

Caracterização Química e Espectroscópica de Ácidos Húmicos Isolados da Vermicompostagem de Diferentes Fontes de Biomassas Agrícolas

Chemical and Spectroscopic Characterization of Humic Acids Isolated from Vermicomposting of Different Agricultural Biomass Sources

Amanda R. M. Campos,^{a,*} Jader G. Busato,^b Aline L. de Oliveira,^c Alan R. Mol,^c Raquel A. Alves,^a Francilene L. Ferreira,^a Leonardo B. Dobbss^a

^aUniversidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus Universitário JK, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, CEP 39100-000, Diamantina-MG, Brasil

^bUniversidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária-FAV, CEP 70910-970, Brasília-DF, Brasil

^cUniversidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto de Química, CEP 70910-970, Brasília-DF, Brasil

*E-mail: amandacamposrm@gmail.com

Submissão: 22 de Janeiro de 2025

Aceite: 17 de Julho de 2025

Publicado online: 25 de Julho de 2025

Determining the chemical and structural characteristics of humic acids is essential to understand the behavior of these compounds in nature. However, their composition varies according to the extraction source. The objective of this study was to characterize chemically and spectroscopically humic acids from vermicomposting of agricultural biomass from different sources. Vermicomposting was performed separately, using crop residues of oleaginous, saccharide, starchy and lignocellulosic origins, with cattle manure in a 30:1 ratio. Humic acids were extracted and characterized according to acidity, E_4/E_6 ratio (ratio between absorbances at 465 and 665 nm), fluorescence emission intensity, elemental composition, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. Higher carbon contents were found in humic acids of saccharide and oleaginous origin, indicating greater quality and functionality of these compounds in soil and in environmental applications. The E_4/E_6 ratio was lower in humic acids of saccharide origin, an aspect indicative of a higher degree of humification and stability, richer in aromatic rings. The infrared emission, fluorescence and nuclear magnetic resonance spectra were similar among the humic compounds. This result reveals similarity in the chemical composition and functionality of the spectra, with higher intensities observed in humic acids of saccharide origin.

Keywords: Humic compounds; vermicompost; infrared; NMR; chemical composition.

1. Introdução

Globalmente, técnicas de agricultura conservacionistas baseadas na mínima perturbação do solo, no manejo eficiente de resíduos agrícolas e na rotação adequada de culturas, surgem como alternativas sustentáveis à agricultura convencional.¹ Essas práticas fortalecem a resiliência dos sistemas agrícolas a eventos climáticos extremos e auxiliam na mitigação dos impactos negativos das mudanças climáticas, promovendo o aporte de carbono no solo.²

Processos como a compostagem e a vermicompostagem de biomassas agrícolas são práticas eficientes de manejo de resíduos reconhecidas na conversão de materiais orgânicos vegetais em biofertilizantes ricos em nutrientes.³ A incorporação desses compostos nas lavouras promove a biodisponibilidade de nutrientes, melhora a capacidade de retenção de água no solo e favorece o crescimento de microrganismos benéficos. Além disso, atuam reduzindo os impactos ambientais associados ao descarte inadequado desses materiais.⁴

A vermicompostagem é um método biológico que utiliza minhocas para a aceleração da degradação dos materiais orgânicos, resultando num composto estável e homogêneo, conhecido como húmus.^{5,6} Durante esse processo ocorre a humificação da matéria orgânica, originando na formação de substâncias húmicas (SH), como os ácidos húmicos (AH). Os AH são compostos de coloração escura, considerados os componentes mais importantes da matéria orgânica, e desempenham papel fundamental no solo e nas plantas.⁷

A base da estrutura molecular dos AH é caracterizada por misturas de moléculas menores, contendo anéis aromáticos, cadeias alifáticas e grupos funcionais ionizáveis que interagem entre si formando colóides agregados.^{8,9} Essa estrutura, denominada “supramolecular”, refere-se à organização tridimensional resultante da associação de suas moléculas por meio de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals.¹⁰ Os grupos funcionais mais predominantemente encontrados nos AH são os grupos fenólicos (OH), carboxílicos (COOH) e quinonas,¹¹ que têm relação com a melhoria das propriedades físicas e químicas do solo, bem como o crescimento das plantas.^{11,12}

Os AH são amplamente encontrados na natureza, e estão presentes em solos, turfas, sedimentos aquáticos, resíduos orgânicos, biomassa vegetal, carvão vegetal e leonardita.⁸ De maneira geral, são constituídos, aproximadamente, por 50-60% de carbono orgânico (C), 30-35% de oxigênio (O), 4-6% de hidrogênio (H), 2-6% de nitrogênio (N), e 0-2% de enxofre (S),¹³ e suas funções estão associadas às moléculas químicas funcionais adsorvidas na supraestrutura, como auxinas e outros compostos. A bioatividade e sua estrutura química dependem da fonte de extração, origem do material, grau de humificação, presença de grupos funcionais bioativos, e o modo de extração.¹⁴

A origem e composição das diferentes fontes de extração dos AH podem gerar compostos com estruturas e propriedades químicas distintas. Para caracterizar e identificar esses compostos em diferentes tipos de fontes, vários procedimentos espectroscópicos avançados têm sido empregados. Estudos com a caracterização de AH extraídos de vermicompostos de esterco bovino, cama de frango, solos orgânicos, turfas, sedimentos de lago e solo mineral,¹⁵ auxiliam na avaliação das mudanças estruturais e no grau de evolução química desses compostos.¹⁶⁻¹⁸

A composição dos AH extraídos de diferentes biomassas agrícolas - lignocelulósicas, amiláceas, sacarídeas e oleaginosas - apresenta variações significativas, influenciadas pela natureza química de cada uma. Estudos indicam que os AH extraídos de fontes lignocelulósicas, como resíduos de madeira, apresentam alta aromaticidade devido à abundância de lignina. Essa característica confere maior estabilidade térmica e resistência à decomposição microbiana.¹⁹ Já os AH oriundos de fontes oleaginosas como resíduos do óleo de palma, foram utilizados para a produção de AH por fermentação com *Trichoderma reesei*. A composição lipídica desses resíduos influencia o crescimento fúngico e a produção de AH, resultando em maior presença de carboidratos estruturais, especialmente celulose.²⁰ Resíduos vegetais que possuem alto conteúdo de substâncias amiláceas em sua composição são mais rapidamente decompostos, e geralmente os AH produzidos exibem menor conteúdo aromático e maior presença de grupos funcionais oxigenados, como carboxilas e hidroxilas, devido à decomposição do amido durante a humificação.²¹ Resíduos sacarídeos, como o da cana-de-açúcar e da beterraba, são ricos em sacarose. Os AH obtidos dessas fontes tendem a apresentar características intermediárias, com estruturas menos aromáticas que as lignocelulósicas, mas com maior presença de grupos funcionais oxigenados, resultantes da decomposição dos açúcares simples.¹⁹⁻²¹

Dentre as técnicas espectroscópicas para a caracterização de AH destacam-se a espectroscopia de fluorescência (465 nm), correlacionada diretamente com o grau de humificação do composto, a espectroscopia na região ultravioleta-visível (UV-Vis), pela avaliação da razão E_4/E_6 , relacionada à condensação estrutural e a aromaticidade dos AH – indicativo do grau de humificação.^{16,18} A técnica de ressonância magnética nuclear do carbono 13 (RMN ¹³C)

pode inferir sobre os tipos de carbono presentes nos AH e o grau de aromaticidade. A espectroscopia na região do infravermelho (IV) pode caracterizar e fornecer informações estruturais e funcionais das SH, especialmente de grupos oxigenados, proteínas, polissacarídeos e proporção de grupos aromáticos/alifáticos e hidrofílicos/hidrofóbicos, permitindo-se obter informações sobre a natureza, a reatividade e o arranjo estrutural dos grupos funcionais oxigenados presentes nos compostos húmicos.^{16,22}

Embora existam estudos sobre a composição de AH extraídos de fontes distintas, poucos trabalhos foram realizados sobre a comparação da composição estrutural e química daqueles obtidos da restos culturais de biomassas agrícolas de diferentes fontes. Diante desse fato, o presente estudo tem por objetivo caracterizar química e espectroscopicamente AH extraídos da vermicompostagem de biomassas agrícolas oriundas de fontes lignocelulósica, oleaginosa, amilácea e sacarídea, destacando as possíveis diferenças e semelhanças entre os compostos.

