

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Padrão Estrutural das Substâncias Húmicas
Utilizando como Modelo os Ácidos Húmicos de Solos
e Vermicomposto**

Tamiris Conceição de Aguiar

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**PADRÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS
UTILIZANDO COMO MODELO OS ÁCIDOS HÚMICOS DE SOLOS E
VERMICOMPOSTO**

TAMIRIS CONCEIÇÃO DE AGUIAR

Sob a orientação do Professor
Andrés Calderín García

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Maio de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A282p	<p>Aguiar, Tamiris Conceição de, 1987- Padrão estrutural das substâncias húmicas utilizando como modelo os ácidos húmicos de solos e vermicomposto / Tamiris Conceição de Aguiar. – Seropédica, 2021. 41 f. : il.</p> <p>Orientador: Andrés Calderín García. Dissertação (Mestrado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2021.</p> <p>1. Matéria orgânica. 2. Espectroscopia. 3. Quimiometria. 4. Interações organo-minerais. I. García, Andrés Calderín, 1981-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo III. Título.</p>
-------	--

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

TAMIRIS CONCEIÇÃO DE AGUIAR

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, área de Concentração em Biologia do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 28/05/2021.

Andrés Calderín García. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Marcos Gervasio Pereira. Dr. UFRRJ

Ademir Fontana. Dr. Embrapa Solos

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui.
À minha família, pelo apoio, amor, carinho e paciência de sempre.
Ao Andrés Calderín Garcia, pela orientação.
Aos meus amigos, pelo apoio e compreensão.
E a todos que de alguma forma contribuíram positivamente para realização desde sonho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que eu chegasse até aqui, estando sempre ao meu lado, dando-me forças para seguir, nunca deixando me faltar nada.

À minha família, sobretudo aos meus pais, por todo amor, apoio, compreensão e dedicação ao longo da minha formação.

Ao meu irmão Thayan pelo companheirismo de uma vida, e por todos os momentos em que precisei de uma palavra amiga e ele estava lá.

À minha vovó Lourdes, por ser sempre presente, e por ter dedicado parte de sua vida para contribuir na formação do meu caráter, o que sou hoje também diz muito ao seu respeito.

Ao Pedro meu namorado, por todo carinho e amor que me foi dedicado em momentos de tensão, por entender os momentos de ausência, pelo incentivo constante, e por nunca deixar de acreditar em meu potencial.

Às minhas amigas, Deise Quele, Delier Aguiar, Grazielle Aguiar, Lucineia Costa, Mônica Neres, Thamires Resende, Juliana Gabriela, Gabriela Rodriguês, Lorraine Cristina, Thaina Louzada, Carol Santos, Mayline Oliveira, Isabele Bravo e Fernanda Araujo, pelo carinho e apoio de sempre.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por todas as oportunidades de aprendizado e amadurecimento.

Ao professor Andrés Calderín García, pela orientação, paciência e dedicação incansável.

Aos meus companheiros de jornada do Laboratório de Química Biológica do Solo, todos de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Ao professor Everaldo Zonta, e aos colegas Rosimar e Júlio do Laboratório de fertilidade de relação solo planta.

Ao professor Marcos Gervasio Pereira, e aos colegas do Laboratório de Gênese e Classificação do Solo, por todo apoio.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

DE AGUIAR, Conceição Tamiris. **Padrão estrutural das substâncias húmicas utilizando como modelo os ácidos húmicos de solos e vermicomposto.** 2021. 41f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O processo de humificação da matéria orgânica do solo (MOS) assim como a identidade estrutural das substâncias húmicas (SH) constitui um dos temas mais debatidos na ciência do solo. Uma das principais discussões envolvidas são, os critérios relatados para questionar a teoria do húmus que carece ainda de dados e argumentação científica aceitável. Neste estudo colocamos em debate uma aproximação realizada aos padrões estruturais das SH, especificamente dos ácidos húmicos (AH) que demonstra que, embora exista a necessidade de estudos ainda mais aprofundados na química dos húmus, as teorias existentes são válidas e as SH apresentam um padrão estrutural único e característico independente da fonte de origem. De acordo com esta linha, o objetivo foi obter os padrões e as diferenças estruturais de AH isolados de diferentes tipos de solos e de vermicompostos mediante caracterização espectroscópica ^{13}C NMR CP MAS e técnicas quimiométricas. Foi utilizado espectros de oitenta amostras de AH previamente isolados e publicados e outros pertencentes ao banco de dados espectrais do Laboratório de Química Biológica do Solo. Os espectros pertencem a amostras de solos classificados como Organossolo, Latossolo, Cambissolo, Chernossolo, Planossolo arenoso, ambos do Brasil, Ferralítico Rojo (Cuba) e vermicomposto (Brasil). Todos os AH foram obtidos mediante a metodologia da Sociedade Internacional de substâncias Húmicas (IHSS) e os espectros ^{13}C NMR CP MAS registrados nas mesmas condições experimentais. Todos os espectros foram avaliados utilizando o software ACD/Labs 2020 1.1. A quimiometria foi realizada aplicando aos espectros análises de componentes principais (PCA), curvas de resolução multivariada (MCR) e análises descritivas por meio do software The Unscrambler (version 10.4). Com o presente estudo concluem-se que independentemente do tipo de solo e a fonte de formação do AH, as SH se formam, e podem ser isoladas e caracterizadas. Todos os AH possuem um padrão estrutural semelhante, independente da origem, porém apresentam quantidades relativas diferentes de estruturas químicas em sua composição. As diferentes quantidades estruturais geram propriedades diferentes em cada AH como a hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, aromaticidade e alifaticidade e por tanto haverá uma função semelhante, porém com intensidades diferentes para cada AH. Os dados indicam que as SH são um grupo de compostos com identidade estrutural única, e diferente das moléculas que lhe deram origem. Sugere que não existe um único processo de humificação, portanto em cada fonte de origem se desenvolverá uma humificação que dependem das características do ambiente e com isso, este processo ocorre com diferentes extensões.

Palavras-chave: Matéria orgânica. Espectroscopia. Quimiometria. Interações organo-minerais.

ABSTRACT

DE AGUIAR, Conceição Tamiris. **Structural pattern of humic substances using humic acids of soil and vermicompost as a model.** 2021. 41p. Dissertation (Master in Agronomy, Soil Science). Institute of Agronomy, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The humification process of soil organic matter (SOM) as well as the structural identity of humic substances (HS) is one of the most debated topics in soil science. One of the main discussions involved is, the criteria reported to question the theory of humos still lacks data and acceptable scientific argumentation. In this study, we debate an approximation made to the structural patterns of HS, specifically humic acids (HA), which demonstrates that, although there is a need for even more in-depth studies on the chemistry of humus, existing theories are valid and HS present a pattern unique and characteristic structural independent of the source of origin. According to this line, the objective was to obtain the patterns and structural differences of eighty HA isolated from different types of soils and vermicompost through spectroscopic characterization ^{13}C NMR CP MAS and chemometric techniques. Eighty previously isolated and published HA samples and others belonging to the spectral database of the Laboratory of Biological Chemistry of Soil were used. The spectra belong to soil samples classified as Organosol, Latosols, Cambisol, Chernossol, Sandy Planossol, both from Brazil, Ferralitic Rojo (Cuba), and vermicompost (Brazil). All HA were obtained using the methodology (IHSS) and ^{13}C NMR CP MAS spectra recorded under the same experimental conditions. All spectra were evaluated using the ACD / Labs 2020 1.1. Chemometrics was performed by applying principal component analysis (PCA), multivariate resolution curves (MCR) and descriptive analysis using the software The Unscrambler (version 10.4). With the present study, it is concluded that regardless of the type of soil and the source of HA formation, SH form and can be isolated and characterized. All HA have a similar structural pattern, regardless of origin, but have different relative amounts of chemical structures in their composition. The different structural quantities generate different properties in each HA such as hydrophilicity, hydrophobicity, aromaticity and aliphaticity and therefore there will be a similar function, but with different intensities for each HA. The data indicate that SH are a group of compounds with a unique structural identity and different from the molecules that gave rise to them. It suggests that there is not a single humification process, therefore, in each source of origin a humification will be develop depending on the characteristics of the environment and with that, this process occurs with different extensions.

Keywords: Organic matter. Spectroscopy. Chemometry. Organo-minerals interactions.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear do isótopo do ^{13}C
AH	Ácidos húmicos
AF	Ácidos fúlvicos
CP	Polarização cruzada
DP	Polarização direta
Hu	Humina
IHSS	Sociedade internacional de substância húmica
MAS	Rotação de ângulo mágico
MCR	Curva de resolução multivariada
MOS	Matéria orgânica do solo
PCA	Análise de componente principal
SH	Substâncias húmicas
VC	Vermicomposto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que representa o processo de humeomica para estudar a estrutura da SH a partir do modelo da supramolecularidade.....	5
Figura 2. Classificação das ligações de H. Possibilidades de ligação de hidrogênio intermoleculares mais representativas e relevantes para a MOS.....	6
Figura 3. Formação de compostos polimerizados no solo a partir de ação enzimática.....	7
Figura 4. Formação de oligômeros no solo a partir de ação enzimática sintetizadas por fungos.....	7
Figura 5. Estrutura macromolecular proposta para os AH.....	8
Figura 6. Vias que envolvem os processos bióticos e abióticos de humificação de oxoácidos em PK em solos.....	9
Figura 7. Esquema representado de maneira hipotética a dinâmica dos compostos orgânicos no solo em função das interações supramoleculares.....	10
Figura 8. Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹³ C de um ácido húmico característico extraído de um solo orgânico no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	13
Figura 9. Espectros ¹³ C NMR CP/MAS das amostras de AH isolados de amostras de solo: Planossolo (arenoso), Cambissolo, Organossolo, Latossolo, Chernossolo, Ferralítico Rojo (Cuba) e de Vermicomposto.....	23
Figura 10. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens considerando os potenciais outlier obtidos teste de <i>Hotelling-T² ellipse</i>	24
Figura 11. Análises de PCA “loadings” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.....	26
Figura 12. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-2 e PC-3 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.....	27
Figura 13. Análises de PCA “loadings” para as componentes PC-2 e PC-3 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.....	28
Figura 14. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-1, PC-2 e PC-3 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens considerando os potenciais outlier obtidos teste de <i>Hotelling-T² ellipse</i>	29
Figura 15. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.....	30
Figura 16. Análises de PCA “loadings” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.....	31
Figura 17. Padrões estruturais espectrais obtidos para cada AH extraídos das diferentes origens aplicando técnicas quimiométricas de estatística descritiva. Os padrões espectrais são expressos a partir da média estatística de cada tipo de solo. O padrão geral foi obtido a partir de uma quantidade de amostras de n=80.....	32
Figura 18. MCR realizada a partir da matriz de 80 espectros ¹³ C NMR CP MAS expressando o as duas primeiras componentes de maior peso na forma de padrão espectral.....	33
Figura 19. MCR realizada a partir da matriz de 80 espectros ¹³ C NMR CP MAS expressando as duas primeiras componentes em quantidade relativa.....	34

Figura 20. Quantidade relativa de estruturas presentes nos AH isolados de diferentes fontes de origem e propriedades de alifaticidade e aromaticidade obtidas de 80 espectros ^{13}C NMR CP MAS.36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Chemical shift para as regiões mais importantes identificadas mediante ^{13}C NMR CP MAS.....	12
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variações de deslocamento químico ^{13}C típicas para constituintes encontrados na MOS.....	11
Tabela 2. Características dos solos utilizados no estudo.....	14
Tabela 3. Assinalação dos espectros por regiões indicando as estruturas do carbono presentes nos AH.....	20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Definições Atuais Sobre a Matéria Orgânica Humificada e as Substâncias Húmicas	3
2.2 Características Estruturais das Substâncias Húmicas Dentro da Supramolecularidade ...	3
2.3 O Processo de Humificação	6
2.4 Uso de Técnica Espectroscópicas em Estado Sólido ¹³ C NMR CP MAS para Caracterização das Substâncias Húmicas	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Origem dos AH	14
3.2 Isolamento e Purificação dos AH Utilizados Neste Estudo	15
3.3 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido do Isótopo do ¹³ C em Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (CP MAS ¹³ C-NMR)	15
3.4 Aplicação de Técnicas Estatísticas aos Dados Espectrais por Meio de Análises Quimiométricas	16
3.4.1 Carregamento dos dados espectrais	16
3.4.2 Análises quimiométricas a partir dos dados espectrais ¹³ C-NMR CP MAS	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Padrões Estruturais dos AH no Contexto Atual Sobre a Identidade das SH e o Processo de Humificação	18
4.2 Análises Espectroscópica ¹³ C RMN CP/MAS das Amostras de AH de Solo e Vemicomposto	19
4.3 Aplicação da Quimiometria PCA- ¹³ C NMR CP/MAS	24
4.3.1 Condição 1. Análises quimiométricas das amostras de AH considerando a inclusão de amostras extremas “outlier”	24
4.4 Condição 2. Análises Quimiométricas das Amostras de AH Excluindo as Amostras Outlier	28
4.4.1 Padrões estruturais dos AH obtidos mediante estatística descritiva	31
4.5 Domínios Estruturais Presentes nos AH Acessados Mediante Curva de Resolução Multivariada (MCR)	33
4.6 Quantidade Relativa de Estruturas nos AH Extraídos das Diferentes Origens	35
4.7 Debate Atual Sobre a Humificação e as Substâncias Húmicas	36
5 CONCLUSÕES	38
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

A dinâmica do carbono orgânico no solo constitui um dos temas de maior debate na atualidade nas ciências do solo. Existem hoje questionamentos aos paradigmas dominantes sobre os mecanismos que regulam o ciclo do carbono no solo. Um dos principais questionamentos está relacionado com a capacidade da matéria orgânica para ser armazenada no solo na forma de substâncias húmicas (SH), de maneira que o paradigma do humus como composto capaz de estabilizar quimicamente o carbono no solo se encontra sob reestruturação e reavaliação científica.

Apesar dos questionamentos, o conceito de SH se encontra ainda vigente e inclusive as teorias de polimerização de moléculas fenólicas são utilizadas até hoje para explicar como a degradação de fragmentos de ligninas por microrganismos são capazes de contribuir para formação de composto húmicos mais estáveis. A formação de SH permite explicar como ocorre a incorporação de diferentes moléculas do solo a uma estrutura quimicamente mais estável, como as moléculas triazina e outros surfactantes que podem fazer parte da fração orgânica estável no solo. Desta forma, as SH permitem ainda entender as diferentes formas de reação que ocorrem no solo assim como suas interações com as plantas (GERKE 2018; SEN et al., 2020).

A humificação é o processo natural mediante o qual as SH são formadas em húmus ou em denominação científica, em substâncias húmicas -SH (HAYES e SWIFT 2020). No entanto este processo tem sido também questionado e em seu lugar tem sido anunciado o processo de modelo contínuo do solo (soil continuum model -SCM, em inglês). Este modelo expressa que a matéria orgânica intacta (vegetal e animal) está protegida fisicamente dos microrganismos e em função disso há uma regulação da degradação onde aquelas moléculas podem se transformar para compostos altamente oxidados como ácidos carboxílicos (LEHMANN e KLEBER, 2015). Da mesma forma, tem sido criticada a própria existência das SH como entidade química independente, baseado no argumento de que a estabilidade da MOS não se deve as suas propriedades químicas intrínsecas e sim às condições químicas, biológicas e físicas do solo (SCHMIDT et al. 2011). Notadamente, estes mesmos autores têm publicado mais recentemente um artigo onde relatam que a dinâmica da matéria orgânica no solo é regida pela diversidade molecular dos compostos no solo (LEHMANN et al., 2020).

Em reação a estes novos postulados, os cientistas do húmus e químicos do solo tem publicado uma série de artigos que permitem afastar as possíveis confusões criadas pelo debate atual. Em uma publicação recente, Olk et al. (2019) esclarece que o argumento de que a metodologia padrão das IHSS produz artefatos químicos e fortes transformações estruturais, é exagerado. Isto porque o O_2 é retirado da atmosfera de extração mediante deslocamento com N_2 . Além disso, nesse artigo são expostas evidências que demonstram que as extrações de SH com e sem atmosfera de O_2 não apresentam diferenças estruturais marcantes.

Por outro lado, Hayes e Swift (2018) relatam que não há contradições aparentes dentro do processo de humificação. Para estes autores a humificação constitui um processo de transformações progressivas de restos de carbono. Durante o processo de transformação estes compostos alcançam um grau estrutural tal que satisfazem as definições de AH e ácidos fúlvicos (AF). Desta forma, estes compostos podem ser estabilizados pelas suas interações com a fração mineral do solo.

Nesta mesma linha de entendimento, Piccolo (2016) mostra que o processo de humificação é dinâmico, onde as moléculas que chegam no solo interagem não só mediante ligações covalentes, mas também mediante interações hidrofóbicas. Desta forma, estas moléculas podem chegar a alcançar uma organização supraestrutural onde podem ser

liberadas em função das mudanças que ocorrem nas condições físicas, químicas e biológicas do solo.

Apesar destes conhecimentos, Piccolo et al. (2018) relatam que a visão de supramolecularidade, como forma de organização supraestrutural não tem sido o suficientemente entendido. Estes autores argumentam que as SH estão no ambiente natural, organizadas em função de interações não covalente e fracas do tipo van der Waals, π - π , CH- π e ligações de hidrogênio, estando as SH em um equilíbrio entre a solução do solo e aquelas em interação com a fração mineral do solo.

Nosso laboratório de química biológica do solo vem também contribuindo ao debate sobre o processo de humificação e validade estrutural das SH em diferentes ambientes. Os trabalhos desenvolvidos pelo grupo de García e *col.* tem mostrado que os efeitos das SH em plantas guardam uma relação direta com as características estruturais destes compostos (GARCÍA et al., 2016; VAN TOL et al., 2021). Assim, GARCÍA et al. (2019), relatam que as SH apresentam um padrão estrutural único que é diferente de qualquer outro grupo de compostos do solo. O padrão estrutural comum permite entender que os fragmentos com maior labilidade em SH podem atingir a superfície radicular e interagir com a membrana celular, regular o metabolismo oxidativo e estimular o crescimento radicular nas plantas. Labilidade e recalcitrância são propriedades decorrentes das características e organização supraestrutural das SH e podem definir o tipo e a intensidade da bioatividade das SH nas plantas.

Diante deste cenário, se fazem necessárias pesquisas na área da química do húmus. Neste trabalho é abordado o estudo do padrão estrutural das SH isoladas de fontes diferentes e de diferentes regiões geográficas. Para isto, foi aplicado técnicas de caracterização espectroscópica ^{13}C NMR CP MAS de amostras de AH e empregado à estas informações estruturais as técnicas quimiométricas.

A hipótese de que as SH independente da origem, apresentam um padrão químico estrutural de origem único e por tanto são formadas mediante um processo específico de estabilização química, denominado humificação.

