



**RAYNER HUGO CASSA LOUZADA DOS REIS**

**PROTEÍNA DO SOLO RELACIONADA À GLOMALINA DE  
SOLOS TROPICAIS PARA REMOVER CÁDMIO EM  
SOLUÇÃO AQUOSA**

**LAVRAS-MG  
2023**

**RAYNER HUGO CASSA LOUZADA DOS REIS**

**PROTEÍNA DO SOLO RELACIONADA À GLOMALINA DE SOLOS TROPICAIS  
PARA REMOVER CÁDMIO EM SOLUÇÃO AQUOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro  
Orientador

**LAVRAS-MG**

**2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da  
Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo próprio autor.**

Reis, Rayner Hugo Cassa Louzada dos.

Proteína do solo relacionada à glomalina de solos tropicais  
para remover cádmio em solução aquosa / Rayner Hugo Cassa  
Louzada dos Reis. - 2023.

109 p. : il.

Orientador: Marco Aurélio Carbone Carneiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. elementos potencialmente tóxicos. 2. imobilização. 3.  
adsorção. I. Carneiro, Marco Aurélio Carbone. II. Título.

**RAYNER HUGO CASSA LOUZADA DOS REIS**

**PROTEÍNA DO SOLO RELACIONADA À GLOMALINA DE SOLOS TROPICAIS  
PARA REMOVER CÁDMIO EM SOLUÇÃO AQUOSA**

**GLOMALIN-RELATED SOIL PROTEIN FROM TROPICAL SOILS TO REMOVE  
CADMIUM IN AQUEOUS SOLUTION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de julho de 2023.

Dra. Isabela Cristina Filardi Vasques	UFV
Dr. Orivaldo José Saggin Junior	EMBRAPA
Dr. Arnon Afonso de Souza Cardoso	UFLA
Dr. Flavio Henrique Silveira Rabêlo	UFLA

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2023**

*À minha esposa, Carolina e ao meu filho, Théo Razak*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus. Ele foi, é e sempre será quem me guia, fortalece, ilumina meu caminho, orienta e a quem eu recorro em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais, Itamar Marques dos Reis e Rita Helena Cassa Louzada dos Reis por sempre, sempre me apoiarem em tudo, pelo sacrifício que fizeram e fazem nessa trajetória, pelos conselhos e todo amor demonstrado. Obrigado, pai e mãe, pelo apoio incondicional.

À minha família: minha esposa e meu filho Théo Razak, pelo amor, companheirismo, compreensão,

Aos meus tios: Julio, Mário, Paulo, Marta, Nadja, Thelma e Ossamu. Meus primos: Raphael Louzada, Daniel, Felipe e Rafael Marques.

Aos amigos: Marcus, Prs. Luiz Cláudio e Aline, David, Rafael Barbosa, Matheus Tototi, Matheus Mattaion, Rodrigo Gualberto e todos do time de futebol da “Vale Church”.

Ao meu orientador Marco Aurélio Carbone Carneiro. Obrigado. Obrigado por resgatar novamente a vontade de fazer ciência, de resgatar meus sonhos, de investir seu tempo e capacidade intelectual, amizade, conselhos, apoio e por ser um grande líder.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciência do Solo (DCS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) toda sua infraestrutura física e apoio pessoal: a todos os docentes e técnicos, em especial: Geila, Lívia, Mari e Alexandre.

Ao Departamento de Química, especialmente às técnicas do CAPQ Franciane e Lidiany, nas análises de FTIR e TGA e todo auxílio. Ao docente Prof. Guilherme Max por todo conhecimento dispensado, pelas muitas vezes solicitado e contribuiu para esta tese. Ao mestrando Danilo Benedicto, por auxiliar nas interpretações dos dados de infravermelho e adsorção.

Aos docentes Prof. Alberto Inda Vasconcelos Junior (UFRGS), Prof. Sérgio Henrique Godinho Silva (UFLA), Prof. Eduardo Alves (UFLA) pela contribuição com as análises e na interpretação dos resultados.

Aos colegas pós-doutorandos à época, Marisângela, Jessé, Arnon e Everton.

Aos alunos de iniciação científica, Ananda e Guilherme, que tanto me ajudaram na condução dos experimentos, análises e nas boas risadas e momentos leves que tivemos.

Aos colegas que fizeram essa jornada mais leve: Javier, Renan Previl, Maria Clara, Danilo, Alexandre Dias, Dra. Paula Ribeiro e Dr. Gabriel Caixeta.