2. Experimental

2.1. Processo de vermicompostagem e extração dos ácidos húmicos

A vermicompostagem foi preparada, separadamente, para cada fonte de biomassa vegetal, que foram obtidas de experimentos independentes desenvolvidos no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) em parceria com a Faculdade de Ciências Agrárias (FAV) da Universidade de Brasília (UnB).

Restos culturais de soja, sorgo sacarino, farinha do grão do milho e bagaço triturado de cana-de-açúcar, de fontes oleaginosa, sacarídea, amilácea e lignocelulósica, respectivamente, foram misturados a esterco bovino na proporção 30:1.²³ Esses compostos permaneceram em conjunto minibox com 3 caixas aeradas e 2 colônias humificadoras (Minhocário Hobby Húmus - Minibox. Juiz de Fora, MG - Brasil) com 50 minhocas (*Eisenia foetida*) por kg de esterco bovino, por, aproximadamente, 4 meses. Foram mantidos os níveis de aeração e drenagem monitorando-se a umidade (70 a 85 %), temperatura (20 a 25 °C) e pH (7,0), com auxílio de medidor multiparâmetro (Highmed - PHD-5000. São Paulo, SP – Brasil). Ao final do processo, as minhocas foram retiradas, e os vermicompostos, secos em estufa de circulação de ar (Solab - 06656. Piracicaba, SP - Brasil) a 60 °C por 48 h, passados em peneira de malha 4 mm para extração dos AH.

Os AH foram extraídos no AGROPECLAB (Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas em Sistemas Agropecuários) do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) Campus Unaí, da Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), estado de Minas Gerais. A extração se iniciou com o tratamento dos vermicompostos com solução de

NaOH (Dinâmica) 0,1 mol L⁻¹ na proporção 1:10 (m/v) durante 4 h de agitação. Após esse período, as substâncias húmicas (SH) foram separadas das huminas (HU) por centrifugação (Nova Técnica - NT 810. Piracicaba, SP - Brasil) dos compostos por 15 min (5000 g) e as SH (ácidos húmicos [AH] + ácidos fúlvicos [AF]) alcalino solúveis foram os extratos obtidos. Os AH foram separados dos AF, diminuindo-se o pH da solução a 1,5 com adição de HCl (Êxodo Científica) 6 mol L⁻¹, precipitados por centrifugação por 15 min (5000 g), separados e lavados com água destilada até teste negativo em cloreto realizado com nitrato de prata (AgNO₃ - Êxodo Científico). Os AH, após a lavagem, foram titulados até pH 7,0 com KOH (Dinâmica) 0,01 mol L⁻¹, filtrados em membranas de diálise com poros de 1000 Da (Spectrum Chemicals - SPEC-132109 - EUA), em água destilada, até o equilíbrio da condutividade elétrica (TECNOPON - MCA-150. Piracicaba, SP - Brasil) do sistema. Os AH, após a diálise, foram congelados e secos por liofilização (Liobras - L101. São Carlos, SP - Brasil).

2.2. Análises químicas e espectroscópicas

As caracterizações químicas de composição elementar, acidez total, carboxílica e fenólica, e espectroscópicas de ultravioleta visível, infravermelho e ressonância magnética nuclear, foram realizadas no Laboratório de Química do Solo da Faculdade de Agronomia e Veterinária - FAV, bem como na Central Analítica do Instituto de Química (IQ), ambos da Universidade de Brasília (UnB).

2.2.1. Composição elementar dos ácidos húmicos

As determinações dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, (CHNO) foram realizadas em analisador elementar automático Perkin Elmer (Perkin Elmer - EA 2400 Series II - EUA), utilizando-se 4 mg por amostra de cada fonte de AH. As análises foram feitas em triplicata. As razões atômicas foram calculadas dividindo-se os teores elementares.

2.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³C)

A espectroscopia de polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico RMN de carbono 13 (¹³C) foi realizada utilizando o aparelho Bruker AVANCE II RMN a 400 MHz (Bruker - Magneto Ascend 600/Console Avance III HD - EUA), operando em sequência de ressonância de ¹³C a 75.475 MHz, com rotação na taxa de 5000 ± 1 Hz. As amostras foram colocadas em porta amostra (rotor de zircônio) de 4 mm. Cerca de 1510 data points foram coletados em um tempo de aquisição de 20 ms, *recycle delay* de três segundos e 2000 *scans*. A elaboração dos espectros foi realizada com programa computacional *SpinWorks* 3.

2.2.3. Acidez total, carboxílica e fenólica

Amostras de 4 mg dos AH, em duplicata, foram analisadas em analisador automático Perkin Elmer 2.400 (Perkin Elmer - EA 2400 Series II - EUA) obtendo-se a

acidez total pelo método do Ba(OH)₂ com titulação do excesso de base com HCl (Êxodo Científica); a carboxílica, por tratamento com Ca(OAc)₂ (Êxodo Científica), e a fenólica, por diferença.⁴²

2.2.4. Razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm (E₄/E₆)

A razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm (E₄/E₆) foi obtida por espectroscopia de emissão (Varian - Cary 5000 - EUA) com excitação no comprimento de onda na região do azul (465 nm) com a faixa de varredura de 485 nm a 800 nm.

2.2.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) e intensidade de emissão da fluorescência

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) foram obtidos em aparelho espectrômetro Perkin Elmer 1420 (Varian - 640 - EUA), na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas com 1,0 mg de AH em 100 mg de KBr (Synth).

As intensidades da emissão da fluorescência do espectro de onda azul fixo em 465 nm (FI465) foi determinada por espectrofotômetro F-4500 (Hitachi, F-4500 - Japão) em soluções aquosas de AH nas concentrações de 50 mg L⁻¹ equilibradas a 25 °C e pH 8.⁵²

2.3. Análises estatísticas

Para a interpretação de dados quantitativos da análise elementar de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), oxigênio (O) e relações atômicas, acidez total, carboxílica, fenólica e relação E₄/E₆ foram realizadas análises de variância (ANOVA) para determinação se as diferenças entre amostras eram reais ou casuais, seguido de teste de Tukey (p<0,05) para se identificar quais médias diferiram significativamente entre si.

3. Resultados e Discussão

3.1. Composição elementar dos ácidos húmicos (CHNO)

Os teores de carbono (C) variaram de 44,04 a 57,54%, de hidrogênio (H) de 1,58 a 2,93%, nitrogênio (N) de 6,67 a 7,90% e oxigênio (O) de 31,63 a 46,92% nos diferentes AH (Tabela 1).