Para testar a hipótese a presente dissertação tem como objetivo geral: Obter os padrões e as diferenças estruturais de AH isolados de diferentes tipos de solos e de vermicompostos mediante caracterização espectroscópica ^{13}C NMR CP MAS e técnicas quimiométricas.

Para alcançar o objetivo geral, a seguinte dissertação tem como objetivos específicos:

- a) Identificar as estruturas mediante espectroscopia ^{13}C NMR CP MAS e quantificar as estruturas de AH isolados de amostras de solos incluindo as classes dos Organossolo, Latossolos, Cambissolo, Chernossolo e Planossolo arenoso, ambos do Brasil, Ferralítico Rojo (Cuba), e vermicomposto.
- b) Estabelecer padrões espectrais aplicando técnicas de análises multivariadas como os componentes principais -PCA por meio da utilização da quimiometria.
- c) Estabelecer padrões médios espectrais gerais para cada tipo de fonte aplicando técnicas de análises estatística descritiva por meio da quimiometria.
- d) Determinar e quantificar domínios estruturais predominantes nos AH aplicando técnicas de curva de resolução multivariada (MCR) por meio da utilização da quimiometria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definições Atuais Sobre a Matéria Orgânica Humificada e as Substâncias Húmicas

Durante muito tempo, o carbono orgânico na forma de SH tem sido reconhecido como a forma de carbono mais amplamente distribuído no planeta. A definição tradicional e operacional das SH expressa que podem ser identificadas três frações: Os ácidos fúlvicos (AF), que são solúveis a qualquer valor de pH; os ácidos húmicos (AH), insolúveis a valores de pH inferiores a 2 e as huminas (Hu), insolúveis a qualquer valor de pH (SCHNITZER, 1978).

A sociedade internacional de substâncias húmicas (IHSS) propõe que as SH sejam reconhecidas como misturas complexas e heterogêneas de materiais polidispersos formados em solos, sedimentos e águas naturais por reações bioquímicas e químicas durante a decomposição e transformação de restos vegetais e microbianos em um processo denominado humificação. A lignina vegetal e seus produtos de transformação, polissacarídeos, melanina, cutina, proteínas, lipídios, ácidos nucléicos, partículas finas de carvão etc., são componentes importantes que participam desse processo (IHSS, 2021).

Em estudos mais recentes, vários autores tem se preocupado por entender e relatar as novas evidências de SH podem ser definidas. Desde Kononova (1966, 1975) e Hayes e Swift (1978), a MOS pode ser dividida em:

1. Materiais inalterados: compostos orgânicos frescos e não transformados de maior tempo de deposição no solo.
2. Materiais transformados (Húmus): matérias vegetais com grau de transformação avançado onde as características morfológicas não apresentam semelhanças com os materiais que lhe deram origem. Esses materiais estão condensados e podem ou não estar humificados, eles se classificam em:
 - a) Amorfos: componentes húmicos de cor marrom, diferenciados com base nas propriedades químicas e de solubilidade em ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas.
 - b) Outros componentes: compostos de classes reconhecíveis, tais como polissacarídeos, polipeptídeos, ligninas modificadas etc. Esses compostos podem ser sintetizados por microrganismos ou subprodutos de modificações dos detritos originais. Esses materiais, embora componentes de húmus, não seriam considerados como SH.

As definições de SH ganharam um novo entendimento a partir das evidências supraestruturais enunciada por Piccolo *e col*, onde este grupo de pesquisa definiu às SH como fragmentos heterogêneos que são auto-organizados e unidos em solução por forças dispersivas, como Van der Waals, $\pi-\pi$ e $CH-\pi$, e ligações de hidrogênio em equilíbrio com fragmentos húmicos de fase sólida (NEBBIOSO e PICCOLO, 2011; PICCOLO, 2016).

2.2 Características Estruturais das Substâncias Húmicas Dentro da Supramolecularidade

Para compreender melhor as evidências estruturais das SH se comportando como supramoléculas, se faz necessário primeiro entender os conceitos importantes sobre a química das supramoléculas. A química supramolecular pode ser definida como a química do auto arranjo das moléculas e das ligações intermoleculares além do entendimento molecular mediante as interações não covalentes. As supramoléculas, no entanto cumprem também com as características topológicas e geométricas da química molecular. Em termos de

características topológicas, as estruturas supramoleculares apresentam *composição*: definidas como o número e tipo de moléculas presentes na supraestrutura. Também apresentam *constituição*: o que determina a interação entre as moléculas. Em termos de características geométricas, as supramoléculas apresentam *configuração*: orientação de moléculas vizinhas sobre uma determinada molécula no espaço 3D assim como também apresenta *conformação*: se refere à forma global instantânea de uma estrutura supramolecular no espaço 3D (TURRO 2005).

A supramolecularidade encontra sua base na capacidade das moléculas para alcançar tal nível estrutural mediante o “self assembly”, auto arranjo ou automontagem. A automontagem molecular é um processo no qual, moléculas (ou partes de moléculas) formam agregados ordenados espontaneamente e não envolve intervenção humana; as interações envolvidas geralmente são não covalentes. Na automontagem molecular, a estrutura molecular determina a estrutura da montagem (WHITESIDES et al., 2002).

A automontagem apresenta alguns pressupostos que marcam a diferença entre o entendimento da química supramolecular e a química das moléculas, de acordo com Whitesides et al., 2002, estas são:

1. *Componentes*. Consiste em um grupo de moléculas ou fragmentos de macromoléculas que interagem entre si e podem ser iguais ou diferentes. Sua interação leva de algum estado menos ordenado para um estado final mais ordenado.
2. *Interações*. As moléculas que interagem o fazem por meio de um equilíbrio de interações atrativas e repulsivas. Essas interações são geralmente fracas e não covalentes (interações de van der Waals e Coulomb, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio)
3. *Reversibilidade*. A associação na automontagem é reversível permite que os componentes ajustem suas posições dentro de um agregado depois de formado. A força das ligações entre os componentes, portanto, deve ser comparável às forças que tendem a rompê-los.
4. *Ambiente*. A automontagem de moléculas normalmente ocorre numa interface que permite o movimento necessário dos componentes. A interação dos componentes com seu ambiente pode influenciar fortemente o curso do processo. Transporte de massa e agitação. Para que a automontagem ocorra, as moléculas devem ser móveis.

Todos os elementos da supramolecularidade relatados anteriormente se aplicam à estrutura das SH. O grupo de pesquisa de sistemas supramoleculares húmicos no meio ambiente de Piccolo e col enunciaram que o modelo supramolecular constitui um entendimento mais avançado sobre como as moléculas orgânicas interagem no solo (SUPRAHUMIC, 2021). Para comprovar a organização supraestructural das SH, Piccolo e col desenvolveram uma metodologia de isolamento e caracterização denominada como humeômica (NEBBIOSO, A., e PICCOLO, A. 2012; DROSOS et al., 2018).

Humeomics é um fracionamento químico sequencial que aplica extração utilizando solvente orgânico, transesterificação com trifluoreto de boro em metanol, hidrólise alcalina metanólica e clivagem de ligações éter e glicosídicas com HI. A técnica fornece informações estruturais sobre classes de compostos que compõem o húmus do solo. Assim, a humeômica, funciona como uma ferramenta analítica que desdobra a complexidade dos compostos húmicos do solo (Figura 1).

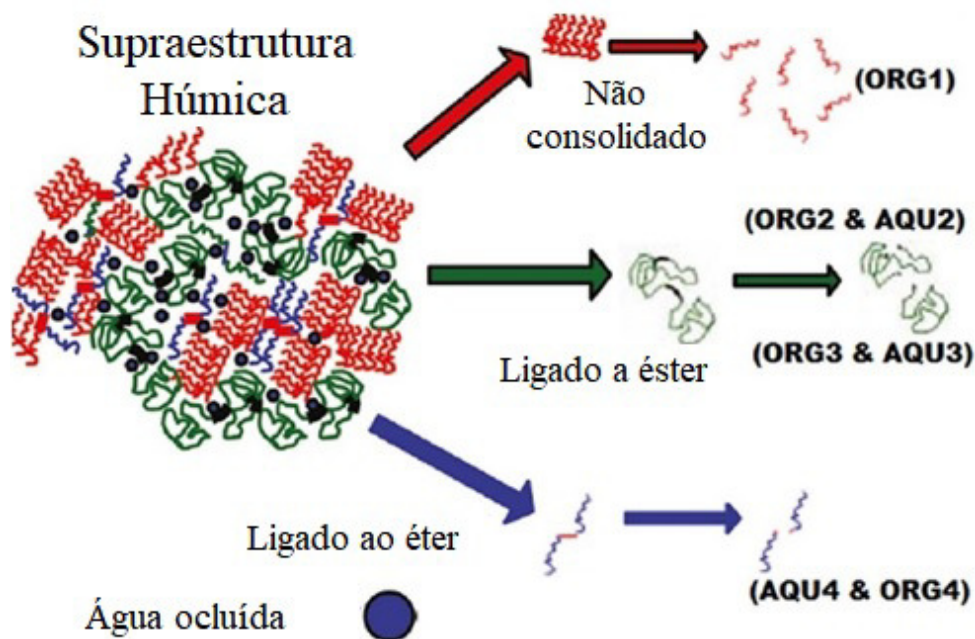


Figura 1. Esquema que representa o processo de humeomica para estudar a estrutura da SH a partir do modelo da supramolecularidade. Fonte: Adaptado de Drosos et al. (2018).

Outros grupos de estudos também têm encontrado evidência de supramolecularidade na estrutura das SH. Autores como Wells (2019) relatam que as SH possuem uma estrutura baseada em associações supraestruturais consistentes com uma organização tipo hidrogéis onde há uma interação forte por interações semelhantes às covalentes de partículas de tamanho menor e igual a 1 μm de diâmetro e que são encapsuladas por outras estruturas tipo hidrogel polidispersas que interagem mediante forças intermoleculares fracas não covalentes (van der Waals, ligação de hidrogênio fraca, efeitos iônicos) de tamanho superior a 1 mm de diâmetro.

A compreensão da supramolecularidade húmica tem ganhado importância desde a década de 2000. Em Wells e Stretz (2019), se relata como a partir do entendimento das características e interações das moléculas orgânicas no solo, é possível que haja um nível de orientação espacial e uma elevada capacidade de interação apenas tendo em conta as ligações de hidrogênio. Estes tipos de interações estariam amplamente favorecidas no solo pela quantidade de compostos depositados e a elevada diversidade de grupamentos hidroxilas de diferentes naturezas química. Essas ligações e interações de hidrogênio apresentam diferentes formas e forças de ligações e por tanto diversifica as possibilidades para a automontagem (Figura 2).

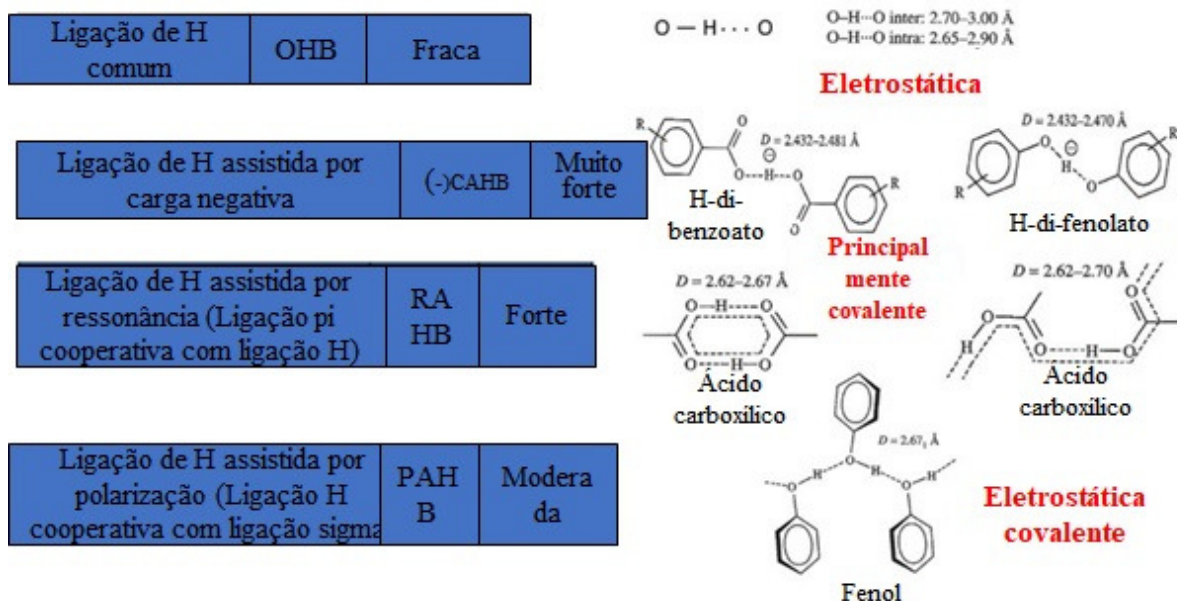


Figura 2. Classificação das ligações de H. Possibilidades de ligação de hidrogênio intermoleculares mais representativas e relevantes para a MOS. Fonte: Adaptado de Wells e Stretz, (2019).

Unido ao anteriormente exposto, os trabalhos desenvolvidos por Fischer (2017) também provaram que as SH em solo nativo são espacialmente organizadas em ordem decrescente de polaridade, o que significa que subunidades supramoleculares altamente polares protegem subunidades menos polares contra a solução de solo livre e formam camadas de polaridade descendente.

2.3 O Processo de Humificação

A humificação é o processo mediante o qual a matéria orgânica do solo se transforma em substâncias húmicas (HAYES e SWIFT 2020). Em Lehmann e Kleber (2015) se critica a capacidade de formação no solo de SH mediante qualquer processo de humificação que dê lugar por meio de síntese secundária compreendendo minerais e enzimas.

Neste sentido, os estudos de De Nobili et al. (2020), mostram que as reações abióticas espontâneas e catalisadas enzimaticamente de componentes de resíduos orgânicos e de seus produtos de decomposição oxidativa sugeridas por estudos do estado da arte são de fato aquelas propostas pela maioria das descrições clássicas de humificação. Estes autores mostram que no solo é possível ocorrer uma oxidação direta e mediada de guaiacol por lacase de cepas de fungos e bactérias selecionadas do solo. Os radicais fenoxi podem produzir derivados quinonoides ou sofrer ataque nucleofílico por um radical semelhante produtor de dímeros, oligômeros e polímeros marrons (Figura 3).

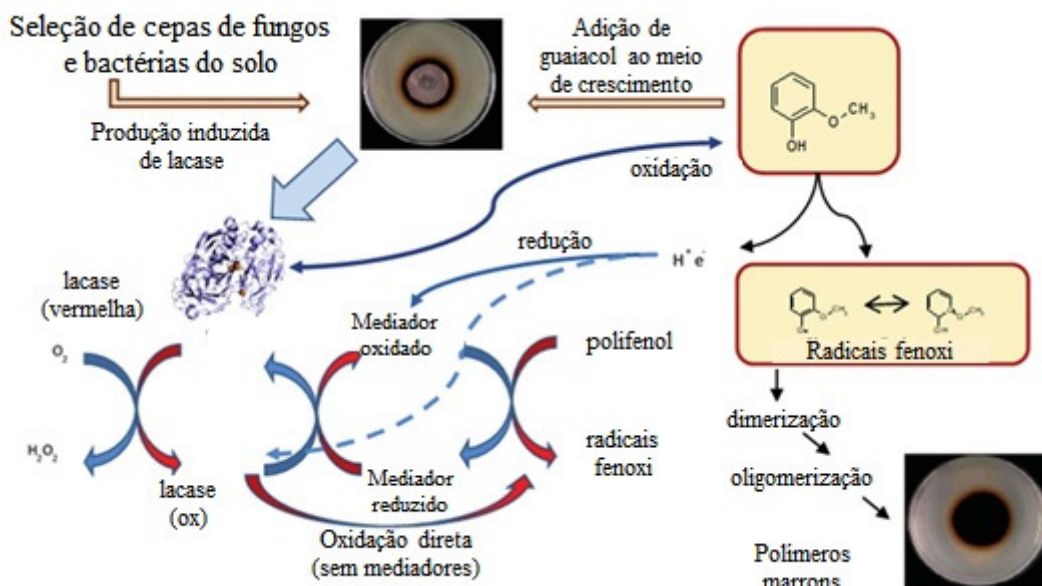


Figura 3. Formação de compostos polimerizados no solo a partir de ação enzimática. Fonte: Adaptado de De Nobili et al. (2020).

Em condições naturais do solo, também é possível encontrar a formação de composto poliméricos e oligoméricos diferentes em composição e estrutura daqueles que lhe deram origem. Estes compostos originados não estavam originalmente presentes em células vivas e não se correspondem a nenhum metabólito vegetal conhecido e por sua vez, podem até reagir ainda mais com outros produtos intermediários de decomposição. Esses compostos, de fato, possuem todas as características químicas descritas pelas visões clássicas de SH. Um exemplo é a ação das peroxidases de manganês (MnP) em fungos que agem acoplada à da fenoloxidase para produzir SH (DE NOBILI et al., 2020) (Figura 4).

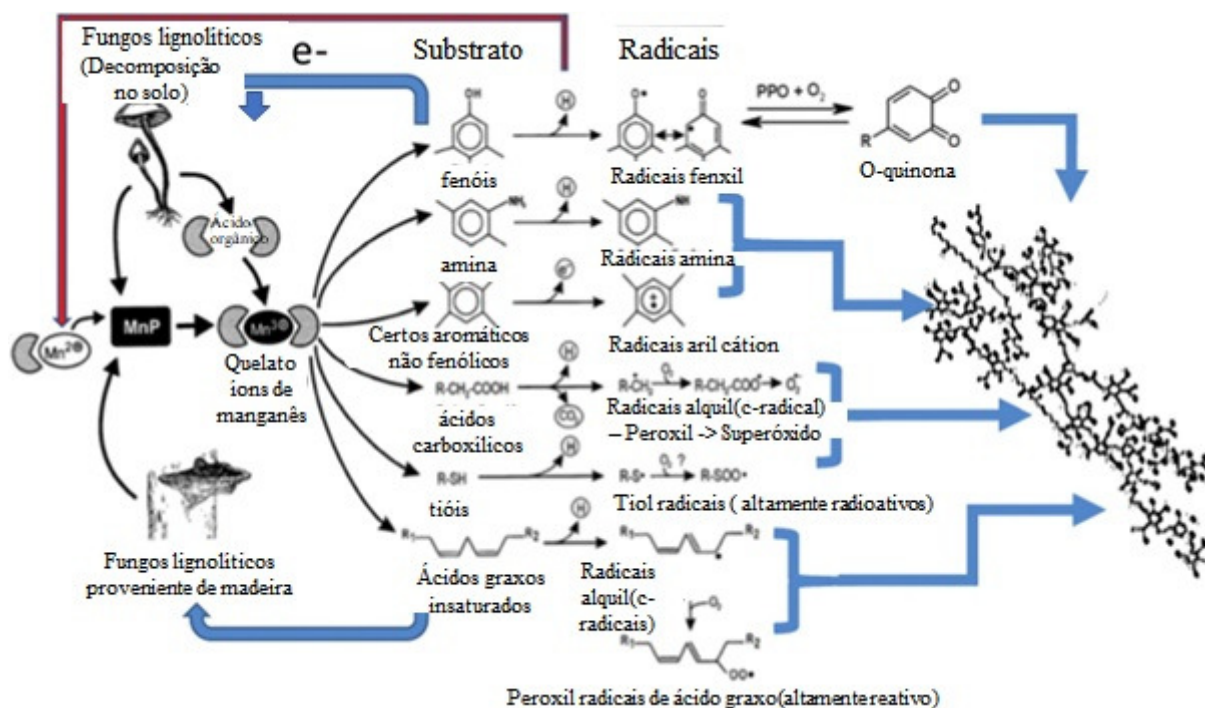


Figura 4. Formação de oligômeros no solo a partir de ação enzimática sintetizadas por fungos. Fonte: Adaptado de De Nobili et al. (2020).

