}$, que apresentam caráter hidrofóbico.

A ACP aplicada aos dados espectrais de RMN de ^{13}C via CP/MAS sugere uma forte influência do ambiente de formação das SH com a sua propriedade hidrofóbica e hidrofílica e, conseqüentemente, com a labilidade e recalcitrância dessas estruturas. A Curva de Resolução Multivariada (CRM) obtida à partir dos espectros de AH (Figura 6A) demonstra a presença nos ácidos húmicos de dois domínios distintos. Um domínio apresenta características alifáticas e

oxigenadas, com predomínio das estruturas $C_{Alk-O,N}$, $C_{Alquil-O}$ e $C_{Alquil-di-O}$ (C -Alifáticos oxigenados), $C_{Aromatico-O}$ e $C_{COO-H,R}$ (carboxilas), sugerindo um domínio de caráter hidrofílico (linha vermelha). O outro domínio (linha azul) apresenta caráter hidrofóbico com o predomínio de estruturas aromáticas e alifáticas não oxigenadas ($C_{Aromatico-H,R}$ e $C_{Alquil-H,R}$) (Figura 14C). Observa-se na Figura 6B que a compostagem, vermicompostagem e sedimentos de lagos contribuíram para a formação de SH mais hidrofílicas e lábeis, enquanto que as SH formadas no solo apresentaram estruturas mais recalcitrantes. A presença de estruturas com propriedades hidrofóbicas pode estar relacionada com o aumento da estabilidade dos agregados nos solos e diminuição dos efeitos na degradação, atuando também no aumento do estoque de carbono orgânico no solo.³⁴

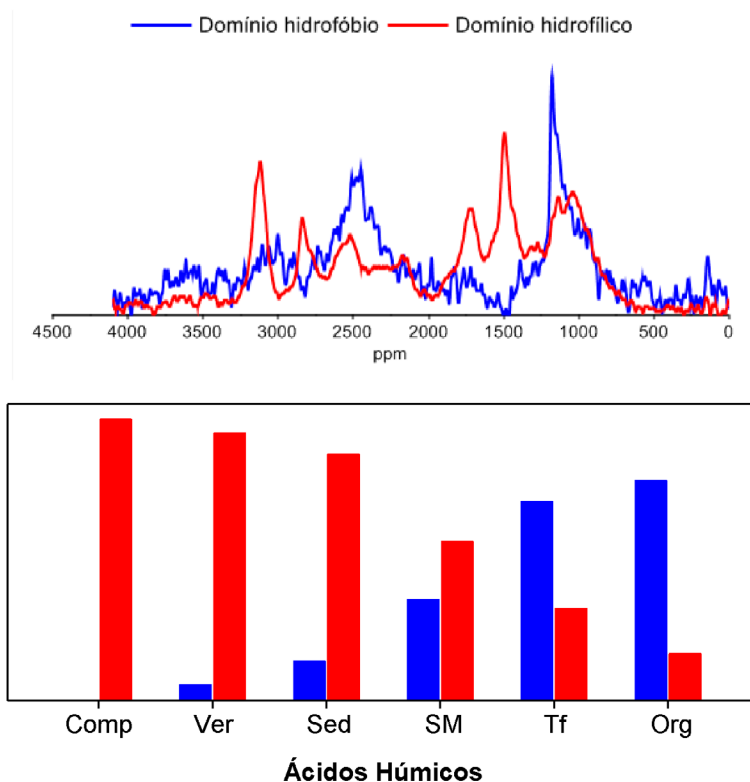


Figura 6. Curva de Resolução Multivariada (CRM) obtida à partir dos espectros de AH

