

ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO CARBONO 13 APLICADA A AMOSTRAS DE ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDAS DE DIFERENTES FONTES

Data de aceite: 03/07/2023

Octávio Vioratti Telles de Moura

Doutorando do Programa de Pós-graduação em Agronomia-CS (UFRRJ)

Tadeu A. Van Tol de Castro

Doutorando do Programa de Pós-graduação em Agronomia-CS (UFRRJ)

Raphaella Esterque Cantarino

Estudante de graduação em Agronomia (UFRRJ)

Samuel de Abreu Lopes

Estudante de graduação em Agronomia (UFRRJ)

Andrés Calderín García

Professor do Departamento de Solos (UFRRJ)

Ricardo Luiz Louro Berbara

Professor do Departamento de Solos (UFRRJ)

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi extrair, purificar e caracterizar estruturalmente mediante ressonância magnética nuclear (RMN) amostras de ácidos fúlvicos (AF) obtidas de duas fontes: vermicomposto e lodo de esgoto. O processo de extração e purificação foi realizado de acordo com a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional

de Substâncias Húmicas (IHSS, sigla em inglês) (SWIFT, 1996), sendo as amostras de AF enviadas para análise espectroscópica de RMN no Instituto de Química (IQ) da UFRRJ. Nos espectros de AF de ambas as fontes, percebeu-se a predominância de picos nas seguintes regiões: 0-45 ppm, indicando estruturas de carbonos alquílicos não funcionalizados ($C_{Alquil}-H$, R); 45-60 ppm, relativos a C-metoxilas e N-alquil-C ($C_{Alquil}-O$, N); 60-90 ppm, que indicam a presença de compostos de carbono alquílico funcionalizado (O-alquil C), sendo que todos esses picos foram mais proeminentes no espectro de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC). Por outro lado, os picos na região 160-185 ppm, indicando estruturas de carboxila C ($C_{COO}-H$, R), foram mais relevantes no espectro de ácido fúlvico de lodo de esgoto (AF-Lodo). Pelos resultados, pode-se inferir que as duas fontes analisadas obtiveram picos relativos a grupos de carbono semelhantes, porém em intensidades diferentes, evidenciando que cada um desses materiais pode gerar um efeito distinto quando aplicado em alguma cultura vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: substâncias húmicas; vermicomposto; lodo de esgoto; caracterização estrutural.

CARBON 13 NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY APPLIED TO SAMPLES OF FULVIC ACIDS EXTRACTED FROM DIFFERENT SOURCES

ABSTRACT: The aim of the present work was to extract, purify and structurally characterize by nuclear magnetic resonance (NMR) samples of fulvic acids (FA) obtained from two sources: vermicompost and sewage sludge. The extraction and purification process was carried out according to the methodology recommended by the International of Humic Substances Society (IHSS) (Swift, 1996), with the FA samples sent for NMR spectroscopic analysis at the Institute of Chemistry from UFRRJ. In the FA spectra from both sources, the predominance of peaks in the following regions can be seen: 0-45 ppm, indicating structures of non-functionalized alkyl carbons ($C_{Alquil}-H$, R); 45-60 ppm, relative to C-methoxyls and N-alkyl-C($C_{Alquil}-O$, N); 60-90 ppm, which indicate the presence of functionalized alkyl carbon compounds (O-alkyl C), all of which peaks were more prominent in the fulvic acid vermicompost (FAVC) spectrum. On the other hand, peaks in the region 160-185 ppm, indicating C carboxyl structures ($C_{COO}-H$, R), were more relevant in the sewage sludge fulvic acid spectrum (FA-Sludge). From the results, it can be inferred that the two sources analyzed obtained peaks related to similar carbon groups, but at different intensities, showing that each of these materials can generate a different effect when applied to any plant culture.

KEYWORDS: humic substances; vermicompost; sewage sludge; structural characterization.

INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas (SH) são materiais presentes na maioria dos ambientes naturais, sendo principalmente originadas a partir de resíduos animais, vegetais, microbianos, bem como de produtos de sua decomposição (FU et al., 2022). Estima-se que cerca de 80% da matéria orgânica do solo (MOS) seja constituída pelas SH, muito embora elas se encontrem também em rios, lagos, sedimentos, dentre outras fontes (AMADOR et al., 2018). Estas substâncias podem ser classificadas nas seguintes frações: ácidos húmicos (AH), solúveis em meio alcalino e insolúveis em meio ácido; ácidos fúlvicos (AF), solúveis em qualquer condição de pH; e humina (HUM), insolúvel independentemente do pH (REDDY et al., 2012).