Quando se conhecem as possibilidades de interações das moléculas orgânicas no solo, assim como a existência das sínteses secundária de compostos mais complexos e diferentes é possível entender a composição das SH. Nesse sentido, todos esses processos, em seu conjunto compõem o processo de humificação e as SH formadas possuem uma diversidade que responde a um conjunto de conhecidas moléculas interagindo entre si, como mostrado na figura 5.

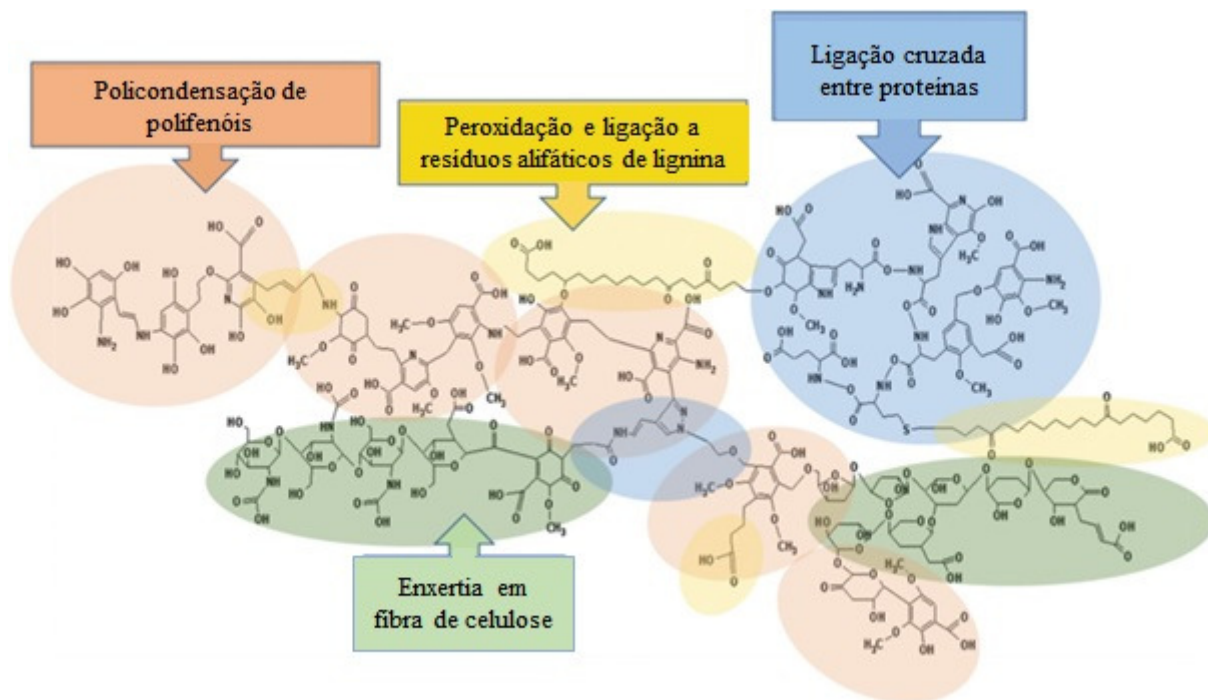


Figura 5. Estrutura macromolecular proposta para os AH. Fonte: Adaptado de De Nobili et al. (2020).

Outra questão criticada no processo de humificação consiste na necessidade dos microrganismos para sintetizar moléculas tão complexas (LEHMANN e KLEBER, 2015). Com o objetivo de mostrar as inúmeras possibilidades de sínteses secundárias que levam à formação de SH, é possível obter na literatura na literatura uma série de mecanismos de sínteses secundária que não precisa de requerimentos energéticos. É possível então entender que a formação de SH ou precursoras das mesmas podem ser sintetizadas a partir da presença feniloxidase ou peroxidase onde, além disso, condições alcalinas de sínteses podem ser encontradas no intestino da pedofauna (SCHNITZER e MONREAL, 2011).

Estes mecanismos foram relatados em Schnitzer e Monreal (2011) onde se expõe a capacidade dos microrganismos e de transformação enzimática para a humificação de compostos orgânicos simples como os ácidos orgânicos, aminoácidos em moléculas de policetídeos (PK) grandes, complexas e diversas com estruturas alquilaromáticas, poli aromáticas e polifenólicas. Este processo biótico é consistente com o segundo estágio de humificação da MOS, ou seja, síntese de moléculas orgânicas complexas do solo (Figura 6).

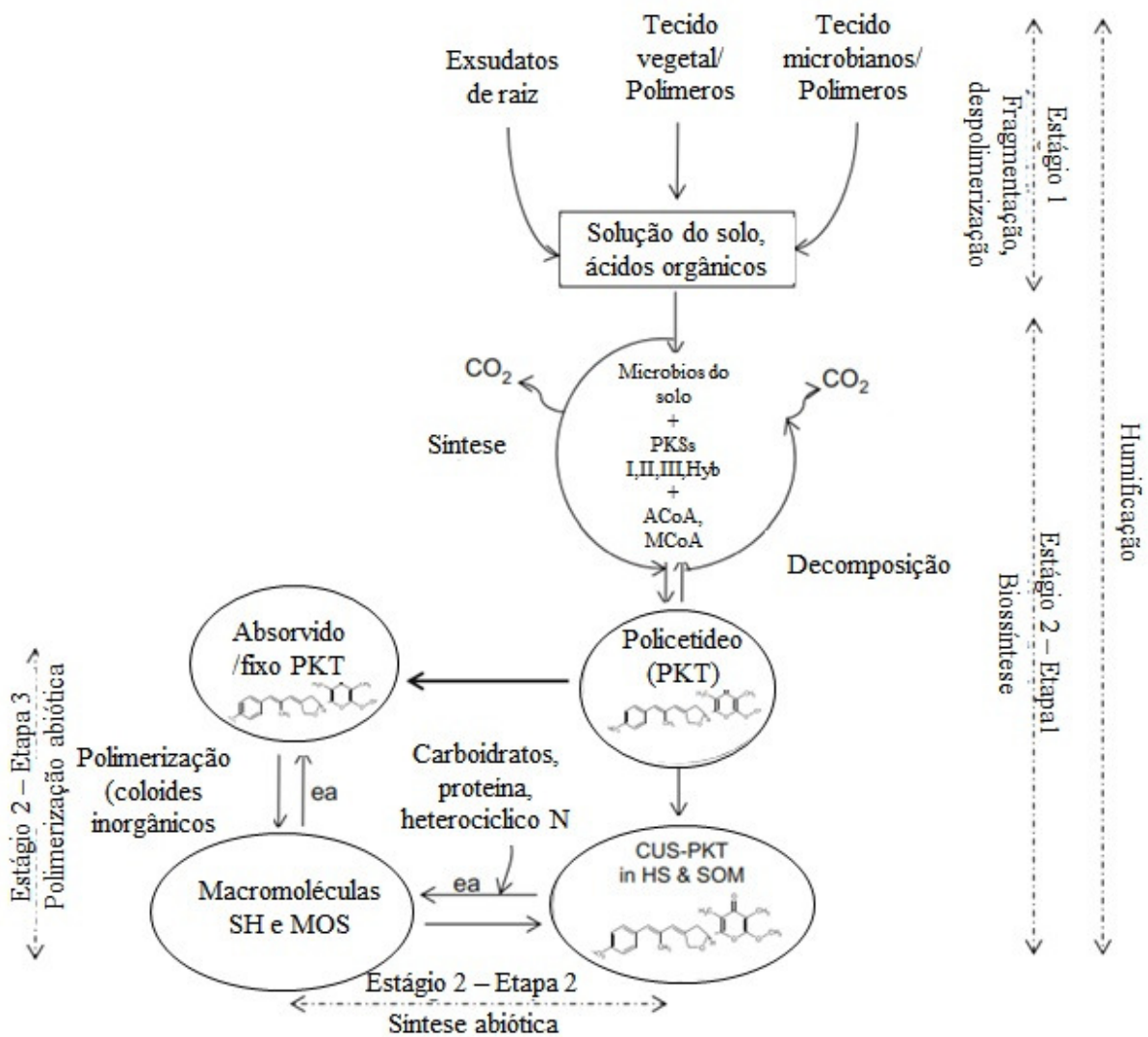


Figura 6. Vias que envolvem os processos bióticos e abióticos de humificação de oxoácidos em PK em solos. Fonte: Adaptado de Schnitzer e Monreal (2011).

Ainda voltando à visão supraestrutural das SH, Piccolo et al. (2018) enunciaram que a humificação consiste em uma segregação inicial progressiva da solução aquosa do solo dos compostos hidrofóbicos pouco solúveis derivados da transformação biótica e abiótica de biomoléculas liberadas por células mortas. Esses compostos altamente hidrofóbicos, como C-alquil e C aromático, são então adsorvidos na grande área superficial de minerais finos de aluminossilicato mediante forças dispersivas fracas. A afinidade mútua com outras moléculas hidrofóbicas na solução do solo promove a adsorção progressiva de multicamadas de carbono orgânico hidrofóbicos para os agregados do solo. O acúmulo e persistência a longo prazo são responsáveis pela proteção que exclui a água e os micróbios que a acompanham (Figura 7).

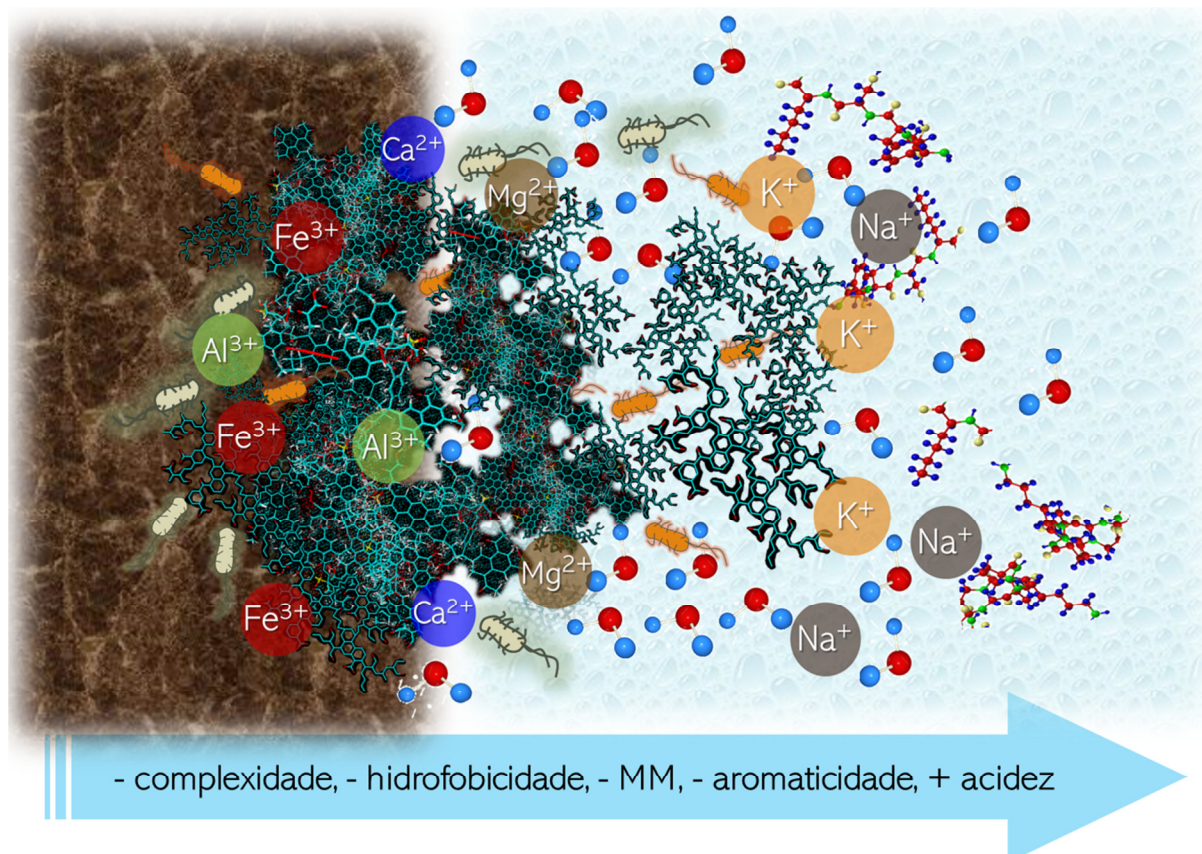


Figura 7. Esquema representado de maneira hipotética a dinâmica dos compostos orgânicos no solo em função das interações supramoleculares. Região azulada representa a solução do solo e a região marrom representa a fração sólida do solo. As representações estruturais mais densas (mais hidrofóbicas) aparecem associadas à fração sólida do solo representando a formação de supramoléculas. A seguir uma região menos densa (mais hidrofílica) em estrutura que representa compostos mais simples, e não necessariamente humificados em interação com a solução do solo. A figura também reconhece a presença de elementos metálicos e microrganismos como parte do sistema. A flecha azul expressa a ordem de formação em relação às propriedades das estruturas formadas. Fonte: Andrés Calderín García, notas da disciplina de química da matéria orgânica do solo.

2.4 Uso de Técnica Espectroscópicas em Estado Sólido ^{13}C NMR CP MAS para Caracterização das Substâncias Húmicas

O ^{13}C NMR em estado sólido constitui um dos métodos de RMN mais utilizados para caracterizar a MOS. O RMN em estado sólido é uma técnica não destrutiva que permite a aquisição dos espectros em amostras inteiras de solo e ao mesmo tempo, utiliza pequenas quantidades (100–200 mg) de amostra. Esta técnica é possível de ser utilizada ainda nos casos em que o solo é pobre em carbono ou contém íons paramagnéticos. Essa dificuldade pode ser resolvida mediante o pré-tratamento com ácido fluorídrico e ácido clorídrico, desta forma se melhora a relação sinal-ruído e reduz o número de varreduras necessárias para obter espectros de boa qualidade. Tanto a polarização direta (DP) quanto à polarização cruzada (CP) com rotação de ângulo mágico (MAS) são amplamente utilizadas, no entanto, a aquisição de RMN CP-MAS é preferida por causa dos tempos de decaimento mais curtos que permitem que o

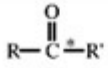
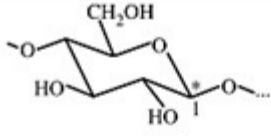
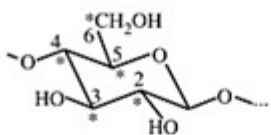
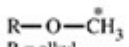
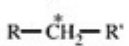
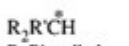
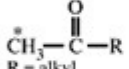
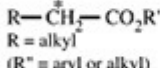
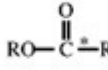

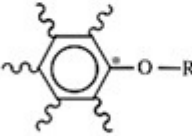
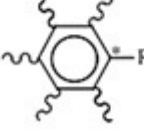
espectro seja adquirido mais rapidamente (SIMPSON e SIMPSON, 2016). Os sinais detectados mediante esta técnica na MOS podem ser resumidos como mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Variações de deslocamento químico ^{13}C típicas para constituintes encontrados na MOS. Fonte: Simpson & Simpson (2016).

Mudança Química (ppm)	Estrutura do carbono	Componente
0-45	Compostos alifáticos não substituídos com O ou N. Metileno ramificado (35-45 ppm), carbono de metileno de cadeia linear (30-34 ppm) e grupos metil terminais (15 ppm).	Lipídios, cadeias laterais de aminoácidos encontrados em proteínas e cadeias laterais encontradas em biopolímeros, como lignina, cutina, suberina e taninos. CH_2 de cadeia reta de cadeias de polimetileno encontradas na cutina
45-65	Carbono alifático substituído com O ou N, em aminoácidos (50-55 ppm) e grupos metoxil (56 ppm)	Aminoácidos, celulose / hemicelulose e lignina (metoxil carbono)
65-95	Carbono <i>O</i> -substituído, carbonos do anel aromático em carboidratos e carbonos em éteres	Açúcares e celulose / hemicelulose
95-110	Carbono alifático substituído por <i>di</i> -oxigênio e carbono anomérico em carboidratos (105 ppm)	Açúcares e celulose / hemicelulose
110-145	Carbono aromáticos	Alguns aminoácidos, lignina, suberina, carvão / biochar
145-160	Carbono fenólico	Lignina, suberina
160-190	Carboxila, amida e carbono de éster	Uma gama de componentes, incluindo aminoácidos / proteínas, ácidos graxos (tanto moléculas pequenas quanto aquelas encontradas em biopolímeros) e lipídios ligados a ésteres
180-220	Carbono carbonílico	Uma gama de componentes, incluindo lignina, aminoácidos / proteínas e produtos de degradação

A partir da caracterização da MOS, especificamente das frações como os AH, AF e Hu é possível identificar os grupos funcionais contendo carbono em cada estrutura. As técnicas e os aparelhos permitem definir e assinalar os carbonos presentes em cada posição dos fragmentos estruturais. Nos trabalhos publicados por Keeler et al. (2006) várias funcionalidades estruturais foram identificadas, tais quais lipídios, carboidratos, aromáticos, polipeptídeos e carbonil/carboxil. Dentre as frações húmicas, constatou-se que as concentrações de lipídios estão na ordem ácido húmico > ácido fúlvico = humina; para carboidratos, ácido fúlvico > humina > ácido húmico; para carbonos aromáticos, ácido húmico > humina > ácido fúlvico; para polipeptídeos ácido húmico > ácido fúlvico > humina e para espécies carbonil/carboxil é humina > ácido húmico > ácido fúlvico, mas as diferenças são pequenas. No quadro 1 a seguir se mostra uma caracterização detalhada dos tipos de carbonos em cada estrutura.