No geral, a composição elementar média dos AH de diferentes fontes foi razoavelmente consistente com a literatura.²⁵ A composição elementar das substâncias húmicas (ácidos húmicos + fúlvicos) é referenciada pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) da seguinte forma: 50 a 60% de C, 0,7 a 5,1% de N, 3,5 a 4,8% de H e 31,6 a 45,5% de O.^{26,11} Variações, para mais ou menos, podem acontecer dependendo da fonte de extração.²⁷

Os altos teores de C nos AH evidenciam a capacidade de aporte de carbono nestes compostos, em especial nos de origem sacarídea e oleaginoso, com quase 60% em

Tabela 1. Composição elementar dos teores de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e oxigênio (O) e razão atômica C/N, H/C e O/C dos ácidos húmicos (AH) de vermicompostagem de biomassas agrícolas de origem sacarídea, amilácea, lignocelulósica e oleaginosa

Ácidos Húmicos	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C
	%				Razão Atômica		
Sacarídea	57,54 ^{0,37} A	2,93 ^{0,07} A	7,90 ^{0,10} B	31,63 ^{0,30} D	8,50 ^{0,16} B	0,61 ^{0,02} A	0,41 ^{0,01} C
Amilácea	44,04 ^{0,34} C	1,59 ^{0,22} C	7,46 ^{0,06} C	46,92 ^{0,41} A	6,89 ^{0,10} C	0,43 ^{0,06} C	0,80 ^{0,01} A
Lignocelulósica	44,60 ^{0,49} C	1,58 ^{0,00} C	8,77 ^{0,19} A	45,04 ^{0,30} B	5,93 ^{0,19} D	0,43 ^{0,00} C	0,76 ^{0,01} A
Oleaginosa	53,43 ^{1,25} B	2,30 ^{0,09} B	6,67 ^{0,21} D	37,60 ^{1,11} C	9,35 ^{0,50} A	0,52 ^{0,01} B	0,53 ^{0,03} B
CV(%)	1,43	5,87	1,98	1,56	3,72	5,90	2,77
P Valor	≤ 0,0000	≤ 0,0000	≤ 0,0000	≤ 0,0000	≤ 0,0000	≤ 0,0001	≤ 0,0000

Letras maiúsculas diferentes na coluna indica diferença significativa entre as médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0.05$). Valores em sobrescrito representam o desvio padrão da média.

sua composição (Tabela 1). Esses resultados indicam que esses compostos são mais bioativos e estabilizados que os demais estudados,²⁸ e contam com maior qualidade e funcionalidade no solo e em aplicações ambientais. O solo é o maior reservatório de carbono terrestre, e o aumento dos estoques, com a volta desse composto ao solo pela ciclagem do nutriente, tem grande importância devido as preocupações com as alterações climáticas.^{29,2}

Em todas as amostras de AH analisadas, os níveis de N encontrados foram maiores que a média, e variaram de 6,67 a 8,77% (Tabela 1). Esses altos valores de N podem ocorrer como consequência da atividade microbiana e da rápida decomposição dos tecidos vegetais que antes faziam parte da matéria orgânica presente nas biomassas.³⁰ Os AH de origem lignocelulósica apresentaram maior valor de N (Tabela 1), indicando menor grau de humificação em comparação às outras fontes estudadas.

Os níveis de oxigênio variaram de acordo com o padrão da IHSS, com valores entre 31,63 e 46,92% (Tabela 1). Os maiores teores de O observados nos AH de origem amilácea e lignocelulósica sugerem maior acidez desses compostos e estão diretamente relacionados com uma maior presença de grupamentos funcionais oxigenados, como carboxilas (CO_2H), carbonilas (CO) e hidroxilas (OH), sendo atribuídas à maior capacidade de interação e formação de complexos com metais.^{17,31} Nos AH de origem sacarídea e oleaginosa, foram observados menores teores de O, indicando menor índice de oxidação desses compostos, e maior presença de grupos aromáticos em sua composição.^{32,18}

A razão atômica C/N variou de 5,93 a 9,35, e foi maior no AH de origem oleaginosa (Tabela 1). Essa razão foi mais elevada pelo alto teor de C no material húmico em contraste com um menor teor de N. Uma relação C/N variando de 10 a 20 é considerada alta e sugere a presença de fragmentos vegetais na estrutura do material.³³ O AH de origem oleaginosa foi o que mais chegou perto dessa alta relação, e significa que o baixo teor de N pode limitar o crescimento microbiano, resultando em menor degradação do C. Resultados semelhantes foram encontrados em frações húmicas extraídas de vermicompostos de esterco bovino.³⁴

Menor razão C/N foi observada nos AH de origem

lignocelulósica, onde o baixo teor de C no material húmico juntamente com alto teor de N resultou na menor razão (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados em AH derivados de esterco de cavalo cru, justificando que a matéria orgânica da matéria-prima continha grande quantidade de substâncias nitrogenadas em sua composição, ocasionando em compostos com menor grau de humificação.³⁵

A razão atômica H/C variou de 0,43 a 0,61, com maior valor nos AH de origem sacarídea (Tabela 1). A relação H/C é um indicativo do grau de insaturação (presença de ligações duplas e/ou triplas na composição) e aromaticidade dos compostos húmicos.³⁶ Valores elevados da razão H/C indicam maior alifaticidade e menor teor de estruturas aromáticas nos compostos húmicos.²⁵ Menores valores da razão H/C indicam maior grau de saturação, e caráter aromático do C, com maior quantidade de ligações duplas.^{36,37} Como observados nos AH de origem lignocelulósica (Tabela 1), essa característica sugere uma alta resistência das estruturas aromáticas aos processos de degradação e oxidação.³⁸

A razão O/C variou de 0,41 a 0,80, e foi maior nos AH de origem amilácea e lignocelulósica (Tabela 1). Essa razão estima a abundância de oxigênio contido nos grupos funcionais bioativos, indicando menor grau de humificação, sugeridos aos AH supracitados pelos maiores teores observados. Uma alta razão também indica maiores teores de alifaticidade, com presença de maior quantidade de grupos funcionais oxigenados carboxílicos e carboidratos nos compostos húmicos.³⁹

3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C)

Para a interpretação dos dados qualitativos dos espectros de RMN ^{13}C , foram realizadas interpretações baseadas no deslocamento químico (δ), multiplicidade e integração dos sinais observados. Os espectros foram automaticamente integrados nas principais regiões de deslocamento químico (δ): δ 165-200 (carbonilas, cetonas, amidas, aldeídos), δ 150-165 (C aromáticos substituídos), δ 110-150 (C aromáticos não substituídos), δ 95-110 (carbono anomérico),

δ 65-95 (sistemas C-O em álcool e ésteres), δ 45-65 (grupos C-N e carbonos alifáticos ramificados), δ 25-45 (carbonos sp^3 principalmente CH₂) e δ 0-25 (carbono sp^3 principalmente CH₃). As áreas correspondentes a C alquílicos (δ 0-40) e de anéis aromáticos (δ 110-160) foram somadas para quantificar o conteúdo de C hidrofóbico. Da mesma forma, as áreas nos intervalos entre δ 160-200, δ 90-110, δ 60-90 e δ 40-60 foram usadas para estimar a quantidade de carbono hidrofílico. Os espectros obtidos apresentaram picos de absorção atômica nas quatro regiões principais de deslocamentos químicos do carbono 13 (Figura 1).

Observa-se um padrão espectral nos AH de vermicompostos oriundos das diferentes fontes de biomassas.³⁴ Os picos na primeira região, de 0-50 ppm, compreendem aos alcanos, e indicam a presença de ligações simples com -CH₃ terminal, pertencente à cadeia de carbonos alifáticos. A região de 45-100 ppm, indica a presença de cadeia de carbonos alifáticos ligados a moléculas de N, O e S, e há presença de açúcares simples (formados por 3 a 9 átomos de carbono) como a glicose. A região de 100-150 ppm, indica a presença de carbonos aromáticos (hidrocarbonetos), e carbonos heteroaromáticos.