Um ponto fundamental, destacado em inúmeros trabalhos, é a ação bioestimulante das SH no crescimento e desenvolvimento vegetal (NARDI et al., 2002; TREVISAN et al., 2010; ZAHID et al., 2021). As frações de SH podem atuar promovendo o alongamento radicular, a emissão de raízes laterais, além de incrementar a absorção de nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre e ferro (CASTRO et al., 2021). Esta bioatividade dos materiais húmicos está intimamente relacionada à sua estrutura. Segundo García et al. (2019), as características estruturais das SH definem os tipos de efeitos exercidos por estas no crescimento radicular. Nesse sentido, a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) do carbono 13 é uma das mais amplamente utilizadas visando uma maior elucidação estrutural das SH e de suas frações, possibilitando também a quantificação relativa dessas estruturas.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi extrair, purificar e caracterizar estruturalmente mediante RMN amostras de AF obtidas de duas fontes: vermicomposto e lodo de esgoto. As informações estruturais das amostras são úteis para um entendimento mais aprofundado de seus possíveis efeitos no crescimento e desenvolvimento vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

As duas fontes utilizadas para a obtenção de AF foram: vermicomposto, obtido junto à Fazenda Agroecológica do Km 47; e lodo de esgoto, coletado em área do Instituto de Florestas (IF) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ambos no município de Seropédica, RJ.

O processo de extração e purificação foi realizado de acordo com a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, sigla em inglês) (SWIFT, 1996). Para a obtenção das frações húmicas a partir das fontes utilizadas, uma dissolução de KOH 0,1 mol L⁻¹ foi adicionada à uma massa do material em proporções de 10:1 (v:m) sob atmosfera de N₂, ficando em agitação por 24 horas. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 g durante 30 minutos e o sobrenadante, contendo as frações húmicas correspondentes aos ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, foi recolhido. Posteriormente, ocorreu a acidificação do extrato (AH + AF) recolhido na etapa anterior, adicionando-se uma dissolução de HCl 6 mol. L⁻¹ até pH 1,5, com o intuito de precipitar o AH (figura 1). Após 16 horas, o material foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi sifonado, sendo repetido este processo três vezes. Com o intuito de remover os sólidos solúveis em suspensão, os AH foram redissolvidos em uma dissolução de KOH (0,1 mol. L⁻¹) e foi adicionado KCl até atingir-se uma concentração de 0,3 mol. L⁻¹ de K⁺. Em seguida, o material foi centrifugado a 4.000 g durante 15 minutos.

Posteriormente, foi efetuada a purificação, passando o líquido contendo AF por uma coluna de vidro preenchida com a resina XAD-8 e tufo de algodão nas partes de cima e de baixo. O AF permaneceu então retido na resina enquanto as impurezas foram eliminadas por meio de uma torneira na parte inferior da coluna. Quando todo o material foi passado pela resina, adicionou-se solução de NaOH 0,1 M para desprender da resina o AF purificado e este pode então ser coletado. Após esta etapa, o AF foi transferido para um recipiente preenchido com a resina trocadora amberlite por quinze minutos, com o intuito de eliminar os íons de sódio (Na) oriundos da passagem de NaOH 0,1 M pela coluna. A seguir, foi ajustado o pH dos AF para a neutralidade e estes foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL e congelados em freezer a -80 °C e posteriormente liofilizados

Após a liofilização, as amostras de AF foram enviadas para análise espectroscópica no Instituto de Química (IQ) da UFRRJ, com o intuito de conhecer-se os principais grupamentos funcionais e propriedades dessas amostras de frações húmicas. Foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear em estado sólido do isótopo do ¹³C em

polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (CP MAS ^{13}C - NMR). Para isto, foram aplicadas as 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 ± 1 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 é 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.

O trabalho espectral foi realizado utilizando o Software ACD/Labs v.12.01 (Freeware Academic Edition). Os espectros foram inicialmente submetidos a 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 usado 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).