Quadro 1. Mudança química para as regiões mais importantes identificadas mediante ^{13}C NMR CP MAS. Fonte: Compilado adaptado de Autor desconhecido (Lindeman e Adans, 1971; Pouchert et al., 1993; Preston, 1992; Silverstein et al., 1991; Watanabe et al., 1989; Cavanaugh, 1996).

No. in Fig. 2	Estrutura	^{13}C Mudança química (ppm) ^a	No. in Fig. 2	Estrutura	^{13}C Mudança química (ppm) ^a
I			V		(1) 105
A	R, R' = alkyl	210	VI		(2) 73 (3) 76 (4) 88 (5) 75 (6) 64
B	R, R' = aryl	197	VII		58 54
C	R = alkyl, R' = aryl	198	VIII		31 42 36
E	R = H, R' = alkyl	203	IX		41 26 58
G	R = H, R' = aryl	192	X		31 26
I	Polypeptide backbone	175	XI		34 41
II			XII		10-25 ^b 21
A	R, R' = alkyl	171	A	R = alkyl	
B	R, R' = aryl	165	B	R = aryl	
C	R = alkyl, R' = aryl	167			
D	R = aryl, R' = alkyl	169			
E	R = H, R' = alkyl	181			
F	R = M ^{m+} , R' = alkyl	187			
G	R = H, R' = aryl	173			
H	R = M ^{m+} , R' = aryl	179			
III					
A	R = alkyl	160			
B	R = aryl	158			
E	R = H	155			
F	R = M ^{m+}	169			
IV					
AA	R = alkyl	145			
BB	R = aryl	141			
CC	R = H	129			

^a Chemical shifts are a summary of those reported in the literature (Lindeman and Adams, 1971; Pouchert et al., 1993; Preston, 1992; Silverstein et al., 1991; Watanabe et al., 1989; Cavanaugh, 1996).

^b Depending on chain structure and length.

Uma questão importante também está relacionada com o padrão espectral das SH. Um exame visual dos espectros dos AH extraídos de diferentes fontes mostra que a quantidade de estruturas presentes é o fator que mais diferencia os compostos húmicos. Isto porque os espectros apresentam em geral picos nas regiões definidas e discutidas na tabela 1. A figura 8 mostra a presença e a forma dos picos predominantes em uma amostra padrão de AH (GARCÍA et al., 2019).

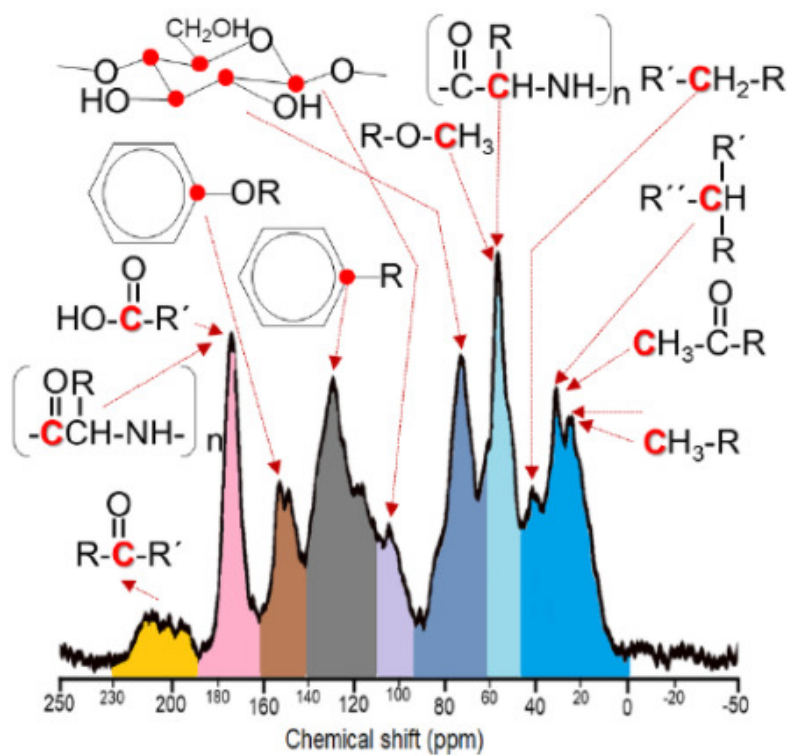


Figura 8. Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C de um ácido húmico característico extraído de um solo orgânico no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: García et al. (2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos AH

Os AH utilizados neste estudo foram obtidos a partir do banco de espectros de SH pertencentes ao Laboratório de Química Biológica do Solo (LQBS). Este banco de espectros tem sido enriquecido periodicamente com espectros das SH e suas frações caracterizadas durante a trajetória de pesquisa do laboratório assim como dos trabalhos em colaboração com outros laboratórios. Os espectros utilizados neste estudo foram todos obtidos sob as mesmas condições experimentais em um aparelho de ressonância magnética nuclear, localizado no Centro de Análises Químicas do Instituto de Química da (UFRRJ).

Os espectros dos AH provenientes de amostras de Organossolo, aparecem descritos em García et al., (2016). Os espectros dos AH extraídos de amostras de Latossolo foram previamente publicados em Assunção et al. (2019). Os espectros utilizados dos AH isolados de amostras de Planossolo arenoso estão descritos em Gomes et al. (2018). Os espectros dos AH obtidos de Cambissolo e Chernossolo estão descritos em Vioratti (2020). Os AH extraídos de amostras de solos de Cuba, classificados como Ferralíticos rojos, foram obtidos na região pertencentes à província de Artemisa e pertencem ao acervo do LQBS. Os espectros dos AH obtidos a partir do processo de vermicompostagem (VC) estão caracterizados de acordo com García et al., (2016).

Tabela 2. Características dos solos utilizados no estudo.

Fonte: García et al. (2016), Gomes et al. (2018), Assunção et al. (2019) e Vioratti (2020).

Identificação	AH - Origem	Localização Município/Estado	Uso	Profundidade da camada	Drenagem	Textura do Solo
Organossolo	García et al., (2016)	Santa Cruz/Rio de Janeiro	-	Horizonte Hístico	-	-
Latossolo	Assunção et al. (2019)	Guaíra/ Paraná	Safras de aveia inverno e verão	de 0-0,05; 0,05 – 0,10; 0,10 – 0,20 m	Bem drenado	Muito argilosa
Planossolo	Gomes et al. (2018)	Seropédica/ Rio de Janeiro	Manejo grama	de 0,00 – 0,20 cm	Boa drenagem	Arenoso
Cambissolo	Vioratti (2020)	Pinheiral/ Rio de Janeiro	Pastagem com colônia (<i>Panicum maximum</i> Jacq.)	A moderado	Bem drenados	Argilo-arenoso
Chernossolo	Vioratti (2020)	Pinheiral/ Rio de Janeiro	Pastagem com braquiária (<i>Urochloa decumbes</i> Stapf.)	A chernozêmico	Bem drenados	-
Ferralítico Rojo	Acervo do LQBS	Artemisa/Cuba	-	-	-	-

3.2 Isolamento e Purificação dos AH Utilizados Neste Estudo

Todos os AH foram isolados e purificados seguindo a metodologia proposta pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS: sigla em inglês) e de acordo com o protocolo metodológico descrito por Swift (1996), em condições padronizadas para todos os estudos. Para a obtenção dos AH a partir das amostras de solos coletadas, foi feito um pré-tratamento inicial com HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) objetivando a eliminação dos sais solúveis. Em seguida, uma lavagem com KOH ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foi realizada para diminuição do pH próximo à neutralidade. Posteriormente, a extração do húmus foi realizada com a adição de uma dissolução de KOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) à uma massa de amostra de solo em proporções de 10:1 (v:m) sob atmosfera de N_2 e a mistura mantida em agitação mecânica durante 24 h. Após este procedimento, foram necessárias mais ou menos umas três horas para que a mistura fosse mantida em repouso, logo, foi feito a retirada e separação do sobrenadante (húmus líquidos) e da fração sólida (fração húmica impura). Posteriormente o húmus líquido foi centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos e recolhido o sobrenadante o qual contém as frações de substâncias húmicas dissolvidas correspondentes aos AH e aos AF.

Foi realizada a separação das frações húmicas dissolvidas (AH e AF) por meio de precipitação dos AH. Com isso o pH do húmus líquido foi ajustado (AF+AH) até o valor de 2.0 por gotejamento de uma dissolução de HCl (6.0 mol. L^{-1}) e assim mantido em repouso durante 16 horas. Através deste procedimento, os AH que são insolúveis a pH inferior a 2.0 precipitaram, enquanto os AF se mantiveram dissolvidos. Logo para a obtenção dos AH, a mistura foi centrifugada a 5.000 g por 10 min e o sobrenadante foi vertido, e logo este processo de centrifugação foi repetido por três vezes.

Os AH foram purificados mediante adição de uma dissolução de HF ($0,3 \text{ mol. L}^{-1}$) + HCl ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) e agitação por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante de cada processo foi descartado e os AH lavados com abundante água. Em sequência, os AH foram redissolvidos em uma dissolução de KOH ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) e logo adicionada uma solução de KCl ($0,3 \text{ mol. L}^{-1}$). Após este procedimento o material foi levado para centrífuga e então centrifugado a 4.000 g durante 15 min e o sólido precipitado descartado. A seguir, os AH foram reconstituídos pela precipitação por meio de diminuição do pH mediante adição de HCl (6.0 mol. L^{-1}). Logo, os AH foram dialisados utilizando água deionizada e membrana SPECTRA/POR[®] 7 dialysis tubing, 1 kD, até a condutividade elétrica da água deionizada não apresentar valores superiores a $1 \mu\text{S}$ e até teste negativo para íons Cl^- com AgNO_3 . Ao término deste processo, os AH foram congelados em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente liofilizados.

3.3 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido do Isótopo do ^{13}C em Polarização Cruzada e Rotação no Ângulo Mágico (CP MAS ^{13}C -NMR)

Todos os espectros dos AH foram obtidos nas mesmas condições experimentais com a utilização da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) em estado sólido. Para isto, lançou-se mão de técnicas adicionais consistentes em polarização cruzada (CP) e rotação no ângulo mágico (MAS). A análise de CP MAS ^{13}C -NMR foi realizada em um aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz, equipado com probe de 4 mm Narrow MAS e operando em sequência de ressonância de ^{13}C a 100.163 MHz. Para a obtenção dos espectros, massas iguais das amostras dos AH foram colocadas em um rotor (porta-amostra) de Dióxido de zircônio (ZrO_2) com tampas de Kel-F sendo a frequência de giro de $8 \pm 1 \text{ kHz}$. Os espectros foram obtidos pela coleta de 3000 data points para o mesmo número de scans a um tempo de aquisição de 34 ms e com recycle delay de 5s. O tempo de contato para a sequência em rampa de ^1H ramp foi de 2 ms. A coleta e a elaboração espectral foram realizadas utilizando o

Software Bruker Topspin 2.1. Os decaimentos livres de indução (DLI) foram transformados aplicando um zero filling igual a 4 k e posteriormente um ajuste por função exponencial (line broadening) de 70 Hz.

Para que o trabalho fosse realizado foi utilizado o Software ACD/Labs v.12.01 (Freeware Academic Edition). No total, oitenta espectros foram trabalhados, de forma padronizada, isto é, todo o trabalho em software foi igualmente introduzido em cada espectro por igual. Inicialmente os espectros foram submetidos à correção da linha base, tomando como referência o zero e início (0 ppm) e final (230 ppm) utilizando a ferramenta “set point”. O algoritmo “smoothing” foi utilizado em todos os espectros com o objetivo de reduzir o ruído e aumentar a relação sinal ruído. Para tanto, o “smoothing” foi realizado em polinomial de 5to grau tomando como referência o espectro de menor relação sinal ruído. Então, os espectros foram salvos em formato ACD spectrum (*.esp) e em JCAMP (*.jdx; *.dx).

Trabalhados e salvos como *.esp os espectros foram então divididos por regiões, sendo estas regiões assinaladas em função do tipo do carbono característico e de seu deslocamento químico (ppm), utilizando a ferramenta “PeakPicking”. As regiões então foram integradas para a obtenção da quantidade relativa de estruturas em função da área total do espectro, utilizando a ferramenta “integration manual”. As regiões integradas foram as seguintes: Carbonos alquílicos não funcionalizados ($C_{Alquil-H,R}$): 0–45 ppm; C-metoxilas e N–alquil-C ($C_{Alquil-O,N}$): 45–60 ppm; O–alquil C ($C_{Alquil-O}$): 60–90 ppm; di–O–alquil C (carbono anoméricos) ($C_{Alquil-di-O}$): 90–110 ppm; carbono aromático ($C_{Aromático-H,R}$): 110–140 ppm; O,N–aromático C ($C_{Aromático-O,N}$): 140–160 ppm; carboxila C ($C_{COO-H,R}$): 160–185 ppm e carbonilas C ($C_{C=O}$): 185–230 ppm. O índice de aromaticidade foi calculado segundo a fórmula: $(C_{Aromático-H,R} + C_{Aromático-O,N}) * 100 / \text{área total}$ e o índice de alifaticidade foi calculado como: $100 - \text{aromaticidade} (\%)$. O índice de hidrofobicidade (HB/HI) foi calculado como segue: $(0 \text{ ppm}-46 \text{ ppm}) + (110 \text{ ppm}-156 \text{ ppm}) / (46 \text{ ppm}-110 \text{ ppm}) + (156 \text{ ppm}-186 \text{ ppm})$ (SONG et al. 2008).

3.4 Aplicação de Técnicas Estatísticas aos Dados Espectrais por Meio de Análises Quimiométricas

3.4.1 Carregamento dos dados espectrais

O Software The Unscrambler (version 10.4) (Camo Software AS, Nedre Vollgate 8, Oslo, Norway) foi utilizado para a realização de todo o trabalho quimiométrico.

Os espectros de ^{13}C NMR CP MAS foram carregados mediante “import data” dos arquivos espectrais salvos na forma de JCAMP.

3.4.2 Análises quimiométricas a partir dos dados espectrais ^{13}C -NMR CP MAS

Foi gerado com o carregamento dos espectros ^{13}C -NMR CP MAS uma matriz inicial de samples: variable (80 x 4096). A matriz ^{13}C -NMR CP MAS foi submetida a plotagem de linha para inspeção visual e, posteriormente, a matriz foi transformada mediante “normalization”, “smoothing” e correção da linha base (baseline correction-baseline offset-linear baseline correction).

Mediante a ferramenta matriz de cor “matrix plot”, a matriz transformada foi submetida à plotagem. Objetivando a obtenção dos espectros médios, a ferramenta utilizada foi à estatística descritiva “descriptive analyses” e então a matriz “results” foi acessada para

plotagem na forma de linha da média obtida na análise. A matriz correspondente aos espectros médios para cada classe de solo foi então acrescentada à matriz original para análises multivariadas dos dados. Os gráficos de quartilhes foram utilizados para mostrar as maiores variabilidades das regiões dos espectros e um zoom foi aplicado nestas regiões para melhor mostrar os gráficos “box-plot”.

A matriz normalizada foi utilizada para realizar as análises de componentes principais (PCA). O modelo adotado para a PCA utilizou um total de sete componentes, identificação automática de outliers e data centralizada 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.

As análises de curva de resolução multivariada (MCR) foram realizadas para decompor a matriz complexa dos espectros ^{13}C -NMR CP MAS, uma vez que o modelo de PCA 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 são obtidas mediante estas análises, uma matriz correspondente 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.

Para obtenção dos espectros médios, a ferramenta utilizada foi à estatística descritiva “descriptive analyses” e então a matriz “results” acessada para plotagem na forma de linha da média obtida na análise.

Os testes estatísticos de comparação de médias entre as classes de solos foram realizados para todos os tipos de estrutura presentes na matriz original correspondente às quantidades relativas de cada tipo de carbono. Para isto, a ferramenta “statistical test” foi acionada e inicialmente foi realizado um teste de normalidade para cada tipo de carbono mediante o método de Kolmogorov-Smirnov normality test a 5% de nível de confiança. Após confirmação da normalidade dos dados foi verificada a equivalência da variância (equality of variance) mediante o teste de “Bartlett's test”. Em seguida as médias foram comparadas mediante Student's t test para variâncias iguais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padrões Estruturais dos AH no Contexto Atual Sobre a Identidade das SH e o Processo de Humificação

O que distingue as SH do resto dos componentes orgânicos do solo é a sua complexidade estrutural (GARCÍA et al., 2019). A complexidade estrutural das SH responde às características específicas que são impressas na sua composição durante o processo de humificação pelo qual cada uma dessas substâncias transitou até a sua formação. Neste estudo, uma interpretação da complexidade estrutural das SH será realizada em função do entendimento de uma organização supraestrutural como enunciada por Piccolo et al. (1996, 2002, 2011, 2012).

Há razões para entender que as características composicionais, organizacionais e conformacionais das SH se correspondem com uma estrutura supramolecular. Autores como Wells (2019) tem relatado as características químicas e físicas das supramoléculas húmicas em termos termodinâmicos. O entendimento da supramolecularidade como base química tem como pressuposto de que nesse sistema coexistem em simultâneo as características *composicionais*: quantidade de moléculas que compõe o sistema, as *constitucionais*: número de moléculas por cada estrutura supramolecular, as de *configuração*: orientação de moléculas vizinhas sobre uma dada molécula em um espaço tridimensional e as de *conformação*: forma global instantânea de uma estrutura supramolecular no espaço tridimensional.

Essas características supramoleculares estão presentes nas SH e essa compreensão passa pelo entendimento da humificação, processo mediante o qual as SH se formam. O entendimento mais moderno do processo de humificação indica que a estrutura das moléculas que são depositadas nos solos domina a dinâmica do carbono orgânico, isto é, suas interações com os outros componentes do solo, seu estoque e emissão de gases. As SH por tanto, se formam a partir do depósito das diferentes moléculas que são naturalmente distribuídas no solo em função das propriedades químicas como a hidrofobicidade, polaridade, onde, os fragmentos mais hidrofóbicos serão termodinamicamente repelidos da solução do solo e permanecerão em interação na fase sólida. Desta forma, os fragmentos na solução do solo e na fração sólida vão se enriquecendo e aumentando sua complexidade e massa molecular mediante forças de interações fracas como van der Waals, π - π e CH- π e ligações de hidrogênio até chegar a uma supramolécula húmica (NEBIOSSO e PICCOLO, 2012).