Por fim, na região entre 150-200 ppm, há presença de amidas, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos.

Na região de 0-50 ppm, os AH de origem amilácea apresentaram pico mais acentuado, indicando maior presença de alcanos (hidrocarbonetos de ligações simples) de mais fácil degradação, com maior presença de estruturas alifáticas de ligações simples do tipo C alifáticos – (H, R), o que configura o caráter mais alifático desse material húmico; a região 50-100 ppm, compreende a região dos açúcares simples como a glicose, onde os AH sacarídicos apresentaram picos mais intensos, com presença de estruturas alifáticas funcionalizadas do tipo C alifáticos – (O, N e S). Nos AH de origem amilácea há um pico de menor intensidade entre 50 e 100 ppm em comparação aos demais AH, indicando menor presença de açúcares.

Na região de 100-150 ppm, há presença de grupos aromáticos e compostos heterocíclicos de 5 ou 6 membros, contendo um ou dois heteroátomos como N, O ou S, levando a diminuir a aromaticidade do anel, quando expostos a mudanças no pH do meio, aumentando sua reatividade pela maior eletronegatividade dos átomos onde os AH de origem oleaginosa e lignocelulósica apresentaram picos

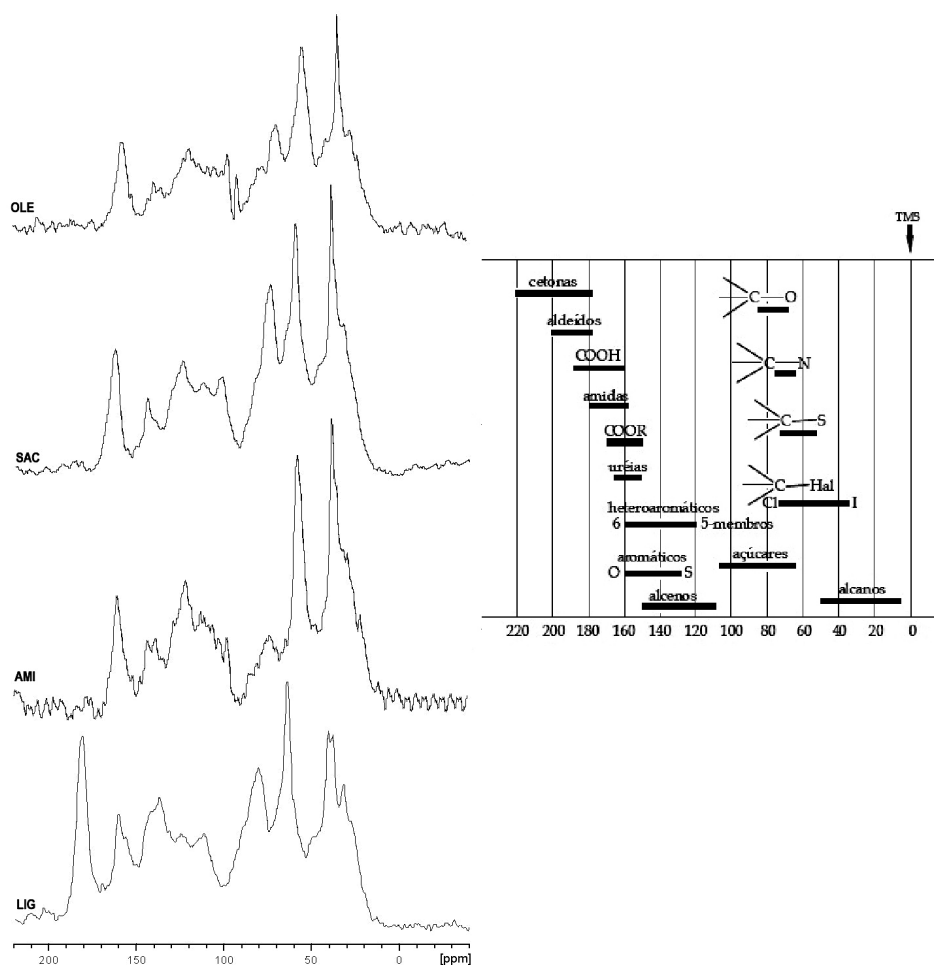


Figura 1. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ácidos húmicos oriundos de vermicompostagem de biomassas agrícolas de fontes oleaginosa (OLE), sacarídea (SAC), amilácea (AMI) e lignocelulósica (LIG)

mais intensos; e na região de 150-200 ppm, os AH de origem lignocelulósica apresentaram picos mais intensos, com presença de amidas (C=O ligadas a um N, pertencentes às funções nitrogenadas), aldeídos (ligações -CHO na extremidade do composto orgânico), cetonas (C=O) e ácidos carboxílicos (compostos orgânicos oxigenados COOH), configurando uma região com compostos mais resistentes à degradação, onde os AH de origem amilácea apresentaram picos de menor intensidade (Figura 1).

As amostras de AH caracterizados possuem um padrão estrutural semelhante, independente da fonte de origem, porém, com quantidades relativas diferentes de estruturas químicas em sua composição, pelas maiores ou menores intensidades dos picos de absorção (Figura 1). Essas diferenças estruturais geram propriedades diferentes em cada AH, como os índices de hidrofilicidade, hidrofobicidade, aromaticidade e alifaticidade, com intensidades diferentes para cada AH. Como demonstrado anteriormente por pesquisadores, a fonte de material vegetal C3 ou C4 não apresenta efeitos claros nas características estruturais das frações húmicas, que são semelhantes entre si. No entanto, as propriedades geradas a partir destas estruturas são diferentes.²⁷

3.3. Regiões de deslocamento químico (δ) dos espectros

A quantidade relativa de estruturas obtida a partir da espectroscopia de RMN do ^{13}C , demonstrou que os AH estudados possuem semelhanças na composição química, mas com funcionalidades diferentes: os compostos de origem oleaginosa e lignocelulósica possuem maior presença de domínios hidrofóbicos, e os de origem amilácea e sacarídea, mais hidrofílicos (Tabela 2).

Foi observado que o AH de origem oleaginosa possui maior grau de aromaticidade, com 37,2% de estruturas aromáticas, em comparação aos demais AH cujos valores decrescem na seguinte ordem: amilácea > lignocelulósica > sacarídea, com 29,0%, 28,3% e 25,5%, respectivamente (Tabela 2).

O grau de aromaticidade (%) é expresso pela equação: $[(\text{Integração de } 110-160 \text{ ppm}) / (\text{Integração de } 0 \text{ a } 160 \text{ ppm})] \times 100$.⁴⁰ A natureza aromática dos AH pode ser considerada

um indicador de estabilidade contra a degradação química e biológica, e pode estar associada à formação de uma rede molecular complexa e heterogênea, proporcionando maior recalcitrância ao material húmico.^{11,27} De acordo com o grau de aromaticidade, os AH de origem oleaginosa podem ser considerados mais estáveis que os demais estudados.