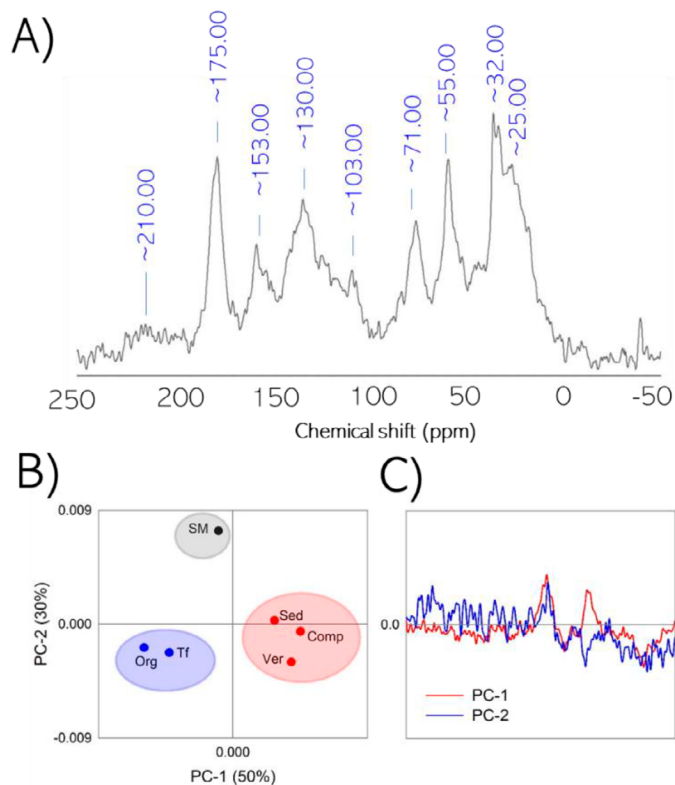


Figura 5. Espectro médio obtido por quimiometria dos espectros de RMN de ^{13}C via CP/MAS dos AH (A). Análise dos componentes principais (ACP) realizada a partir dos dados espectrais de RMN de ^{13}C via CP/MAS dos AH, sendo os scores (B) e os loadings da PC-1 (C) e da PC-2 (D) do espectro puro. Org: solo orgânico; Comp: composto de cama de frango; Tf: turfa; Ver: vermicomposto de esterco bovino; Sed: sedimento; SM: solo mineral

4. Conclusão

No presente estudo pode-se concluir que as características estruturais dos AH são influenciadas pelo seu ambiente de formação. O solo contribuiu para a formação de AH com um menor número de grupos funcionais quando comparado com os outros ambientes, conferindo a esses AH uma maior estabilidade estrutural e química. As turfas promovem a formação de AH que, apesar de possuírem predomínio de estruturas hidrofóbicas, possuem grande participação de carbonos carboxílicos em sua estrutura, conferindo-lhes uma capacidade de interagir com cátions. Já os ambientes de compostagem, vermicompostagem e sedimentos de lagos proporcionam a formação de AH com estruturas oxigenadas, com maior número de grupos funcionais, conferindo aos AH formados nesses ambiente uma maior labilidade e hidrofiliidade. Logo, essas características estruturais desenvolvidas no ambiente de formação dos AH irá determinar a função que poderão exercer e, conseqüentemente, as suas possíveis aplicações.

Agradecimentos

Os autores agradecem à disciplina de Química da Matéria Orgânica do Solo do PPGA-CS da UFRRJ. Fundação Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Brazil (Grant no. Faperj: 20128010). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (Grant no. 306867/ 2018-4-PQ2). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (Grant no. 88882.332158/2019-01). Os autores agradecem ao pelas bolsas de incentivo à pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ¹ Ghabbour, E. A., Davies, G.; *Humic Substances: Structures, Models and Functions*, 1a. ed., The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2001. [CrossRef]
- ² Nebbioso, A.; Piccolo, A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *720*, 77. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Stevenson, F.J.; *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 2a. ed., J. Wiley: New York, 1994.
- ⁴ García, A. C.; Tavares, O. C. H.; Balmori, D. M.; Almeida, V. S.; García, A. C.; Izquierdo, F. G.; Berbara, R. L. L. Em *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, Volume 1*; Ahmad, P., ed.; Elsevier: New York, 2014, cap. 18. [CrossRef]
- ⁵ Berbara, R. L. L.; García, A. C. Em *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*, vol 1; Ahmad, P.; Wani, M. R., eds.; Springer Science: New York, 2014, cap. 11. [CrossRef]
- ⁶ Chen, J. S.; Chiu, C. Y. Characterization of soil organic matter in different particle-size fractions in humid subalpine soils by CP/MAS ¹³C NMR. *Geoderma* **2003**, *117*, 129. [CrossRef]
- ⁷ Machado, W.; Franchini, J. C.; Guimarães, M. F.; Tavares Filho, J. Spectroscopic characterization of humic and fulvic acids in soil aggregates, Brazil. *Heliyon* **2020**, *6*, e04078. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ González-Pérez, M.; Torrado, P. V.; Colnago, L. A.; Martin-Neto, L.; Otero, X. L.; Milori, D. M. B. P.; Gomes, F. H. ¹³C NMR and FTIR spectroscopy characterization of humic acids in spodosols under tropical rain forest in southeastern Brazil. *Geoderma* **2008**, *146*, 425. [CrossRef]
- ⁹ Al-Faiyz, Y. S. S. CPMAS ¹³C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, S839. [CrossRef]
- ¹⁰ Esbensen, K. H.; Guyot, D.; Westad, F.; Houmoller, L.P.; *Multivariate data analysis: in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*, 5a. ed., CAMO Process A/S: Oslo, 2002.
- ¹¹ García, A. C.; De Souza, L. G. A.; Pereira, M. G.; Castro, R. N.; García-Mina, J. M.; Zonta, E.; Berbara, R. L. L. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 20798. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Gomes, T. M.; Berbara, R. L. L.; Pereira, M. G.; Segundo, S. U.; Tavares, O. C. H.; Assunção, S. A.; Zonta, Z.; Sobrinho, N. M. B. A.; García, A. C. Effects of farmed managements in sandy soils on composition and stabilization of soil humic substances. *Land Degradation & Development* **2018**, *29*, 68. [CrossRef]
- ¹³ Assunção, S. A.; Pereira, M. G.; Rosset, J. S.; Berbara, R. L. L.; García, A. C. Carbon input and the structural quality of soil organic matter as a function of agricultural management in a tropical climate region of Brazil. *Science of the Total Environment* **2019**, *658*, 901. [CrossRef] [PubMed]