Quando entendidos os conceitos anteriores, então se compreende que, a estrutura química das moléculas precedentes e das posteriores SH resultantes, é a responsável por gerar as propriedades químicas da MOS e estas definem as suas funções. Essas propriedades químicas dependem então da composição e configuração estrutural das SH que no solo, são potencializadas pelas condições químicas e físicas presentes. Pelo anteriormente explicado é que na literatura se relata a formação e presença de SH em todos os tipos de solo, porém, elas são diferentes em termos estruturais e em consequências suas propriedades e funções são diferentes. A partir desta linha de raciocínio se desprende então que em cada tipo de solo haverá um processo de humificação específico, dependente das variáveis presente nesse ambiente, tais quais: estrutura das moléculas depositadas, estruturas das SH formadas e das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (HAYES e SWIFT 2020, GARCÍA et al., 2012, OLK et al., 2019).

No entanto, nos últimos anos, uma série de publicações tem apresentado diferenças sobre os processos que dominam a dinâmica do carbono orgânico. Estas publicações têm teorizado sobre os fatores ambientais no solo como os principais reguladores dos fenômenos de estoque e emissão de carbono orgânico (LEHMANN e KLEBER, 2015, 2019). No entanto,

este mesmo grupo de autores vem reconhecendo em publicações mais recentes que a diversidade molecular (estrutura – *na interpretação do autor*-) dos compostos depositados no solo direcionam os fenômenos de transformação e interação da MOS. Ao mesmo, estas diferenças têm sido esclarecidas em várias publicações dos cientistas da química do húmus (HAYES *et al.*, 2018; DENOBILI *et al.*, 2019; OLK *et al.*, 2019; GARCÍA *et al.*, 2019).

4.2 Análises Espectroscópica ^{13}C RMN CP/MAS das Amostras de AH de Solo e Vermicomposto

Em todos os espectros de todos os AH foi observado à presença dos mesmos grupos de compostos: carbonos alifáticos não funcionalizados e carbonos alifáticos funcionalizados, carbonos aromáticos não funcionalizados e funcionalizados, carbonos carboxílicos e carbonos carbonílicos. A assinalação dos espectros por regiões indicando as estruturas do carbono presentes nos AH aparece a seguir:

Tabela 3. Assinalação dos espectros por regiões indicando as estruturas do carbono presentes nos AH. Fonte: O autor

Região /Deslocamento (ppm)	Descrição	Tipo de C	Origem/Sinal (ppm)						
			Cuba (Ferralítico Rojo)	Latossolo	Organossolo	Arenoso (Planossolo)	VC (Vermicomposto)	Chernossolo	Cambissolo
0 - 45	Estruturas alifáticas do tipo C _{alifáticos} – (H,R)	-CH ₃ -R terminais, onde R pode ser um grupo alifático ou aromático.	23.8, 25.18	19.04, 24.9	14.4	25.5	22.7	16.6, 18.9, 21.14, 25.3	
		-CH (R ₂ R-*CH) e metileno R-*CH ₂ -CO ₂ R'', onde R e R'' podem ser grupos alifáticos ou aromáticos	30.7 e 41.4	32.6	32.24	32.96	32.2 e 42.8	29.8	43.8
45 - 60	Estruturas alifáticas funcionalizadas do tipo C _{alifáticos} – (O,N).	Metoxilas (RO-*CH ₃) onde R e R'' podem ser grupos alifáticos ou aromáticos presentes em fragmentos de lignina e Ca de polipeptídeos (-CO-*CHR-NH).	56.4	50.8	55.2	56.1	55.2	55.01	55.6
60 - 90	Estruturas alifáticas funcionalizadas do tipo C _{alifáticos} – O.	-C2 e C6 em monossacarídeos de celulose e hemicelulose.	72.9	-	70.7	72.1	66.6, 69.6 e 71.6	70.7	71.2
90 - 110	Estruturas alifáticas funcionalizadas do tipo C _{alifáticos} – di-O.	Anomericos C1 de celulosas e hemicelulose	104.6	106.4	103.9	106.8	103.1	105.0	-
110 - 140	Estruturas aromáticas não funcionalizadas	-C1(S) de siringil; C2(G), C5(G) e C6(G) em unidades guaiacil;	111.4, 116.3 e 129.3	113.1, 123.9	127.8	116.3, 123.6, 136.9, 142.8	114.8, 128.8	114.5, 116.7, 129.7	114.4, 130.4

	do tipo C _{aromáticos} - (H,R).	C5-C5' em unidades 5-5 de ligninas; C α e C β em sistemas C _{aromáticos} -CH=CH- CH ₂ OH e C β C _{aromáticos} -CH=CH- CHO.								
140 - 160	Estruturas aromáticas não funcionalizadas do tipo C _{aromáticos} - (O,N).	-C1 funcionalizados com grupos éter em unidades G; C4 funcionalizados com grupos éter em unidades G; C3-C3' com funções éter em unidades S.	149.0, 153.0	137.9, 147.2	152.3	152.9, 163.8	147.5, 151.9	153.8	141.8, 151.3	
160 - 185	Estruturas carbonos carboxílicos, ésteres e amidas (C _{COOH} -H,R,N).	-C carboxílicos de fragmentos de hemicelulose e aromáticos	172.5	167.7	170.9	175.9	171.9	172.5	173.0	
185 - 230	Estruturas carbonos carbonílicos, de aldeídos e cetonas (C _{C=O}).	Fragmentos de cetonas e aldeídos	209.2	204.4	205.8	210.0	209.7	206.4	208.4	

A assinalação dos espectros demonstra que independente da origem, os AH são compostos predominantemente por fragmentos de ácidos graxos, peptídeos, celulose, hemicelulose e ligninas (KEELER et al., 2006). Por tanto estes AH no solo, apresentam unidades monoméricas semelhantes, com padrão espectral semelhante. Estas unidades monoméricas são formadas a partir do autoarranjo destes fragmentos como parte do processo de humificação, chegando a adquirir a forma organizacional supraestrutural (NEBIOSSO e PICCOLO, 2012).

Os espectros ^{13}C NMR CP/MAS das amostras de AH analisadas neste estudo contribuem para o debate posto anteriormente na tabela 3. Os espectros mostram que há formação de compostos húmicos, os AH, independente da origem e estes AH possuem um padrão estrutural construído pela presença de fragmentos semelhantes, porém com quantidades relativas diferentes. Estas observações dos AH diferentes mostram que em todas essas fontes ocorreu um processo de humificação específico que levou à formação de uma estrutura única, os AH, diferentes daquelas que lhe deu origem (Figura 9).

As funções, portanto, dos AH no solo se derivam desta forma supraestrutural. Especialmente a supraestrutura, geram as propriedades e estas definem a principal função das SH que é a preservação do carbono orgânico no solo (WELLS, 2019). Essa propriedade é gerada a partir da heterogeneidade estrutural caracterizada na figura 9, onde ligações de hidrogênio entre fragmentos de ácidos benzênicos e fenóis (distâncias de ligações H-H 2.432 Å e 2.481 Å respectivamente) presentes nas estruturas dos AH (WELLS, 2019), além das interações fracas hidrofóbicas (entre cadeias alifáticas, anéis aromáticos, sistema π e CH- π), são o suficientemente fortes para garantir a recalcitrância química, isto é, menor acesso dos microrganismos a essa fonte de carbono e portanto menor taxa de decomposição. Ao mesmo tempo, este autoarranjo supraestrutural que pode responder a um equilíbrio metaestável (WELLS, 2019) ainda pode garantir uma instabilidade química suficiente para garantir, mudanças de pH, força iônica no solo, separação de fragmentos da supraestrutura e a sua eventual substituição por outros de mais jovem incorporação, nisso consiste a compreensão da dinâmica do carbono orgânico do solo na participação das SH no solo.

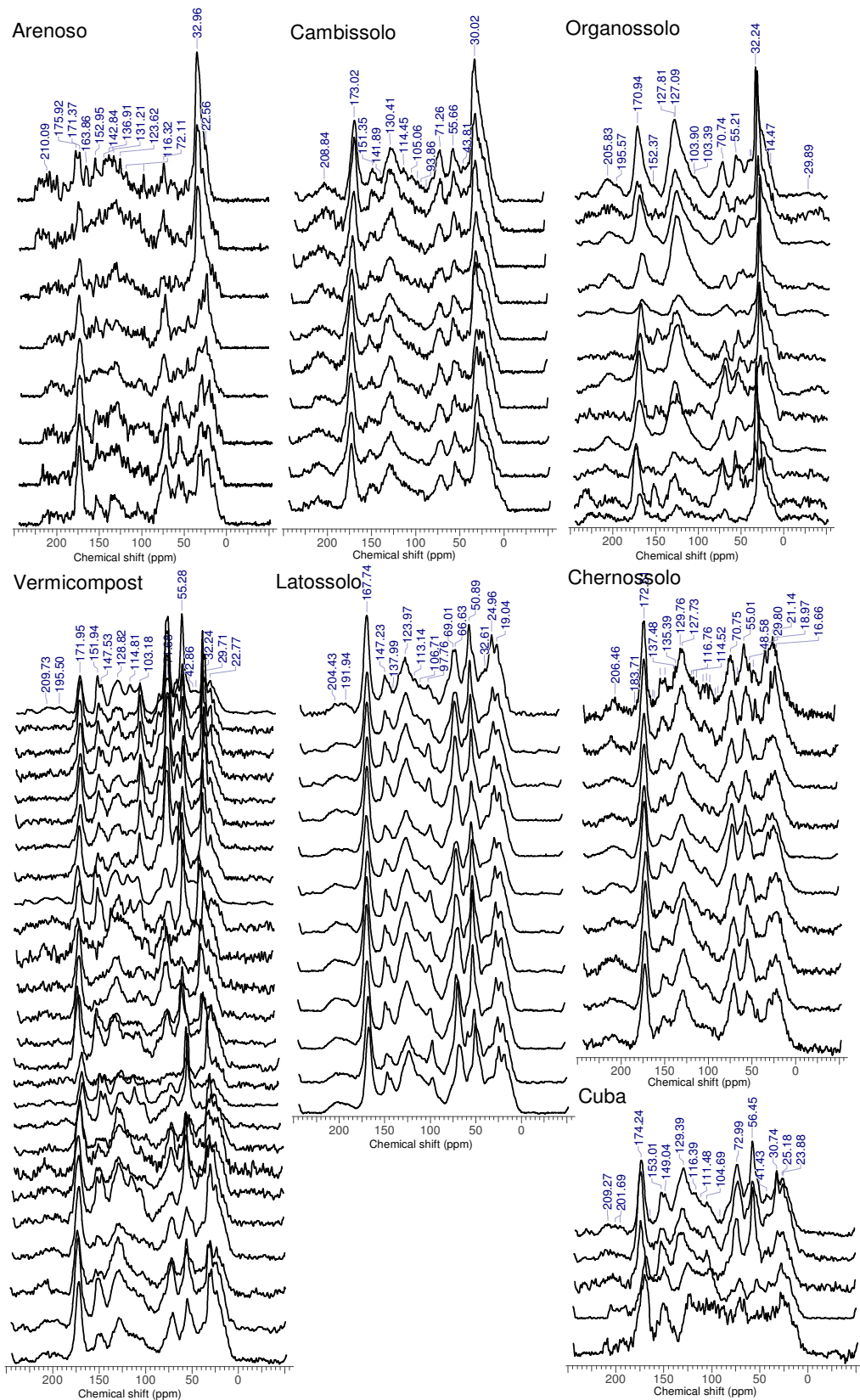


Figura 9. Espectros ^{13}C NMR CP/MAS das amostras de AH isolados de amostras de solo: Planossolo (arenoso), Cambissolo, Organossolo, Latossolo, Chernossolo, Ferralítico Rojo (Cuba) e de Vermicomposto.

4.3 Aplicação da Quimiometria PCA-¹³C NMR CP/MAS

4.3.1 Condição 1. Análises quimiométricas das amostras de AH considerando a inclusão de amostras extremas “outlier”

Esclarecer as diferenças e semelhanças estruturais dos AH, permitirá elucidar com maior profundidade a identidade estrutural destes compostos assim como sua formação mediante o processo de humificação. Para isso, as diferenças espectrais foram analisadas mediante PCA a partir do carregamento dos espectros ¹³C NMR CP/MAS puros. Na figura 10 se mostra os scores na PCA para os AH analisados, alcançando um 51% da variância total explicada, onde a componente PC-1 explicou o 33% da variância e a PC-2 o 18%.

A estrutura das amostras nos scores demonstra que os AH podem se agrupar com independência da natureza do solo, sua classificação e da origem. Houve um agrupamento a valores positivos na PC-1 dos AH formados em solos classificados como orgânicos, planossolo (textura arenosa) e Cambissolo. Por outro lado, a valores negativos da PC-1 se agruparam os AH extraídos dos latossolos, de solos de Cuba e de Chernossolo. Os AH extraídos dos diferentes VC foram agrupados a ambos os lados da PC-1 (Figura 10). Estes resultados reafirmam a ocorrência de um processo de humificação específico em cada tipo de solo para produzir o AH. Isto porque os resultados indicam que o processo de humificação não parece guardar relação direta com os atributos físicos e químicos utilizados na classificação dos solos.

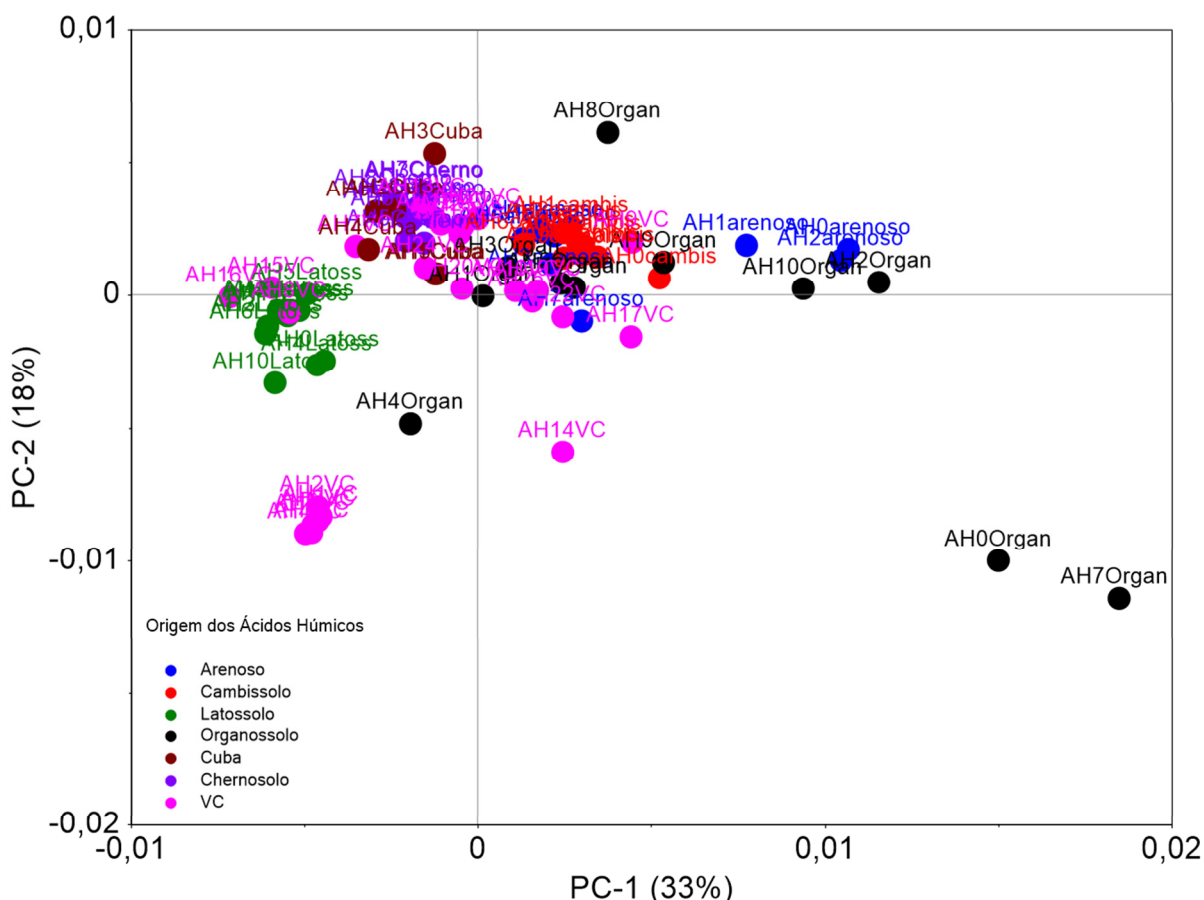


Figura 10. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens considerando os potenciais outlier obtidos teste de *Hotelling-T² ellipse*.

A Figura 11 mostra os loadings da PCA em questão. Os AH agrupados a valores positivos da PC-1 se assemelham pela presença de estruturas $C_{\text{Alkyl}}\text{-(H,R)}$, $C_{\text{Aromatic}}\text{-(H,R)}$ e -COOH , pertencentes a fragmentos de ácidos graxos e ligninas, ambas com propriedades hidrofóbicas e por tanto, recalcitrantes. Por outro lado, os AH agrupados a valores negativos se assemelham pela presença de $C_{\text{Alkyl}}\text{-(O,N)}$, $C_{\text{Alkyl}}\text{-O}$, $C_{\text{Alkyl}}\text{-di-O}$, $C_{\text{Aromatic}}\text{-(O,N)}$, pertencentes a fragmentos peptídicos e ligno-celulosicos (carboidratos e ligninas funcionalizadas) com propriedades menos hidrofóbicas e, portanto, mais lábeis.

Os resultados são especialmente importantes porque novamente comprovam que independentemente do tipo de solo, a incorporação seletiva de fragmentos estruturais sugere um processo em ocorrência que produz e forma os AH, e estes AH formados geram as propriedades da supraestrutura húmica. Com estas 80 amostras de AH foi possível demonstrar como as propriedades semelhantes podem ser produzidas em AH formados em fontes diferentes e definir funções similares. Nesta linha de raciocínio, a dinâmica da MOS parece ser uma função diretamente relacionada com a estrutura das moléculas depositadas no solo, onde as condições ambientais tem papel potencializador, onde de acordo com o ambiente, estas propriedades geradas se expressam com maior ou menor intensidade.

Os loading da PC-2 mostram resultados mais claros sobre as amostras extremas de AH. Os AH de VC (AH3VC, AH4VC e AH5VC) e solo orgânico (AH0organ e AH7organ) se diferenciam negativamente dos restantes dos AH pela presença das estruturas alifáticas e aromáticas funcionalizadas ($C_{\text{Alkyl}}\text{-(H,R)}$, $C_{\text{Alkyl}}\text{-(O,N)}$, $C_{\text{Alkyl}}\text{-O}$, $C_{\text{Alkyl}}\text{-di-O}$, $C_{\text{Aromatic}}\text{-O,N}$). Estes resultados indicam que fragmentos de peptídeos, aminoácidos, e carboidratos que são estruturas mais lábeis produzem as maiores variabilidades estruturais nos AH e, portanto, essas são as estruturas mais polares e que formam o domínio mais superficial, em maior contato com a solução do solo e, portanto, corresponde com o domínio de maior substituição, uma vez que os fragmentos mais aromáticos e recalcitrantes formam o núcleo das SH. Neste sentido, há relatos que mostram que as estruturas dos AH possuem uma distribuição organizacional onde um domínio mais funcionalizado e polar se direciona para a superfície da supramolecular enquanto um domínio mais apolar fica para o interior.