A hidrofobicidade (HB) foi maior nos AH de origem oleaginosa, com 57,3 ppm na composição da amostra (Tabela 2). Um maior índice de hidrofobicidade indica que o material em questão se encontra mais estabilizado, onde materiais com alto grau de estabilização tendem a apresentar maior quantidade de substâncias apolares em sua constituição química.⁴¹

A hidrofilicidade (HI) foi maior nos AH de origem sacarídea, com 59,55% de domínios hidrofílicos, seguidos dos AH de origem amilácea, com 55,70 ppm, indicando maior caráter alifático desses materiais húmicos (Tabela 2). Os AH de origem oleaginosa e lignocelulósica apresentam caráter menos alifático, com 41,85 e 44,70 ppm de domínios hidrofílicos, respectivamente (Tabela 2). De acordo com o modelo supramolecular, as substâncias húmicas são organizadas em grupos de diversos compostos orgânicos agregados, de baixa massa molecular, onde os ácidos fúlvicos possuem domínios predominantemente hidrofílicos, e os AH, domínios hidrofílico-hidrofóbicos,³² como aqui observados nas diferentes fontes (Tabela 2).

A razão HB/HI mede o índice de hidrofobicidade, e foi maior nos AH de origem oleaginosa (Tabela 2). Quanto maior esse índice, mais humificado e resistente à degradação é o material húmico. Isso significa que a parcela lábil já foi consumida, logo, um maior índice de hidrofobicidade indica que o material em questão se encontra mais estabilizado.⁴²

3.4. Acidez total, carboxílica e fenólica e razão E_4/E_6

A acidez total, a carboxílica e a fenólica estão representadas na Tabela 3, e não foram observadas diferenças estatísticas entre os compostos húmicos analisados.

Os valores observados nos teores dos grupos funcionais ácidos indicam similaridade no número de mols de H^+ disponíveis para reações químicas, caracterizando a bioatividade desses compostos.^{43,44}

Tabela 2. Distribuição relativa dos deslocamentos químicos do carbono 13 (^{13}C) em ppm dos espectros obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) via CP/MAS de ácidos húmicos (AH) oriundos de diferentes fontes de biomassas agrícolas

Ácidos Húmicos	Deslocamentos Químicos				GA	HB	HI	HB/HI
	ppm							
	160-200	110-160	40-110	0-40				
					%			
Oleagínosa	12,05	32,70	29,80	24,60	37,5	57,30	41,85	1,37
Sacarídea	18,80	22,20	40,75	24,20	25,5	46,40	59,55	0,78
Amilácea	20,80	22,50	34,90	20,30	29,0	42,80	55,70	0,77
Lignocelulósica	10,25	24,30	34,45	27,15	28,3	51,45	44,70	1,15

Onde: grau de aromaticidade (GA) = deslocamento 110-160/ soma dos deslocamentos de 0-160 ppm multiplicados por 100; hidrofobicidade (HB) = soma das regiões de 0-40 e 110-160 ppm; hidrofilicidade (HI) = das regiões 40-110 e 160-200 ppm, e a razão HB/HI, que corresponde ao grau de hidrofobicidade dos compostos.

Tabela 3. Acidez total, carboxílica (COOH) e fenólica (OH) (obtida por diferença) e razão entre a absorbância em 465 e 665 nm, no espectro UV-Vis (E_4/E_6) dos ácidos húmicos extraídos de vermicompostos de fontes sacarídea, lignocelulósica, oleaginosa e amilácea

Ácidos Húmicos	Grupos Funcionais Ácidos			Razão E_4/E_6
	Acidez Total	COOH	OH Fenólico	
		mmol H ⁺ /g		
Sacarídea	3,38±1,83a	1,47±0,39a	1,92±1,48a	3,64±0,08b*
Lignocelulósica	2,10±1,19a	1,79±0,17a	0,32±1,07a	4,63±0,08a
Oleaginosa	2,07±0,77a	1,63±0,46a	0,45±1,22a	4,93±0,60a
Amilácea	3,00±2,07a	1,47±0,26a	1,54±2,04a	4,67±0,16a
CV(%)	58,78	21,44	141,68	7,07
P Valor	≤ 0,6700	≤ 0,6281	≤ 0,5083	≤ 0,0050

Médias seguidas da mesma letra não se diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0.05$). *Média significativa

A razão E_4/E_6 observada no espectro UV-Vis, variou de 3,63 a 4,93, e foi menor nos AH de origem sacarídea (Tabela 3). Essa menor razão E_4/E_6 é um forte indicativo de haver maiores graus de humificação e estabilidade do composto pela presença de maiores quantidades de estruturas aromáticas encontradas nesse material húmico.^{16,22}

A razão E_4/E_6 para diversos AH normalmente apresenta valores inferiores a 5,⁴⁵ corroborando os resultados encontrados. Uma menor razão E_4/E_6 geralmente tem relação com maiores valores da acidez total, devido a maiores quantidades de CO₂ presentes nos AH, caracterizada pela evolução química, em consequência do avanço do processo de humificação.⁴⁴ Essa tendência foi observada no composto de origem sacarídea, e anteriormente relatadas em estudos.^{43,46} Maiores razões E_4/E_6 observadas nos AH de origens lignocelulósica, oleaginosa e amilácea (Tabela 3) são indicativos de menor grau de estabilidade, devido a menores massas moleculares e número de ligações duplas conjugadas nesses AH.⁴² Analisando a variável da razão E_4/E_6 , podemos considerar que os AH de origem sacarídea apresentam melhor qualidade devido ao grau de estabilidade, em comparação com os outros AH estudados.

3.5. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) e IV de emissão da Fluorescência

Foram observadas bandas de absorção comuns e bem definidas nos espectros dos quatro ácidos húmicos analisados, variando, principalmente, em intensidade (Figura 2A).

Os principais grupos químicos funcionais revelados pelos picos de absorção nos espectros FT-IV foram: vibrações de estiramento –OH e/ou –NH (álcoois, ácidos carboxílicos e amidas) com banda intensa, forte e larga e centro em, aproximadamente, 3448 cm⁻¹; estiramento simétrico de ligações C–H, especialmente grupos alifáticos de metila (CH₃) e metileno (CH₂) com centro em ~2917; vibrações C=C dos anéis aromáticos e ao estiramento simétrico das ligações C=O pertencentes às amidas e quinonas, com banda forte e alargada com centro em ~1641 cm⁻¹; estiramentos de C–O fenólico, deformação –COOH dos ácidos carboxílicos

e C–H alifático e estiramento assimétrico de C=O de carboxilatos com centro em ~1380 cm⁻¹; grupos –OH de álcoois alifáticos e polissacarídeos com centros em ~1027 e ~1095 cm⁻¹; deformação no plano e fora do plano de C–H aromático correspondem a banda de centro ~910 cm⁻¹; picos de halogênios como cloro, iodo e bromo, atribuídas a vibrações de impurezas inorgânicas nas bandas entre 545 e 399 cm⁻¹.³¹

A presença de grupos químicos funcionais comuns entre os AH analisados indicam que há semelhança na composição química desses compostos (Figura 2A). Em estudos com fontes de AH oriundos da vermicompostagem de diferentes biomassas (de metabolismos C3 e C4), também foram observados espectros de IV com picos de absorção semelhantes entre os compostos. Nesse estudo, os autores atribuíram que as diferenças observadas na bioatividade entre os AH residem na interação entre moléculas e na sua reorganização espacial, que é caracterizada pela supramolecularidade.²⁷

A principal diferença observada entre os AH aqui estudados foi na intensidade das bandas de absorção, que se apresentaram mais intensas nos AH de origem sacarídea (Figura 2A). Essa maior intensidade observada pode resultar em maiores bioatividade e qualidade desse composto húmico, que provavelmente conta com maior número de ligações dos grupamentos químicos em sua estrutura.³¹ E, de forma comparativa, os AH de origem amilácea podem apresentar menor qualidade devido a menor intensidade nos picos de absorção.