Os espectros trabalhados e salvos como “*.esp” 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 foram então 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 ($\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-H, R}$): 0–45 ppm; C-metoxilas e N–alquil-C ($\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-O, N}$): 45–60 ppm; O–alquil C ($\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-O}$): 60–90 ppm; di–O–alquil C (carbono anoméricos) ($\text{C}_{\text{Alquil}}\text{-di-O}$): 90–110 ppm; carbono aromático ($\text{C}_{\text{Aromático}}\text{-H, R}$): 110–140 ppm; O, N– aromático C ($\text{C}_{\text{Aromático}}\text{-O, N}$): 140–160 ppm; carboxila C ($\text{C}_{\text{COO}}\text{-H, R}$): 160–185 ppm e carbonilas C (CC=O): 185–230 ppm. O índice de aromaticidade é calculado segundo a fórmula: $(\text{C}_{\text{Aromático}}\text{-H, R}) + (\text{C}_{\text{Aromático}}\text{-O, N}) * 100 / \text{área total}$ e o índice de alifaticidade é calculado como: $100 - \text{aromaticidade (\%)}$. O índice de hidrofobicidade (HB/HI) é 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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 são apresentados os espectros de RMN relativos às amostras de ácidos fúlvicos extraídos de vermicomposto e de lodo de esgoto. Percebe-se em ambos os espectros a predominância de picos nas seguintes regiões: 0-45 ppm, indicando estruturas de carbonos alquílicos não funcionalizados ($C_{\text{Alquílic}}\text{-H, R}$); 45-60 ppm, relativos a C-metoxilas e N-alquílic-C ($C_{\text{Alquílic}}\text{-O, N}$); 60-90 ppm, que indicam a presença de compostos de carbono alquílic funcionalizado (O-alquílic C), sendo que todos esses picos foram mais proeminentes no espectro de ácido fúlvico de vermicomposto (AFVC), cor azul clara. Por outro lado, os picos na região 160-185 ppm, indicando estruturas de carboxila C ($C_{\text{COO}}\text{-H, R}$), foram mais relevantes no espectro de ácido fúlvico de lodo de esgoto (AF-Lodo), cor azul escura.

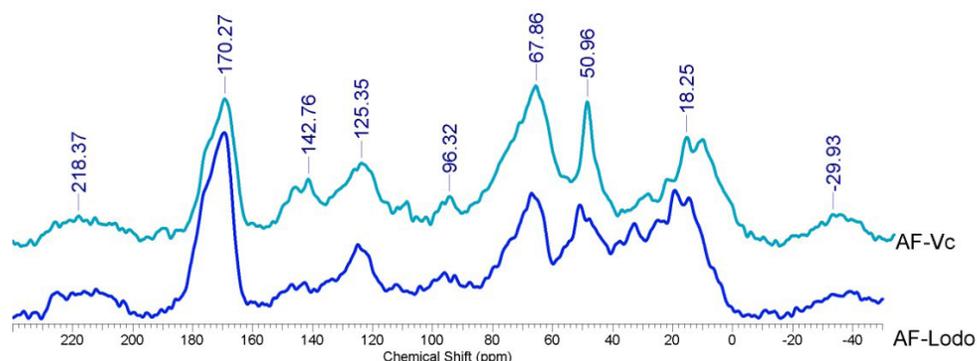


Figura 1. Espectros de RMN C13 de ácidos fúlvicos de vermicomposto (AF-VC) e lodo de esgoto (AF-Lodo).

A partir destes resultados, pode-se verificar diferenças e semelhanças entre os espectros de ácidos fúlvicos (AF) extraídos de vermicomposto e de lodo de esgoto, com um destaque para estruturas de carbono mais alifáticas. Tal fato pode se explicar em razão dos AF serem a fração mais lábil das SH.

CONCLUSÕES

Apesar de possuírem estruturas de carbono na fração AF semelhantes, as duas fontes analisadas obtiveram picos relativos a estes grupos de carbono de intensidades diferentes, o que evidencia que cada um desses materiais pode gerar um efeito distinto quando aplicado em alguma cultura vegetal. Tais efeitos podem ser avaliados em futuros trabalhos, mediante aplicação foliar de solução de AF em diferentes espécies de plantas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMADOR, H.V.; IZQUIERDO, F.G.; PADRÓN, V.V. Las sustancias húmicas como bioestimulantes bajo condiciones de estrés ambiental. **Cultivos Tropicales**, v. 39, n. 4, p. 102-109, 2018.

- CASTRO, T.A.V.T. et al. Humic acids induce a eustress state via photosynthesis and nitrogen metabolism leading to a root growth improvement in rice plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 171-184, 2021.
- FU, B. et al. The influence of humic substance on environmental behavior of antibiotic resistance genes: A mini-review. **Journal of Hazardous Materials Advance**, 2022.
- GARCÍA, A.C. et al. Revisão sobre a relação estrutura-função das substâncias húmicas e sua regulação do metabolismo oxidativo em plantas. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, p. 754-770, 2019.
- REDDY, S. et al. Soil humic and fulvic acid fractions under different land use systems. **Madras Agricultural Journal**, v. 99, n. 7-9, p. 507-510, 2018.
- NARDI, S. et al. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biol. Biochem.**, v. 34, p. 1527-1536, 2002.
- SONG, Y. et al. Homogeneous quaternization of cellulose in NaOH/Urea aqueous solutions as gene carriers. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2259-2264, 2008.
- SWIFT, R.S. In. *Methods of soil analysis: chemical methods*; Sparks, D. L., ed.; SSSA: Madison, 1996.
- TREVISAN, S. et al. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 635-643, 2010.
- ZAHID, A. et al. Plant growth regulators modulate the growth, physiology, and flower quality in rose (*Rosa hybrida*). **Journal of King Saud University, Science** 33, 2021.