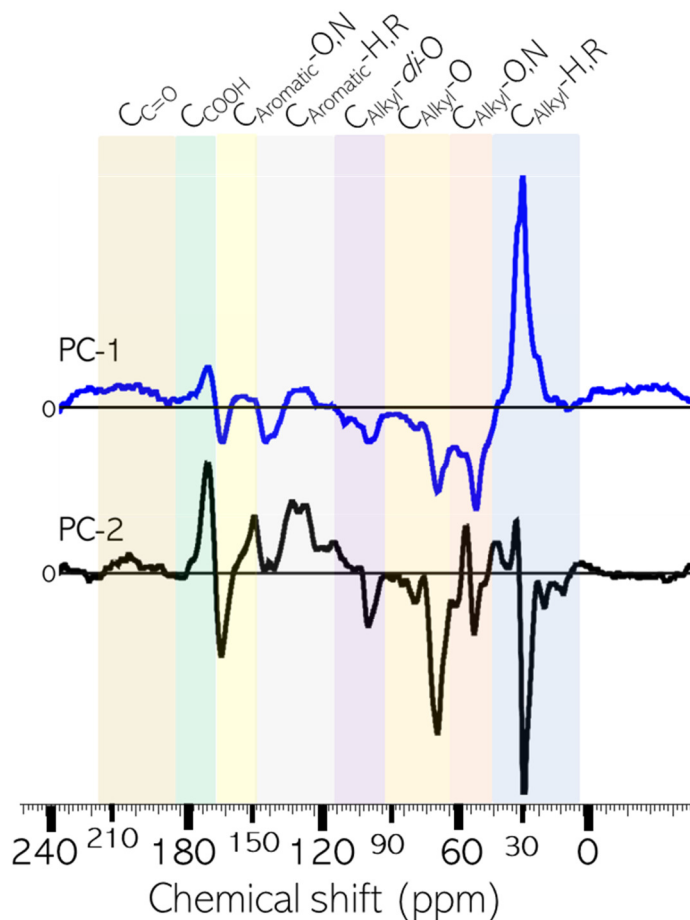


Figura 11. Análises de PCA “loadings” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.

Além da PCA anterior (PC-1 + PC-2), a PCA foi também realizada com as componentes PC-2 e PC-3 (17% da variância total explicada) (Figura 12). A PCA mostrou que os AH extraídos de solos orgânicos, latossolos, amostras de VC e Cuba, se agruparam a valores negativos da PC-3, a valores positivos foram agrupados os AH extraídas de VC, Chernossolo, Planossolo e Cambissolo.

O agrupamento dos AH na PC-3 reafirma mais intensamente o discutido anteriormente. Nesta componente, AH semelhantes em padrão estrutural se formaram em solos com presença predominante de areia (planossolo arenoso), solos pedogeneticamente pouco evoluídos e com presença de argilas de 2:1 (esmectita). Neste tipo de solo, a presença destas partículas propicia um ambiente hidrofóbico que potencializa a interação com os domínios estruturais hidrofóbicos da MOS depositada, como por exemplo, estruturas alifáticas e aromáticas não funcionalizadas.

Por outro lado, os AH formados em Latossolos e Orgânicos mostraram semelhança. No caso de latossolos, as condições para as interações organominerais entre grupamentos funcionais estão mais favorecidas a partir do enriquecimento em óxidos de Fe e Al presentes.

As amostras extremas identificadas como outlier (AHVC e AHorgânicos) foram também separadas na PC-3. Nesta componente os AH8organicos, AH6organicos e AH3organicos se mostraram extremos aos AH extraídos de VC.

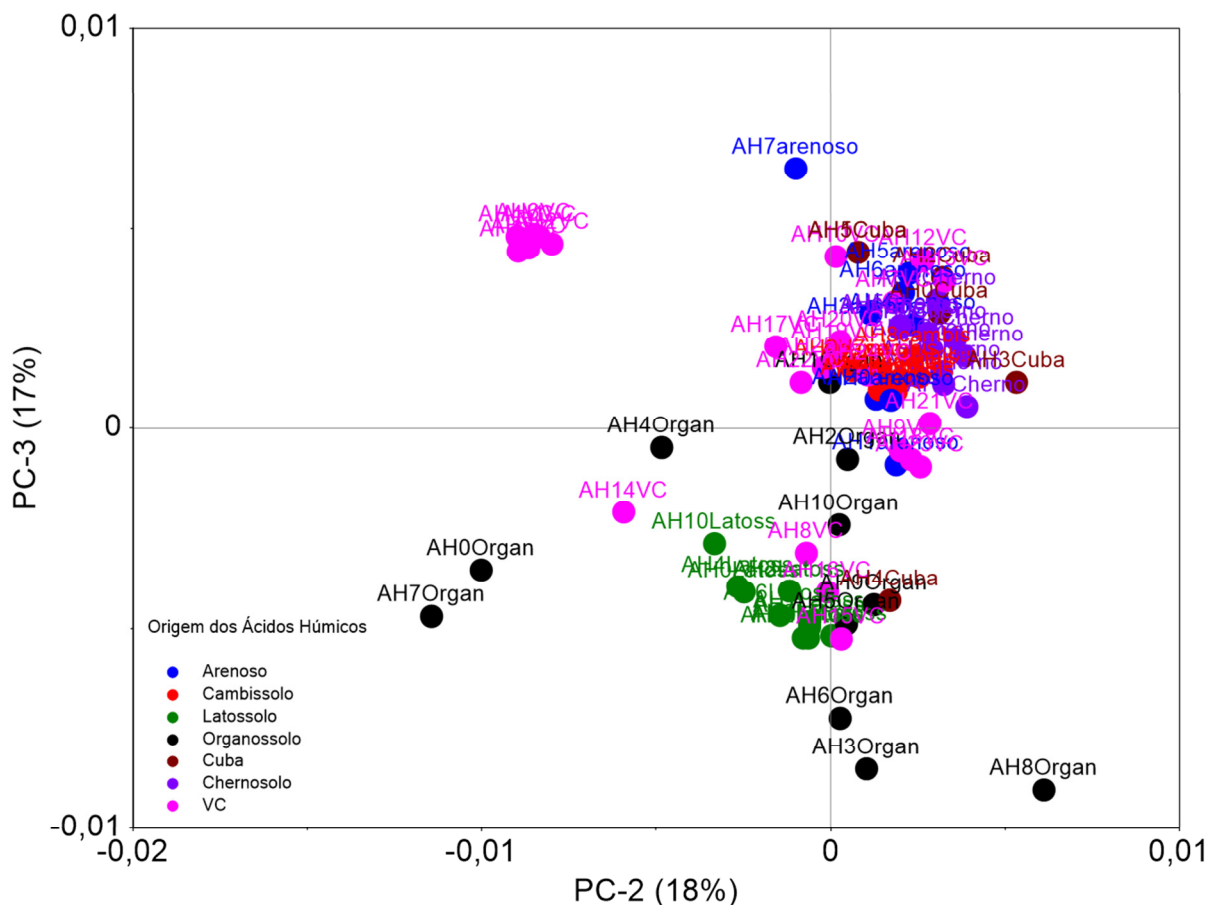


Figura 12. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-2 e PC-3 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens considerando os potenciais outlier obtidos teste de *Hotelling-T² ellipse*.

Os loadings da PC-3 mostram quais são as estruturas responsáveis pelas semelhanças e diferenças entre os AH (Figura 13). Os AH extraídos de planossolo arenoso e os solos pedogeneticamente pouco evoluídos se assemelham entre si pela presença de estruturas $C_{Aquil-H,R}$ e $-COOH$, provavelmente pertencentes a fragmentos de ácidos graxos. Ácidos graxos apresentam uma cadeia alifáticas insaturada, apolar e hidrofóbica que possibilita as interações desta natureza tanto com as partículas de areia como das superfícies hidrofóbicas das argilas 2:1 do Chernossolos, estes resultados foram relatados em Gomes et al., (2018); Vioratti (2020). A semelhança dos AH neste tipo de solo com os produzidos no VC consiste na presença dos carbonos alifáticos funcionalizados pertencentes a fragmentos de carboidratos e peptídeos. Por outro lado, os AH formados em organossolos e latossolos se assemelham entre eles pela presença de estruturas aromáticas de diferente funcionalização química ($C_{Aromatico-H,R}$; $C_{Aromatico-O,N}$).

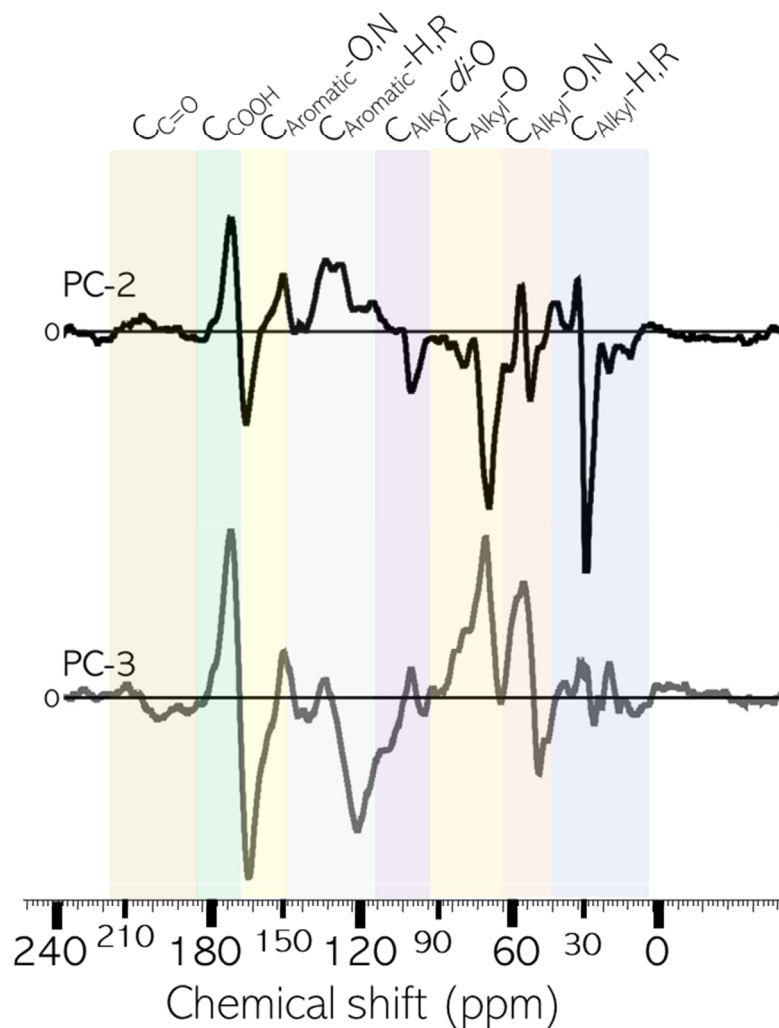


Figura 13. Análises de PCA “loadings” para as componentes PC-2 e PC-3 das 80 amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.

4.4 Condição 2. Análises Quimiométricas das Amostras de AH Excluindo as Amostras Outlier

Neste estudo foi realizada uma nova análise quimiométrica, reduzindo o número de amostras de AH para 71, descartando as amostras de possíveis outlier detectadas mediante teste *de Hotelling-T² ellipse*. O objetivo desta análise consistiu em eliminar a interferência de amostras extremas e conferir a estabilidade dos padrões no comportamento da mudança estrutural encontrados com a totalidade das amostras na condição 1 (Figura 14).

Nesta condição, para uma variação de 56% (PC-1+PC-2), algumas amostras de AH de organossolos e Planossolo arenoso mostraram estruturas diferentes, assim, para uma variância de 29% (PC-2+PC-3) (Figura 14A), também uma amostra de AHVC se mostrou diferentes quando comparada com o restante dos AH (Figura 14B).

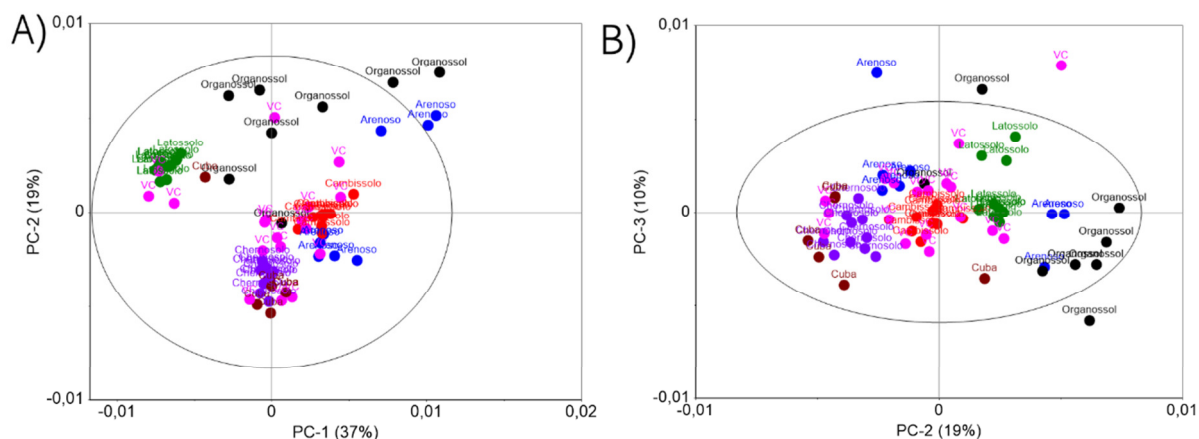


Figura 14. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-1, PC-2 e PC-3 das 71 amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens considerando os potenciais outlier obtidos teste de *Hotelling-T² ellipse*.

Nos valores positivos da PC-1 (37% da variância explicada) se agruparam aos AH extraídos dos Cambissolos e dos Planossolos arenosos, enquanto à valores negativos da PC-2 (19% da variância explicada) se agruparam principalmente aos AH extraídos de Cambissolo e Chernossolos. As amostras de AH extraídos de Organossolos não mostraram um agrupamento específico na PC-1, no entanto, houve um agrupamento desses AH a valores positivos da PC-2, juntamente aos AH provenientes do Latossolo (Figura 15).

Em comparação com a condição 1, a retirada de nove amostras extremas, consideradas “outlier” permitiu aumentar a variância explicada de 51% para 56%. Os padrões de agrupamento para os AH extraídos permaneceram semelhantes com a condição 1, principalmente para os padrões de agrupamento dos AH extraídos de Cambissolo, Planossolo arenoso, Chernossolo e Latossolos.

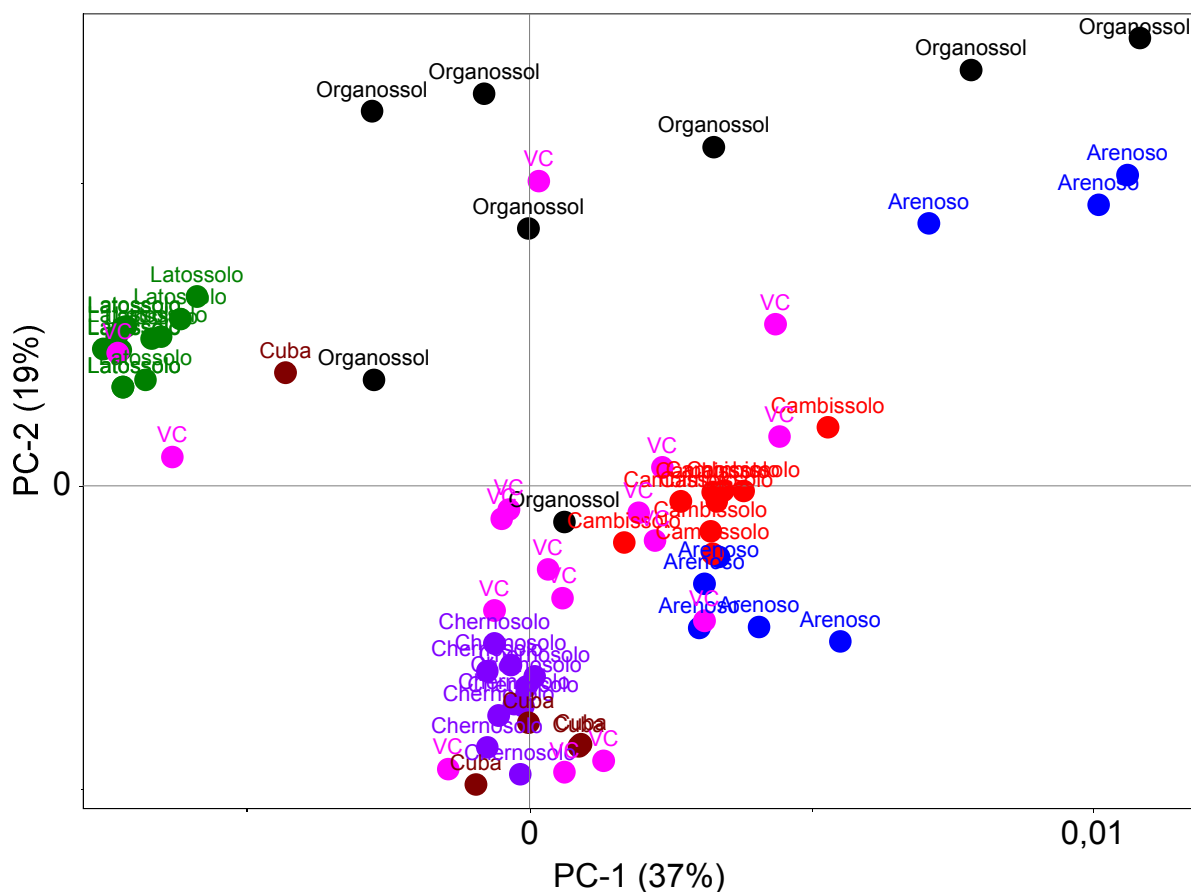


Figura 15. Análises de PCA “scores” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.

Os *loadings* para a PC-1 foram semelhantes aos obtidos para a condição 1, o que confirma a preservação do mesmo padrão de estruturas para os AH, independente das condições extremas de formação (Figura 16). Por outro lado, os *loadings* para a PC-2 mostram uma mudança nos padrões estruturais responsáveis pelo agrupamento nesse componente quando comparado com a condição 1. Com a retirada das amostras outlier, a PCA mostrou que nos Latossolos e Organossolos, os AH formados apresentam estruturas do tipo $C_{Alkyl}-(H,R)$; $C_{Aromatic}-(H,R)$ e $C_{Aromatic}-(O,N)$ e em Chernossolo e parte dos Cambissolo e Planossolo arenossolos, as estruturas predominantes são de origem peptídica: $C_{Alkyl}-(O,N)$; carboidratos: $C_{Alkyl}-O$ e carboxílicas: $-COOH$.