Na região entre 1400 e 900 cm⁻¹, conhecida como área de “impressão digital”,¹⁶ os picos de absorção dos AH também variaram apenas em intensidade, com destaque aos AH de origem sacarídea (Figura 2A). Essa região é onde ficam as estruturas químicas que conferem a bioatividade dos AH, como os ácidos carboxílicos, fenólicos e vibrações de polissacarídeos, podendo indicar similaridade na funcionalidade dos espectros analisados, com maiores estabilidade química e qualidade nos AH de origem sacarídea.

Nos picos de absorção em 1027 e 1095 cm⁻¹ referentes às estruturas polissacarídicas, são encontrados compostos

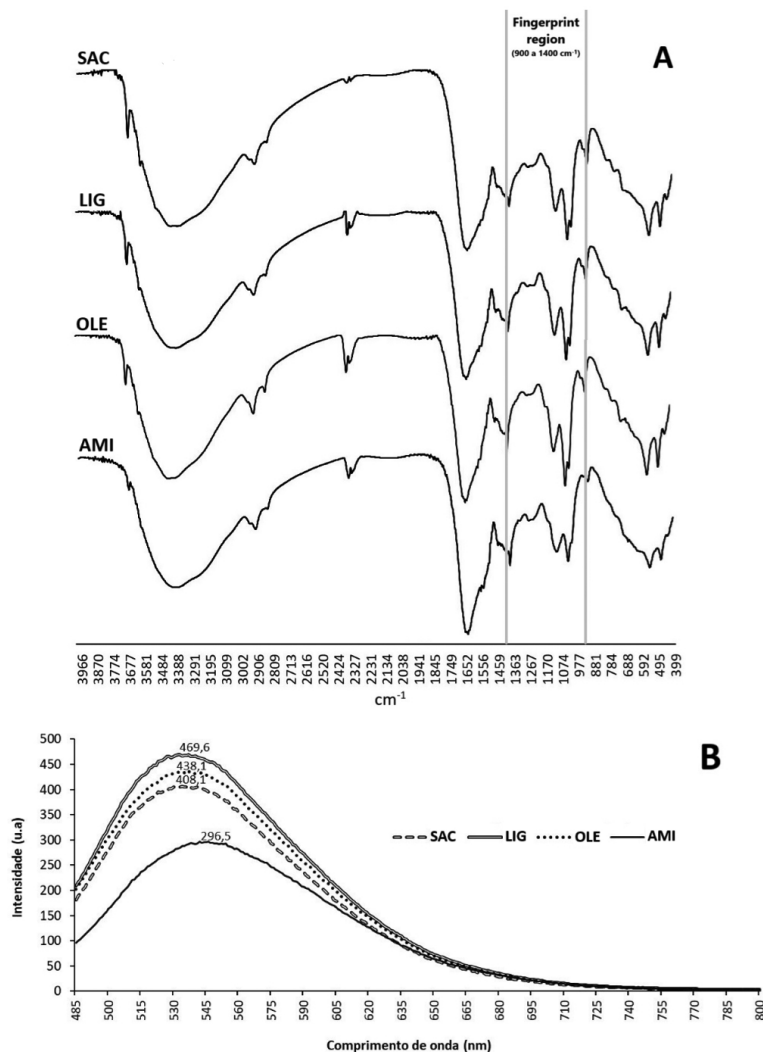


Figura 2. (A) Espectros infravermelhos com transformada de Fourier (FT-IV) e (B) espectros de intensidade de fluorescência (região do ultravioleta-visível) de ácidos húmicos de vermicompostos de fontes sacarídea (SAC), lignocelulósica (LIG), oleaginosa (OLE) e amilácea (AMI)

que apresentam funções bioestimulantes importantes na fisiologia das plantas na rede de sinalização contra estresses,^{47,22} onde, novamente, os AH de origem sacarídea apresentaram maior intensidade de absorção. No pico de absorção em 1380 cm^{-1} , os estiramentos e vibrações de ácidos carboxílicos e fenóis, tem papel importante em diversos processos fisiológicos, e são compostos que promovem melhorias nos mecanismos de defesa das plantas, pois possuem propriedades antioxidantes.⁴⁸ A intensidade nos picos de absorção observada no espectro IV-TF evidencia os AH de origem sacarídea como superior aos demais estudados.

Os espectros de fluorescência no IV obtidos no modo de emissão para os diferentes AH apresentaram ombro em, aproximadamente, 515 nm, com picos de comprimento de onda centrados em 536 e 546 nm (Figura 2B). Foram observadas diferenças apenas nas intensidades dos picos, em que os AH de origem sacarídea se mostraram superiores aos demais. Os comprimentos de ondas observados entre

536 e 546 nm indicam elevado peso molecular em todos os AH, pela presença de estruturas de anéis aromáticos condensados. Os compostos húmicos que apresentam comprimentos de ondas maiores que 500 nm são capazes de alto grau de conjugação com grupos substituintes doadores de elétrons carboxílicos e carbonílicos, o que resulta na sua bioatividade.⁴⁹

Maior intensidade da fluorescência foi observada nos AH de origem sacarídea (Figura 2B), com 469.6 u.a. Essa característica está diretamente relacionada à evolução das substâncias húmicas,⁵⁰ pois há forte tendência desse composto apresentar maiores níveis de policondensação aromática e cromóforos conjugados, resultando num maior grau de humificação, e presença de grupos de ligações de moléculas bioativas.⁴⁹ Menor intensidade de fluorescência foi observada nos AH de origem lignocelulósica, com 296.5 u.a (Figura 2B), sendo este um indicativo de haver menores quantidades de moléculas bioativas presentes em sua composição. Este composto tende a apresentar maiores

teores de lignina, deixando o material naturalmente mais resistente à degradação, resultando num menor grau de humificação.⁵¹

Os AH são amplamente conhecidos como reguladores positivos do crescimento e desenvolvimento das plantas, e sua caracterização química e espectroscópica possui significativa importância socioeconômica, pois impacta diretamente na agricultura e no meio ambiente. Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos acerca dos benefícios desses compostos no metabolismo das plantas e no solo. Em estudos com plântulas de diversas culturas como tomate, milho e pepino, pesquisadores observaram que a aplicação de AH de fontes distintas resultou em melhores desempenhos no desenvolvimento inicial das raízes e influenciou na bioatividade em plantas, sendo altamente dependentes do material de origem.¹¹ Trabalhos assim ressaltam a importância de se ter as características químicas e estruturais elucidadas para um melhor entendimento do comportamento desses compostos na natureza.

García *et al.*⁵³ realizaram uma revisão abrangente sobre a estrutura-função dos AH nas plantas e no solo, destacando que a composição química e estrutural desses compostos permite a caracterização e quantificação de propriedades que definem as suas funções específicas. Assim como Rose *et al.*⁹, em extensa revisão, classificaram os fatores que contribuem para a promoção positiva do crescimento em plantas, dentre eles, a fonte de extração, espécie da planta e tipo de aplicação dos AH. A complexidade estrutural, composicional e organizacional dos AH são possíveis de serem quantificadas mediante técnicas espectroscópicas, e esse conjunto de informações pode ajudar a entender o papel desse grupo a fim de recomendar e padronizar a aplicação nos mais diversos tipos de cultivos vegetais.

4. Conclusões

Maiores teores de carbono foram encontrados nos AH de origem sacarídea e oleaginosa, indicando maior qualidade e funcionalidade desses compostos no solo e em aplicações ambientais.