- ¹⁴ Santos, H. G.; Jacomine, P. K. T.; Anjos, L. H. C.; Oliveira, V. A.; Lumberras, J. F.; Coelho, M. R.; Almeida, J. A.; Araújo Filho, J. C.; Oliveira, J. B.; Cunha, T. J. F.; *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*, 5. ed., Embrapa: Brasília, 2018. [[Link](#)]
- ¹⁵ Swift, R.; *Organic matter characterization*. Soils Science Society of America: Madison, 1996. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ De la Rosa, J. M.; González-Pérez, J. A.; González-Vila, F. J.; Knicker, H.; Araújo, M. F. Molecular composition of sedimentary humic acids from South West Iberian Peninsula: a multi-proxy approach. *Organic Geochemistry* **2011**, *42*, 791. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Song, G.; Novotny, E. H.; Simpson, A. J.; Clapp, C. E.; Hayes, M. H. B. Sequential exhaustive extraction of a Mollisol soil, and characterizations of humic components, including humin, by solid and solution state NMR. *European Journal of Soil Science* **2008**, *59*, 505. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Spaccini, R.; Piccolo, A. Molecular Characterization of Compost at Increasing Stages of Maturity. 2. Thermochemolysis-GC-MS and ¹³C-CPMAS-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Aguiar, N. O.; Novotny, E. H.; Oliveira, A. L.; Rumjanek, V. M.; Olivares, F. L.; Canellas, L. P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration* **2013**, *129*, 95. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Amir, S.; Jouraiphy, A.; Meddich, A.; el Gharous, M.; Winterton, P.; Hafidi, M. Structural study of humic acids during composting of activated sludge-green waste: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *177*, 524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Wang, X.; Cui, H.; Shi, J.; Zhao, X.; Zhao, Y.; Wei, Z. Relationship between bacterial diversity and environmental parameters during composting of different raw materials. *Bioresource Technology* **2015**, *198*, 395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² 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* **2010**, *101*, 1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Benites, V. M.; Mendonça, E. S.; Schaefer, C. E. R.; Martin Neto, L. Caracterização dos ácidos húmicos extraídos de um latossolo vermelho-amarelo e de um podzol por análise termodiferencial e pela espectroscopia de absorção no infravermelho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **1999**, *23*, 543. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Zaccheo, P.; Cabassi, G.; Ricca, G.; Crippa, L. Decomposition of organic residues in soil: experimental technique and spectroscopic approach. *Organic Geochemistry* **2002**, *33*, 327. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Adani, A.; Genevini, P.; Tambone, F.; Montoneri, E. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* **2006**, *65*, 1414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ (18) Stevenson, F. J.; Goh, K. M. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1971**, *35*, 471. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Wander, M. M.; Traina, S. J. Organic fractions from organically and conventionally managed soils: II Characterization. *Soil Science Society of America Journal* **1996**, *60*, 1087. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ García, A. C.; Castro, T. A. V. T.; Berbara, R. L. L.; Tavares, O. C. H.; Elias, S. S.; Amaral Sobrinho, N. M. B.; Pereira, M. G.; Zonta, E. Revisão Sobre a Relação Estrutura-Função das Substâncias Húmicas e a sua Regulação do Metabolismo Oxidativo em Plantas. *Revista virtual de Química* **2019**, *11*, 754. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Spaccini, R.; Piccolo, A. Spectroscopic Characterization of Compost at Different Maturity Stages. *Clean* **2008**, *36*, 152. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Deshmukh, A. P.; Simpson, A. J.; Hadad, C. M.; Hatcher, P. G. Insights into the structure of cutin and cutan from Agave americana leaf cuticle using HRMAS NMR spectroscopy. *Organic Geochemistry* **2005**, *36*, 1072. [[CrossRef](#)]
- ³¹ (23) Schnitzer, M.; Khan, S. U.; *Soil Organic Matter*, Elsevier Publishing Company: Amsterdam, 1978.
- ³² Shobaa, V. N.; Chudnenko, K. V. Ion Exchange Properties of Humus Acids. *Eurasian Soil Science* **2014**, *47*, 761. [[CrossRef](#)]
- ³³ Tan, K. H.; *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies*. CRC Press: New York, 2014. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Ramírez, P. B.; Calderón, F. J.; Fonte, S. J.; Santibáñez, F.; Bonilla, C. A. Spectral responses to labile organic carbon fractions as useful soil quality indicators across a climatic gradient. *Ecological Indicators* **2020**, *111*, 106042. [[CrossRef](#)]