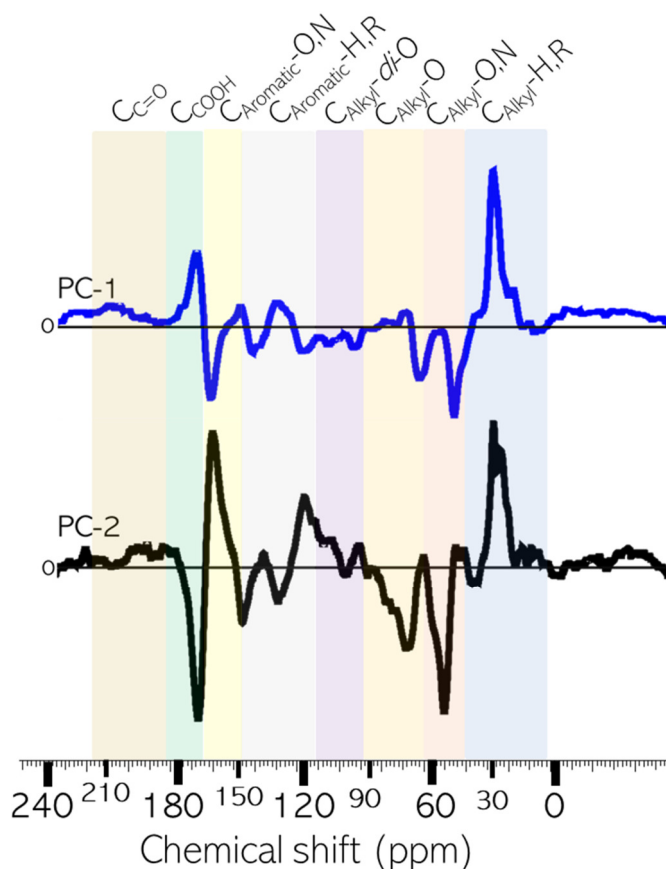


Figura 16. Análises de PCA “loadings” para as componentes PC-1 e PC-2 das amostras de ácidos húmicos isoladas de diferentes origens.

4.4.1 Padrões estruturais dos AH obtidos mediante estatística descritiva

A aplicação de técnicas quimiométricas permitiu também acessar ao padrão estrutural médio em cada AH extraído de cada tipo de solo (Figura 17). Este resultado é especialmente importante, porque permite fixar um padrão espectral que representa às características estruturais nos AH, isto mediante uma análise de estatística descritiva. Desta forma é possível comparar com mais eficiência os padrões estruturais a partir de uma grande quantidade de amostras espectrais com os erros de variabilidade já corrigidos.

Os padrões estruturais mostrados na figura 17 para cada AH extraído de cada solo mostram que em todos os AH, há formação de supraestruturas húmicas com composição semelhante. Os padrões mostram e confirmam ainda que a diferença entre os AH não consiste na presença de estruturas e sim na quantidade em que estas compõem aos AH. Estes resultados reafirmam que as características dos solos influenciam e podem determinar a intensidade da expressão das propriedades das moléculas orgânicas que se depositam no solo, mas não determinam a formação de AH. Esta interpretação sobre a dinâmica do carbono orgânico no solo se traduz, em termos ambientais em que, as características dos solos influenciam a velocidade, a extensão em que ocorre o processo de humificação, mas não sua ocorrência.

Como podem ser interpretados estes resultados em função destas diferenças? A compressão deve se dar em função de um modelo de humificação que forma SH com organização supraestrutural não somente via ligação química das moléculas, mas também ocorre via interações hidrofóbicas não covalentes. Isto é, em solo onde predominem as

partículas hidrofóbicas como a areia, ocorrerá um processo de humificação que começa pela interação de moléculas orgânicas hidrofóbicas com a areia, isto pode acontecer com os ácidos graxos, onde a cadeia alifática longa estabelece as interações apolares e hidrofóbicas e o domínio carboxílico terminal polar, fica disponível para as ligações por ponte de metais, ligações de hidrogênio e posterior enriquecimento e formação das estruturas húmicas. No caso contrário, em solo onde predominam óxidos, argilas, as interações que iniciam a formação das SH podem ser de caráter covalente, entre grupos carbóxilos, grupamentos aminos, etc. Estas análises podem ser entendidas sem dificuldade observando a presença de todas estas estruturas citadas aqui, no padrão espectral geral obtido para todos os AH de todas as diferentes fontes de origem estudadas.

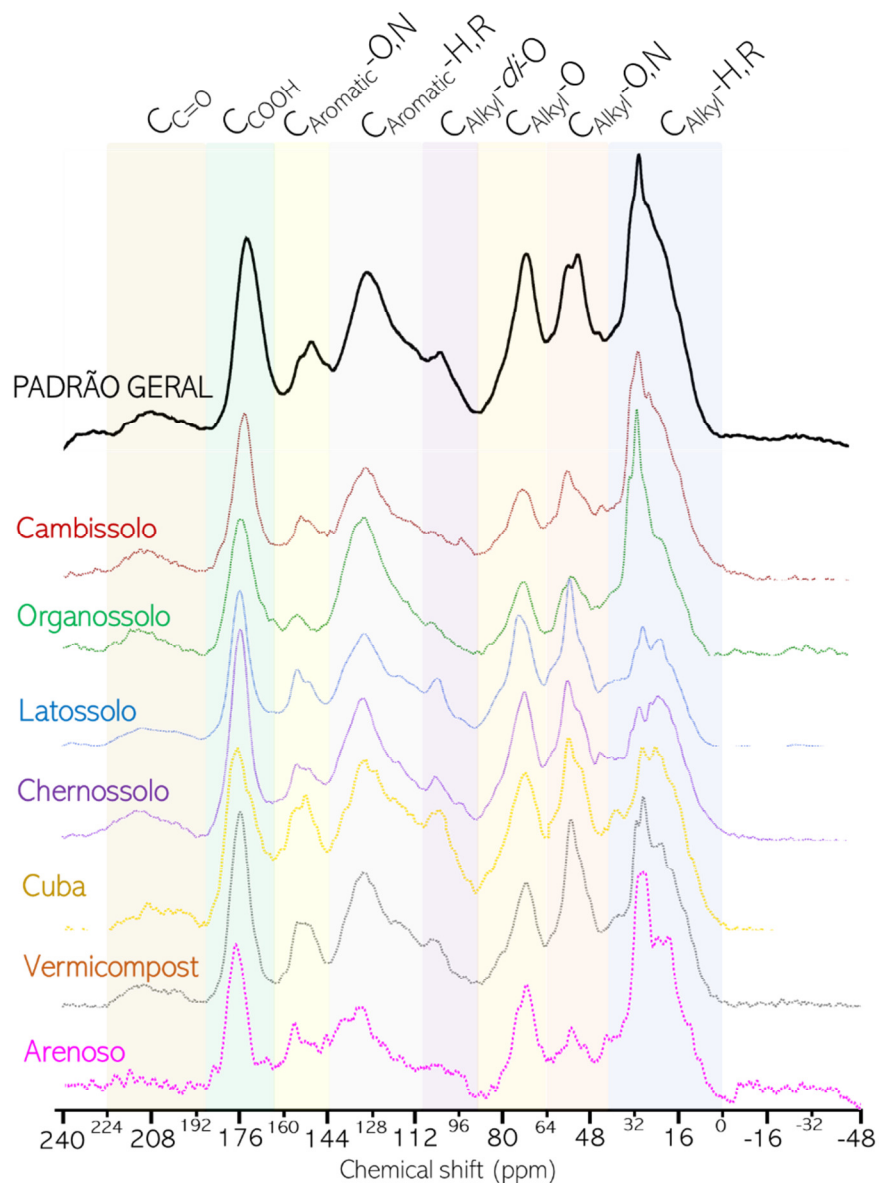


Figura 17. Padrões estruturais espectrais obtidos para cada AH extraídos das diferentes origens aplicando técnicas quimiométricas de estatística descritiva. Os padrões espectrais são expressos a partir da média estatística de cada tipo de solo. O padrão geral foi obtido a partir de uma quantidade de amostras de n=80.

4.5 Domínios Estruturais Presentes nos AH Acessados Mediante Curva de Resolução Multivariada (MCR)

Com os dados apresentados, pode-se comprovar que o processo de humificação é específico para cada tipo de solo, produzindo SH com características semelhantes que consistem não na presença de tipos de moléculas e sim na quantidade em que estas se aglomeram para formar a supraestrutura. Pela linha de raciocínio adotada neste estudo, haverá de entender que a formação de estruturas semelhantes em ambientes tão diferentes implica obrigatoriamente na geração de propriedades semelhantes. Isto deverá ser analisado sob tais regras uma vez que sabemos mediante a experiência e as evidências já reconhecidas na literatura científica, que as SH no solo, melhoram as condições químicas, físicas e biológicas do solo (Figura 18).

Neste estudo também aplicamos quimiometria para entender como os processos de humificação tão diferentes produzem AH semelhantes e em que consistem estas semelhanças estruturais que geram propriedades equivalentes. Para isto foi aplicada uma técnica quimiométrica denominada curva de resolução multivariada. Mediante esta técnica foi possível comprovar que independentemente do tipo de solo, os AH possuem domínios predominantes. Estes domínios predominantes conformam a supraestrutura, ambos os domínios são diferentes porque estão compostos por estruturas diferentes.

Portanto, nós temos em uma mesma estrutura húmica, em todos os AH um domínio com propriedades hidrofóbicas, composto por estruturas alifáticas com baixa funcionalização química como $C_{\text{Alquil}}\text{-(H,R)}$, $C_{\text{Aromatic}}\text{-(H,R)}$ e carboxilas, assim como um domínio hidrofílico formado por estruturas alifáticas funcionalizadas: $C_{\text{Alquil}}\text{-(O,N)}$; $C_{\text{Alquil}}\text{-(O)}$ e $C_{\text{Alquil}}\text{-di-O}$, aromáticas funcionalizadas: $C_{\text{Aromatic}}\text{-(O,N)}$ e maior presença de carboxilas.

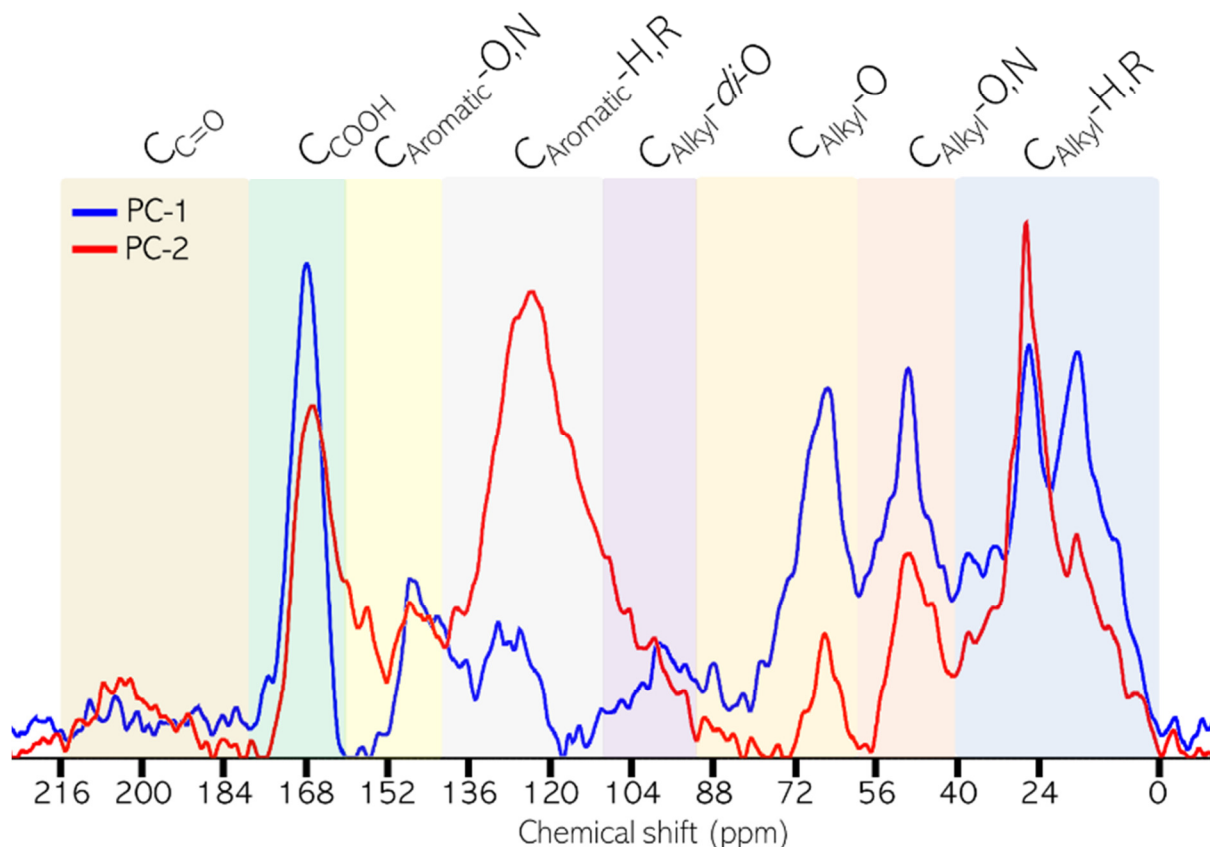


Figura 18. MCR realizada a partir da matriz de 80 espectros ^{13}C NMR CP MAS expressando o as duas primeiras componentes de maior peso na forma de padrão espectral.

Reafirmando o pressuposto científico, a quantidade diferente de distintas moléculas formando a supramolécula húmicas não modifica o padrão estrutural, porém modifica as propriedades químicas geradas, e como consequência a intensidade da sua função (relação estrutura gera propriedades e propriedades definem função) (Figura 19).

É possível observar a quantidade relativa em porcentagem da presença de cada domínio nos AH calculado a partir do peso dos componentes no MCR. Cada grupo de AH extraídos de um tipo de fonte diferente mostra uma proporção de hidrofiliicidade e hidrofobicidade diferente, assim, entre cada tipo de fonte, os AH também mostraram proporções diferentes destas propriedades. Novamente, estas diferenças nas propriedades reafirmam e são o resultado das quantidades de diferentes estruturas formando os AH.

De maneira geral, dentre os AH estudados, os extraídos do Latossolo, possuem um balanço de hidrofiliicidade e hidrofobicidade maior. Dentre todos os AH extraídos, alguns obtidos de organossolo e VC possuem maior hidrofobicidade. Por outro lado, os AH extraídos dos Planossolos arenosos, Cambissolos, Chernossolos e VC possuem em sua maioria propriedades mais hidrofílicas. Dentre os mesmos tipos de solo, também houve variabilidade das propriedades, com exceção do AH extraídos de Cambissolo, onde a hidrofiliicidade e hidrofobicidade foi homogênea em todos os AH. Entre os solos Planossolo arenosos, o AH (AH7arenoso) apresentou mais de 80% de hidrofiliicidade. Entre os AH extraídos de Latossolo, a amostra AH11Latossolo apresentou aproximadamente 40% de hidrofiliicidade. Já entre os AH extraídos de solo orgânico, a amostra AH3organico, apresentou a maior hidrofobicidade (aproximadamente 90%). Nos AH extraídos de Cuba, as amostras correspondentes a AH5Cuba apresentou uma hidrofiliicidade maior do que o 70%. Por outro lado, dentre os AH extraídos de vermicomposto, a amostra AH15VC possui aproximadamente 70% de hidrofobicidade.

De acordo com o banco de amostras de solos estudadas aqui, a propriedade de hidrofiliicidade parece ser predominante nos AH. Este resultado, embora limitado à quantidade de amostras, reafirma que a distribuição estrutural das substâncias consiste em uma supraestrutura que se organiza em um domínio hidrofóbico voltado para o interior e formando o núcleo da supraestrutura, em interação com um domínio hidrofílico voltado para a superfície da supraestrutura. O domínio hidrofóbico está composto por estruturas apolares enquanto o hidrofílico o compõe estruturas polares.

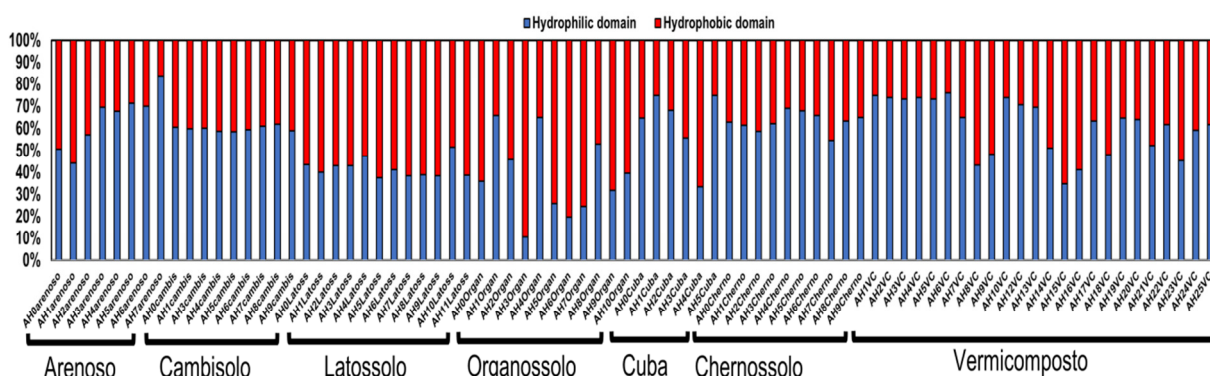


Figura 19. MCR realizada a partir da matriz de 80 espetros ^{13}C NMR CP MAS expressando as duas primeiras componentes em quantidade relativa.

4.6 Quantidade Relativa de Estruturas nos AH Extraídos das Diferentes Origens

As análises realizadas mostram que há uma diferença entre a presença dos tipos de estrutura na composição do AH e a quantidade em que essas estruturas estão compondo os AH. A presença é uma consequência direta da entrada, deposição e posterior humificação das moléculas orgânicas no solo, já a quantidade é uma consequência direta da velocidade e capacidade destas moléculas para expressarem suas propriedades químicas nos diferentes ambientes e chegar finalmente a compor a supraestrutura húmica.