A razão E_4/E_6 foi particularmente útil para distinguir os AH de origem sacarídea dos demais, pois a menor relação observada nesses compostos sugere um grau de humificação e estabilidade mais elevados em comparação aos outros.

A quantidade relativa de estruturas obtidas a partir da espectroscopia de RMN do ^{13}C mostrou que todos os AH estudados possuem semelhanças na composição química.

Os espectros de IV com transformada de Fourier e as intensidades de fluorescência dos AH analisados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em termos de funcionalidade química. No entanto, os AH de origem sacarídea destacaram-se por apresentar maiores intensidades nos espectros, evidenciando um grau superior de humificação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa para a primeira autora, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelos auxílios financeiros (Processos: APQ-06603-24; APQ00422-23 e APQ-00437-21), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP 01.22.0118.00), ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e ao Instituto de Ciências Agrárias da UFVJM.

Contribuições dos Autores

Amanda R M Campos: Conceituação, Curadoria de Dados, Pesquisa, Software, Redação do Rascunho Original, Redação-revisão e Edição; Jader G Busato: Pesquisa, Validação, Visualização; Aline L de Oliveira: Pesquisa, Software; Alan R Mol: Pesquisa, Validação, Visualização; Raquel A Alves: Validação, Visualização; Francilene L Ferreira: Pesquisa, Validação; Leonardo B Dobbbs: Conceituação, Aquisição de Financiamento para Análise Formal, Pesquisa, Administração de Projetos, Recursos, Software, Validação, Visualização, Redação-revisão e edição.

Referências Bibliográficas

1. Jat, M. L.; Chakraborty, D.; Ladha, J. K.; Rana, D. S.; Gathala, M. K.; McDonald, A.; Gerard, B.; Conservation agriculture for sustainable intensification in South Asia. *Nature Sustainability* **2020**, *3*, 336. [Crossref]
2. Datta, A.; Choudhury, M.; Sharma, P.C.; Jat, H.S.; Jat, M.L.; Kar, S.; Stability of humic acid carbon under conservation agriculture practices. *Soil and Tillage Research* **2022**, *216*, 105240. [Crossref]
3. Lim, S. L.; Wu, T. Y.; Lim, P. N.; Shak, K. P. Y.; The use of vermicompost in organic farming: overview, effects on soil and economics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2015**, *95*, 1143. [Crossref] [PubMed]
4. Hajam, Y. A.; Kumar, R.; Kumar, A.; Environmental waste management strategies and vermi transformation for sustainable development. *Environmental Challenges* **2023**, *13*, 100747. [Crossref]
5. Ali, U.; Sajid, N.; Khalid, A.; Riaz, L.; Rabbani, M. M.; Syed, J. H.; Malik, R. N.; A review on vermicomposting of organic wastes. *Environmental Progress & Sustainable Energy* **2015**, *34*, 1050. [Crossref]
6. Sharafabad, Z. H.; Abdipour, M.; Hosseinfarahi, M.; Kelidari, A.; Rashidi, L.; Integrated humic acid and vermicomposting changes essential oil quantity, and quality in field-grown *Lavandula angustifolia* L. intercropped with *Brassica nigra* L. *Industrial crops and products* **2022**, *178*, 114635. [Crossref]

7. Singh, A.; Karmegam, N.; Singh, G. S.; Bhadauria, T.; Chang, S. W.; Awasthi, M. K.; [Sudhakar, S.](#); [Arunachalam, K. D.](#); [Biruntha, M.](#); Ravindran, B.; Earthworms and vermicompost: an eco-friendly approach for repaying nature's debt. *Environmental Geochemistry and Health* **2020**, *42*, 1617. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Sutton, R.; Sposito, G.; Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 9009. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. Rose, M. T.; Patti, A. F.; Little, K. R.; Brown, A. L.; Jackson, W. R.; Cavagnaro, T. R.; A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy* **2014**, *124*, 37. [[Crossref](#)]
10. Piccolo, A.; The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* **2001**, *166*, 832. [[Crossref](#)]
11. Nardi, S.; Schiavon, M.; Francioso, O.; Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules* **2021**, *26*, 2256. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
12. Ampong, K.; Thilakarathna, M. S.; Gorim, L. Y.; Understanding the role of humic acids on crop performance and soil health. *Frontiers in Agronomy* **2022**, *4*, 848621. [[Crossref](#)]
13. Sible, C. N.; Seebauer, J. R.; Below, F. E.; Plant biostimulants: A categorical review, their implications for row crop production, and relation to soil health indicators. *Agronomy* **2021**, *11*, 1297. [[Crossref](#)]
14. Gollenbeek, L.; Van Der Weide, R.; Prospects for humic acid products from digestate in the Netherlands. *Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Open Teelten* **2020**, *5*, 40. [[Crossref](#)]
15. Souza, C. C. B.; Oliveira, D. F.; Souza, R. S.; Souza, A. F. F.; Costa, T. G. A.; Lima, B. R.; Souza, W. S.; Santos, O. A. Q.; Pinheiro Junior, C. R.; Leite, F. F. G. D.; Moura, O. V. T.; Aguiar, T. C.; Lázaro, M. L.; Lima, A. C. B. P.; García, A. C.; Diferenciação de ácidos húmicos de diferentes origens mediante RMN de ^{13}C via CP/MAS e ATR-FTIR aliado a quimiometria. *Revista Virtual de Química* **2021**, *13*, 371. [[Crossref](#)]
16. Dobbss, L. B.; Rumjanek, V. M.; Baldotto, M. A.; Velloso, A. C. X.; Canellas, L. P. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de Latossolos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2009**, *33*, 51. [[Crossref](#)]
17. Zhang, Y.; Li, Y.; Chang, L.; Zi, C.; Liang, G.; Zhang, D.; Su, Y.; A comparative study on the structural features of humic acids extracted from lignites using comprehensive spectral analyses. *RSC Advances* **2020**, *10*, 22002. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
18. De Araújo, K. V.; Horák-Terra, I.; Busato, J. G.; Lima, A.; Mol, I. R.; Souza, I. S.; Poceschi e Campos, H. R.; & Dobbss, L. B.; Caracterização Química e Espectroscópica de Ácidos Húmicos Isolados de Solos de Veredas do Brasil Central. *Revista Virtual de Química* **2025**, *17*, 155. [[Crossref](#)]
19. Pimenta, A. S.; Santana, J. A. S.; Dos Anjos, R. M.; Benites, V. M.; Araújo, S. O.; Caracterização de ácidos húmicos produzidos a partir de carvão vegetal de duas espécies florestais do semi-árido: Jurema preta, Mimosa tenuiflora, e pereiro, *Aspidosperma pyrifolium*. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável* **2009**, *4*, 3. [[Link](#)]
20. Volpi, M. P. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, 2018. [[Link](#)]
21. Khatounian, C. A.; *A reconstrução ecológica da agricultura*, 1a. ed., Agroecológica: Botucatu, 2001.
22. Araújo, K. V.; Pittarello, M.; Carletti, P.; Campos, A. R. M.; Dobbss, L. B.; Structural characterization and bioactivity of humic and fulvic acids extracted from preserved and degraded brazilian cerrado biomes soils. *Eurasian Soil Science* **2021**, *54*, S16. [[Crossref](#)]
23. Kiehl, E. J.; *Fertilizantes orgânicos*, 1a. ed., Agrônômica Ceres: São Paulo, 1985.
24. Milori, D. M.; Martin-Neto, L.; Bayer, C.; Mielniczuk, J.; Bagnato, V. S.; Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science* **2002**, *167*, 739. [[Crossref](#)]
25. Olaetxea, M.; De Hita, D.; García, C. A.; Fuentes, M.; Baigorri, R.; Mora, V.; Garnica, M.; Urrutia, O.; Erro, J.; Zamarreño, A. M.; Berbara, R. L.; García-Mina, J. M.; Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth. *Applied Soil Ecology* **2018**, *123*, 521. [[Crossref](#)]
26. Ritchie, J. D.; Perdue, E. M.; Analytical constraints on acidic functional groups in humic substances. *Organic Geochemistry* **2008**, *39*, 783. [[Crossref](#)]
27. García, A. C.; De Souza, L. G. A.; Pereira, M. G.; Castro, R. N.; García-Mina, J. M.; Zonta, E.; Berbara, R. L. L.; Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific reports* **2016**, *6*, 20798. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Cotta, J. A. D. O.; Carvalho, N. L. C.; Brum, T. D. S.; Rezende, M. O. D. O.; Compostagem versus vermicompostagem: comparação das técnicas utilizando resíduos vegetais, esterco bovino e serragem. *Engenharia Sanitária e Ambiental* **2015**, *20*, 65. [[Crossref](#)]
29. Lal, R. K.; Maurya, R.; Chanotiya, C. S.; Gupta, P.; Mishra, A.; Srivastava, S.; Shukla, S.; On carbon sequestration efficient clones/genotypes selection for high essential oil yield over environments in Khus (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Robery). *Industrial Crops and Products*, **2020**, *145*, 112139. [[Crossref](#)]
30. Campos, L. P.; Leite, L. F. C.; Maciel, G. A.; Brasil, E. L.; Iwata, B. F.; Estoques e frações de carbono orgânico em Latossolo Amarelo submetido a diferentes sistemas de manejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2013**, *48*, 304. [[Crossref](#)]
31. Canellas, L. P.; Santos, G. D. A.; *Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*, 1a. ed., ed do Autor: Rio de Janeiro, 2005.
32. Baldotto, M. A.; Baldotto, L. E. B.; Ácidos húmicos. *Revista Ceres* **2014**, *61*, 856. [[Crossref](#)]
33. Campitelli, P.; Ceppi, S.; Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids. *Geoderma* **2008**, *144*, 325. [[Crossref](#)]
34. García, A. C.; Tavares, O. C. H.; Balmori, D. M.; Santos Almeida, V. D.; Canellas, L. P.; García-Mina, J. M.; Louro Berbara, R. L.; Structure-function relationship of vermicompost humic fractions for use in agriculture. *Journal of Soils and Sediments* **2018**, *18*, 1365. [[Crossref](#)]