Para testar e comprovar parte da nossa hipótese, uma quantificação relativa foi realizada dos tipos de estrutura que podem ser detectados mediante ^{13}C NMR CP MAS (Figura 21). Como já estabelecido na literatura, todos os AH apresentaram quantidades diferentes de estruturas. Ao mesmo tempo, entre os mesmos tipos de solo, os AH também mostraram quantidades relativas de estruturas. De maneira geral, a ordem de quantidades relativas de estruturas na composição dos AH para todas são: $C_{\text{Alquil}}(\text{H,R}) > C_{\text{Aromatic}}(\text{H,R}) > C_{\text{Alquil-O}} > C_{\text{Alquil-(O,N)}} > C_{\text{COO}}(\text{H,R}) > C_{\text{Aromatic-(O,N)}} > C_{\text{Alquil-di}}(\text{H,R}) > C_{\text{C=O}}$.

A quantidade de estruturas alifáticas não funcionalizadas: $C_{\text{Alquil}}(\text{H,R})$, é superior para todos os AH extraídos de todas as fontes de origem estudadas. No entanto, nos AH extraídos de planossolo arenoso houve maior quantidade relativa destas estruturas, seguida de Cambissolo e em sequência os extraídos de Organossolo. A seguir é apresentado na ordem o tipo de estrutura predominante (maior para menor predominância) e a expressão dentre as origens.

Carbono alifáticos não substituídos:

AHArenoso > AHCambissolo > AHOrganossolo > AHVC > AHChernossolo > AHCuba > AHLatossolo.

$C_{\text{Aromatic}}(\text{H,R})$

AHOrganossolo > AHChernossolo > AHCuba > AHCambissolo > AHLatossolo > AHArenoso > AHVC.

Carboidratos: $C_{\text{Alquil-O}}$,

AHCuba > AHVC > AHLatossolo > AHChernossolo > AHArenoso > AHCambissolo > AHOrganossolo.

Proteínas e peptídicas: $C_{\text{Alquil-(O,N)}}$,

AHVC > AHLatossolo > AHChernossolo > AHCuba > AHCambissolo > AHOrganossolo > AHArenoso.

Carboxilas, amídicos e do tipo ésteres: $C_{\text{COO}}(\text{H,R})$

AHChernossolo > AHArenoso > AHCambissolo > AHLatossolo > AHOrganossolo > AHCuba > AHVC.

$C_{\text{C=O}}$

AHArenoso > AHOrganossolo > AHCambissolo > AHChernossolo > AHLatossolo > AHVC > AHCuba.

Os resultados mostram que os AH neste estudo apresentam em média 24% de aromaticidade e 76% de alifaticidade (Figura 20). Estas propriedades foram homogêneas para todos os AH dos diferentes tipos de solo. No entanto, os AH extraídos de VC e Cambissolo foram os mais alifáticos, com valores levemente superior ao resto dos AH, apresentando uma alifaticidade de 77,49% e 77,13% respectivamente. Por outro lado, os AH extraídos dos solos de Cuba, Organossolo e Chernossolo foram os mais aromáticos, com valores de 26,08%, 25,59% e 25,58% respectivamente.

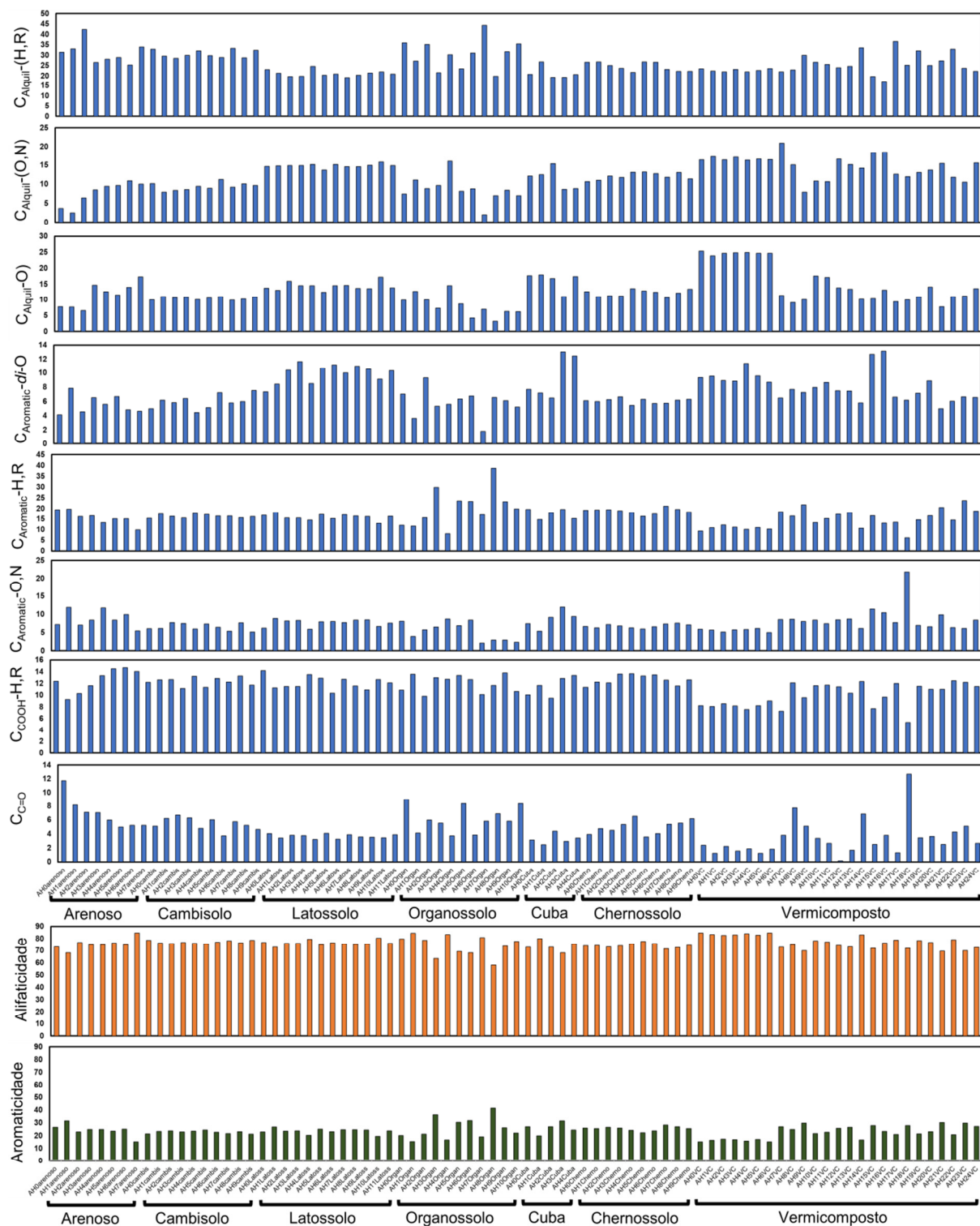


Figura 20. Quantidade relativa de estruturas presentes nos AH isolados de diferentes fontes de origem e propriedades de alifaticidade e aromaticidade obtidas de 80 espectros ^{13}C NMR CP MAS.

4.7 Debate Atual Sobre a Humificação e as Substâncias Húmicas

Com uma quantidade amostral de solos e vermicompostagem, que compõem sete origens distintas, foi comprovado aqui que independentemente do tipo de solo e a fonte de

formação do AH, as SH se formam, podem ser isoladas e caracterizadas. Neste estudo destacamos esse fato porque existem pontos críticos no debate sobre a existência das SH como entidade química no ambiente.

Em Kleber e Lehmann (2019), há crítica sobre o processo de extração das SH (essa metodologia utilizada neste estudo) onde se destaca que essa metodologia não permite diferenciação entre estruturas húmicas e não húmicas e que introduz artefatos químicos durante a sua utilização. Contudo, a indicativos que a metodologia proposta pela IHSS por Swift (1996) produz um grupo de compostos denominados como SH com um padrão estrutural comum, e é independente da origem. Em primeira instância, este resultado já seria uma atenuante científica suficiente para a sua utilização. Neste sentido ficaria então em questão o fato de comprovar se estas SH são o resultado deste processo, ou seja, se as SH são sintetizadas como resultado de aplicação deste método. Nesta questão é necessário indicar que não há nenhuma outra metodologia que possa ser assumida como controle, ou outro grupo de substâncias que possa funcionar como grupo de comparação para estabelecer como verdadeira tal crítica (GARCÍA et al., 2019). Por outro lado, em Olk et al., (2019) é explicado, baseado em evidências experimentais como a utilização de N₂ como atmosfera inerte, resolve uma parte dos problemas relacionado com a presença de O₂ durante a extração causando reações colaterais e artefatos químicos. Neste estudo, uma atmosfera de N₂ de fluxo contínuo é utilizada durante toda a extração.

Outras justificativas poderiam indicar que de maneira indireta a existência das SH como entidades estruturais no ambiente não é produzida mediante a extração em meio alcalino. Um exemplo disso é a presença de SH em corpos de água, ou seja, SH aquáticas. A existência das SH aquáticas já é altamente reconhecida na literatura científica, seu isolamento é realizado mediante a utilização de diferentes tipos de resinas não iônicas e por tanto elas não são submetidas a tratamento com NaOH (THURMAN et al., 1982; TIPPING et al., 1984).

Por outro lado, outras questões ainda são colocadas em debate como, por exemplo, a validade do processo de humificação (SCHMIDT et al., 2011; KLEBER e LEHMANN, 2015). Neste estudo a referência ao processo de humificação expressam que a permanência da matéria orgânica no solo depende das características do ambiente solo e não da estrutura. Com os resultados apresentados tal afirmação merece pesquisas mais aprofundadas, isto porque foi evidente que com fontes tão diversas como solos diferentes e vermicompostagem e de pontos geográficos tão distantes, houve presença de SH com estruturas semelhantes.

Portanto, o processo de humificação ocorre com independência da fonte, porém em diferentes extensões. Estes resultados coincidem com o relatado por García et al. (2019), e com as evidências mostradas em Hayes e Swift (2020). Estes autores explicam que, contrariamente ao relatado em Kleber e Lehmann, (2015), onde apresentam um modelo denominado como “soil continuum model”, no processo de humificação também ocorrem substituições estruturais em dependência do decorrer de mudanças das condições do solo, onde há eventuais desestabilizações da supraestrutura húmicas assim como acesso dos microrganismos para a degradação das frações húmicas. A capacidade de degradação das SH por microrganismos tem sido relatada na literatura por Ueno et al., (2015), onde se comprovou a decomposição anaeróbica de AH por bactérias *Clostridium sp.* Outros autores como Collado et al., (2018) também relatam a capacidade de fungos como aqueles da podridão branca para decompor AH e AF.

5 CONCLUSÕES

A caracterização das amostras de AH mediante ^{13}C NMR CP MAS, extraídas de diferentes tipos de solo e de vermicompostagem, aliadas a técnicas de quimiometria, mostrou uma metodologia eficiente para o estudo dos padrões estruturais da matéria orgânica humificada de solos e fontes compostadas.

Com o presente estudo concluem-se que independentemente do tipo de solo e a fonte de formação do AH, as SH se formam, e podem ser isoladas e caracterizadas.

Todas as amostras de AH caracterizados possuem um padrão estrutural semelhante, independente da fonte de origem, porém todos apresentam quantidades relativas diferentes de estruturas químicas em sua composição. As semelhanças nos padrões estruturais demonstram que o processo de humificação ocorre em cada uma destas fontes e por tanto as SH são formadas. As diferentes quantidades estruturais geram propriedades diferentes em cada AH como a hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, aromaticidade e alifaticidade e por tanto haverá uma função semelhante, porém com intensidades diferentes para cada AH.

Os resultados sugerem que as SH são um grupo de compostos com identidade estrutural única e diferente das moléculas que lhe deram origem. Sugere que não existe um único processo de humificação, pois em cada fonte de origem se desenvolverá uma humificação que dependem das características do ambiente e, portanto, este processo ocorre com diferentes extensões. A presente dissertação dialoga com o debate mais atual sobre a existência das SH e o paradigma do húmus do solo, assim como aporta novas evidências em favor do reconhecimento das SH como compostos com identidade estrutural inequívoca presente no meio ambiente.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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*, 658, 901-911, 2019.

COLLADO, S., OULEGO, P., SUÁREZ-IGLESIAS, O., & DÍAZ, M. Biodegradation of dissolved humic substances by fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, v.102, n. 8, p. 3497-3511, 2018.

DE CASTRO, T. A. V. T., BERBARA, R. L. L., TAVARES, O. C. H., DA GRAÇA MELLO, D. F., PEREIRA, E. G., DE SOUZA, C. D. C. B., ... & GARCÍA, A. C. Humic Acids Induce a Eustress State Via Photosynthesis and Nitrogen Metabolism Leading to a Root Growth Improvement in Rice Plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021.

DROSOS, M., NEBBIOSO, A., & PICCOLO, A. Humeomics: A key to unravel the humic pentagram. *Applied soil ecology*, v. 123, p. 513-516, 2018.

FISCHER, T. Humic supramolecular structures have polar surfaces and unpolar cores in native soil. *Chemosphere*, v. 183, p. 437-443, 2017.

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 of Environmental Quality*, v. 48, n. 6, p. 1622-1632, 2019.

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*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

GERKE, J. Concepts and misconceptions of humic substances as the stable part of soil organic matter: A review. *Agronomy*, v. 8, n. 5, p. 76, 2018.

GOMES, E.T.M., R.L.L. BERBARA, M.G. PEREIRA, S.S. URQUIAGA, O.C.H. TAVARES, S.A. ASSUNÇÃO, AND A.C. GARCÍA. Effects of farmed managements in sandy soils on composition and stabilization of soil humic substances. *Land Degrad. Dev.* v. 29, n. 1, p. 68–79, 2018.

HAYES, M. H., & SWIFT, R. S. An appreciation of the contribution of Frank Stevenson to the advancement of studies of soil organic matter and humic substances. *Journal of soils and sediments*, v. 18, n. 4, p. 1212-1231, 2018.

HAYES, M. H., & SWIFT, R. S. Vindication of humic substances as a key component of organic matter in soil and water. *Advances in Agronomy*, v. 163, p. 1, 2020.

IHSS. 2021. What are humic substances? *Int. Humic Substances Soc.* [https:// humic-substances.org/](https://humic-substances.org/) (Accessed March 2021).

KEELER, C., KELLY, E. F., & MACIEL, G. E. Chemical–structural information from solid-state ¹³C NMR studies of a suite of humic materials from a lower montane forest soil, Colorado, USA. *Geoderma*, v. 130, n. 1-2, p. 124-140, 2006.

KLEBER, M., and J. LEHMANN. Humic substances extracted by alkali are invalid proxies for the dynamics and functions of organic matter in terrestrial and aquatic ecosystems. *J. Environ. Qual.* v. 48, p. 207–216, 2019.

Kononova, M.M. 1966. *Soil organic matter*. 2nd ed. Pergamon, Oxford, UK.

LEHMANN, J., & KLEBER, M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, v. 528, n. 7580, p. 60-68, 2015.

NEBBIOSO, A., & PICCOLO, A. Advances in humeomics: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*, v. 720, p. 77-90, 2012.

NEBBIOSO, A., PICCOLO, A. Basis of a humeomics science: Chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules* v. 12, n. 4, p. 1187–1199, 2011.

OLK, D. C., BLOOM, P. R., PERDUE, E. M., MCKNIGHT, D. M., CHEN, Y., FARENHORST, A., ... & HARIR, M. Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters. *Journal of environmental quality*, v. 48, n. 2, p. 217-232, 2019.

PICCOLO, A., SPACCINI, R., DROSOS, M., VINCI, G., & COZZOLINO, V. The molecular composition of humus carbon: recalcitrance and reactivity in soils. In *The future of soil carbon*. Academic Press, p. 87-124, 2018.

PICCOLO, A. In memoriam Prof. F.J. Stevenson and the question of humic substances in soil. *Chem. Biol. Technol. Agric.* v. 3, n. 23, 2016.

SCHMIDT, M. W., TORN, M. S., ABIVEN, S., DITTMAR, T., GUGGENBERGER, G., JANSSENS, I. A., ... & TRUMBORE, S. E. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, v. 478, n. 7367, p. 49-56, 2011.

SCHNITZER, M. Organic matter characterization. 2.ed. In: PAGE, A.L., ed. *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison, ASA/SSSA, p.581-593, 1982.

SCHNITZER, M., & MONREAL, C. M. Quo vadis soil organic matter research? A biological link to the chemistry of humification. *Advances in agronomy*, v. 113, p. 143-217, 2011.

SEN, D. O. U., JUN, S. H. A. N., XIANGYUN, S. O. N. G., RUI, C. A. O., MENG, W. U., CHENGLIN, L. I., & SONG, G. U. A. N. Are humic substances soil microbial residues or unique synthesized compounds? A perspective on their distinctiveness. *Pedosphere*, v. 30, n. 2, p.159-167, 2020.

SIMPSON, M. J., & SIMPSON, A. J. NMR of soil organic matter. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed.). Elsevier Ltd., 2016.

SONG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, J.; ZHANG, L. Homogeneous quaternization of cellulose in NaOH/Urea aqueous solutions as gene carriers. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 2259-2264, 2008.

SUPRAHUMIC, *Supramolecular Humic Systems in the Environment*. Disponível em:< <http://www.suprahumic.unina.it/>> Acesso em: 10 de mar. de 2021.

SWIFT R. S. Organic matter characterization. In: Sparks DL (ed) *Methods of soil analysis. Part 3—chemical methods*, Soil Science Society of America book series. Soil Science Society of America, Madison, p. 1011–1070, 1996.

SWIFT, R. S. In. *Methods of soil analysis: chemical methods*; Sparks, D. L., ed.; SSSA: Madison, 1996.

THURMAN, E. M., WERSHAW, R. L., MALCOLM, R. L., & PINCKNEY, D. J. Molecular size of aquatic humic substances. *Organic Geochemistry*, v. 4, n. 1, p. 27-35, 1982.

TIPPING, E., & OHNSTAD, M. Aggregation of aquatic humic substances. *Chemical Geology*, v. 44, n. 4, p. 349-357, 1984.

TURRO, N. J. Molecular structure as a blueprint for supramolecular structure chemistry in confined spaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.102, n. 31, p. 10766-10770, 2005.

UENO, A., SHIMIZU, S., TAMAMURA, S., OKUYAMA, H., NAGANUMA, T., & KANEKO, K. Anaerobic decomposition of humic substances by *Clostridium* from the deep subsurface. *Scientific reports*, v. 6, n.1, p. 1-9, 2016.

VIORATTI, O. T. M. Estrutura da matéria orgânica em um cambissolo e um chernossolo do estado do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2020.

WELLS, M. J. Supramolecular answers to the organic matter controversy. *Journal of Environmental Quality*, v. 48, n. 6, p.1644-1651, 2019.

WELLS, M. J., & STRETZ, H. A. Supramolecular architectures of natural organic matter. *Science of the Total Environment*, v. 671, p. 1125-1133, 2019.

WHITESIDES, G. M., & BONCHEVA, M. Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 8, p. 4769-4774, 2002.