35. Hanc, A.; Enev, V.; Hrebeckova, T.; Klucakova, M.; Pekar, M.; Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure. *Waste Management* **2019**, *99*, 1. [Crossref] [PubMed]
36. Stevenson, F. J.; *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*, 1a ed., John Wiley & Sons: New York, 1994.
37. Antunes, R. M.; Castilhos, R. M. V.; Castilhos, D. D.; Leal, O. D. A.; Dick, D. P.; Andreazza, R.; Transformações químicas dos ácidos húmicos durante o processo de vermicompostagem de resíduos orgânicos. *Engenharia Sanitaria e Ambiental* **2015**, *20*, 699. [Crossref]
38. Da Silva, R. R.; Lucena, G. N.; Machado, Â. F.; De Freitas, G. A.; Matos, A. T.; Abrahão, W. A. P.; Spectroscopic and elementary characterization of humic substances in organic substrates. *Comunicata Scientiae* **2018**, *9*, 264. [Crossref]
39. Fontana, A.; Brito, R. D.; Pereira, M. G.; Loss, A.; Benites, V. D. M.; Caracterização de substâncias húmicas da camada superficial do solo sob diferentes coberturas vegetais. *Magistra* **2010**, *22*, 49. [Link]
40. Malcolm, R. L.; Em *Variations between humic substances isolated from soils, stream waters, and groundwaters as revealed by ¹³C-NMR spectroscopy*; McCarthy, P.; Clapp, C. E.; Malcolm, R. L.; Bloom, P. R., eds, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America: Wisconsin, **1990**, cap. 2. [Crossref]
41. Dorez-Silva, P. R.; Landgraf, M. D.; Rezende, M. O. D. O.; Processo de estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem versus compostagem. *Química nova* **2013**, *36*, 640. [Crossref]
42. Dorez-Silva, P. R.; Landgraf, M. D.; Rezende, M. O.; Humification process in different kinds of organic residue by composting and vermicomposting: have microbioreactors really accelerated the process? *Environmental Science and Pollution Research* **2018**, *25*, 17490. [Crossref] [PubMed]
43. Sá, M. C.; Campos, A. R. M.; Evaristo, A. B.; Silva, R. S.; Dobbss, L. B.; Quality and bioactivity of humic substances from soils grown with cover crops. *Eurasian Soil Science* **2023**, *56*, 1420. [Crossref]
44. Rodda, M. R. C.; Canellas, L. P.; Façanha, A. R.; Zandonadi, D. B.; Guerra, J. G. M.; Almeida, D. L. D.; Santos, G. D. A.; Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto: I-efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2006**, *30*, 649. [Crossref]
45. Senesi, G. S.; Martin-Neto, L.; Villas-Boas, P. R.; Nicolodelli, G.; Milori, D. M.; Laser-based spectroscopic methods to evaluate the humification degree of soil organic matter in whole soils: a review. *Journal of Soils and Sediments* **2018**, *18*, 1292. [Crossref]
46. Miranda, C. D. C.; Canellas, L. P.; Nascimento, M. T.; Caracterização da matéria orgânica do solo em fragmentos de mata atlântica e em plantios abandonados de eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2007**, *31*, 905. [Crossref]
47. Bulgari, R.; Cocetta, G.; Trivellini, A.; Vernieri, P. A. O. L. O.; Ferrante, A.; Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture* **2015**, *31*, 1. [Crossref]
48. Muscolo, A.; Pizzeghello, D.; Francioso, O.; Sanchez-Cortes, S.; Nardi, S.; Effectiveness of humic substances and phenolic compounds in regulating plant-biological functionality. *Agronomy* **2020**, *10*, 1553. [Crossref]
49. Cunha, T. J. F.; Novotny, E. H.; Madari, B. E.; Martin-Neto, L.; De O Rezende, M. O.; Canelas, L. P.; De M Benites, V.; Em Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision; Woods, W. I.; Teixeira, W. G.; Lehmann, J.; Steiner, C.; WinklerPrins, A. M. G. A.; Rebellato, L., eds.; Springer: Dordrecht, 2009, cap. 20.
50. Milori, D. M.; Martin-Neto, L.; Bayer, C.; Mielniczuk, J.; Bagnato, V. S.; Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science* **2002**, *167*, 739. [Crossref]
51. Schmatz, A. A.; Tyhoda, L.; Brienzo, M.; Sugarcane biomass conversion influenced by lignin. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **2020**, *14*, 469. [Crossref]
52. Schnitzer, M.; Gupta, U. C.; Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society of America Journal* **1965**, *29*, 274. [Crossref]
53. García, A.; Castro, T. A.; Berbara, R. L. L.; Tavares, O. C. H.; Elias, S. S.; Amaral Sobrinho, N. M. B.; Pereira, M. G.; Zonta, E.; Revisão Sobre a Relação Estrutura-Função das Substâncias Húmicas e a sua Regulação do Metabolismo Oxidativo em Plantas. *Revista Virtual de Química* **2019**, *11*, 754. [Crossref]