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

**Muito obrigado!**

## RESUMO GERAL

O cádmio (Cd) é uma das substâncias mais perigosas e precisa ser imobilizado/removido em cenários de aumento iminente de sua concentração. Avaliar alternativas ecológicas, como a proteína do solo relacionada a glomalina (GRSP), para imobilização de Cd (II) se torna relevante. Caracterizações e experimentos de adsorção com GRSP de dois solos, oxídico e orgânico, foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade de imobilizar Cd em soluções aquosas. As hipóteses testadas foram i) a estrutura e composição elementar de GRSP difere conforme o tipo de pedossistema; ii) a interação entre GRSP-Cd é regulada pela complexação de superfície; e iii) a capacidade de adsorção de Cd por GRSP é fortemente modulada pelo pH e concentração. A tese foi dividida em dois capítulos: no capítulo 1 realizou-se as caracterizações por FTIR, XRF, XRD, SEM, TGA e de cargas elétricas ( $pH_{ZPC}$ ) de GRSP. A GRSP dos dois solos, de forma geral, grupos funcionais dominantes (CH, NH<sub>2</sub>, OH, COOH (carboxila), CO-NH (amida), C=O (carbonila), que contribuem para o sequestro e imobilização de Cd (II). Há presença marcante de goethita e gibbsita na GRSP dos dois solos. A morfologia de superfície mostrou que as GRSP eram sólidos floculentos, de peso leve, aspecto amorfo e com coloração típica do solo ao qual foram extraídas. TGA demonstrou que GRSP de Org tem massa residual sólida de 33.2%, enquanto GRSP LV, 58.3%, após aquecimento até 900 °C. No capítulo 2 avaliou-se a capacidade de adsorção de Cd (II) em soluções aquosas. Testes de adsorção para avaliar o efeito do pH e do tempo de contato foram realizados para obtenção dos parâmetros otimizados para as isotermas. Nas isotermas foram estudados dois adsorventes e 7 concentrações, 0.0625-3.0 mmol L<sup>-1</sup> de Cd (II). A eficiência de remoção (RE) e o  $q_e$  (capacidade de adsorção) para o Cd (II) em ambas as GRSP atingiram o máximo em pH 7 e em 24 h, respectivamente. Nas isotermas, RE para GRSP Org foi de, em média, 98%, e para GRSP LV, 94%. Com o aumento da concentração (até 3 mmol L<sup>-1</sup>), RE diminuiu para 92 e 88%. Os modelos isotérmicos testados para avaliar a interação GRSP-Cd foram de Langmuir, Freundlich e Sips. A adsorção de Cd (II) segue a ordem de Sips > Freundlich > Langmuir, ou seja, o modelo isotérmico de Sips à temperatura ambiente é o melhor ajuste. Nossas hipóteses são que os mecanismos de adsorção de Cd (II) pela proteína do solo relacionada à glomalina seja por atração eletrostática e complexação de superfície. GRSP de solos tropicais se torna uma excelente alternativa para imobilização de Cd (II).

**Palavras-chave:** Glomalina. Elementos potencialmente tóxicos. Cádmio. Adsorção.



## GENERAL ABSTRACT

Cadmium (Cd) is one of the most dangerous substances and needs to be immobilized/removed in scenarios of imminent increase in its concentration. Evaluating ecological alternatives, such as glomalin-related soil protein (GRSP), for Cd (II) immobilization becomes relevant. Characterizations and adsorption experiments with GRSP of two soils, oxidic and organic, were carried out with the aim of evaluating the ability to immobilize Cd in aqueous solutions. The hypotheses tested were i) the structure and elemental composition of GRSP differs according to the type of pedosystem; ii) the interaction between GRSP-Cd is regulated by surface complexation; and iii) the ability of Cd adsorption by GRSP is strongly modulated by pH, contact time and concentration. The thesis was divided into two chapters: in chapter 1 the characterizations by FTIR, XRF, XRD, SEM, TGA and electrical charges ( $pH_{ZPC}$ ) of GRSP were carried out. The GRSP of the two soils, in general, dominant functional groups (CH,  $NH_2$ , OH, COOH (carboxyl), CO-NH (amide), C=O (carbonyl), which contribute to the sequestration and immobilization of Cd (II). There is a marked presence of goethite and gibbsite in the GRSP of both soils. The surface morphology showed that the GRSP were flocculent solids, light weight, amorphous in appearance and with a typical color of the soil from which they were extracted. TGA demonstrated that GRSP-Org has a solid residual mass of 33.2%, while GRSP LV, 58.3%, after heating up to 900 °C. In chapter 2, the adsorption capacity of Cd (II) in aqueous solutions was evaluated. Adsorption tests to evaluate the effect of pH and contact time were performed to obtain optimized parameters for the isotherms. In the isotherms, two adsorbents and 7 concentrations were studied, 0.0625-3.0 mmol L<sup>-1</sup> of Cd (II). Removal efficiency (RE) and  $q_e$  (adsorption capacity) for Cd (II) in both GRSP reached a maximum at pH 7 and at 24 h, respectively. In the isotherms, RE for GRSP Org was, on average, 98%, and for GRSP LV, 94%. With increasing concentration (up to 3 mmol L<sup>-1</sup>), RE decreases to 92 and 88%. The isothermal models tested to evaluate the GRSP-Cd interaction were from Langmuir, Freundlich, Sips and Temkin. The adsorption of Cd (II) follows the order of Sips > Freundlich > Langmuir, that is, the Sips isothermal model at room temperature is the best fit. Our hypotheses are that the mechanisms of Cd (II) adsorption by glomalin-related soil protein are electrostatic attraction and surface complexation. GRSP from tropical soils becomes an excellent alternative for Cd (II) immobilization.

**Keywords:** Glomalin. Potentially toxic elements. Cadmium. Adsorption.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Atividades antrópicas e elementos potencialmente tóxicos</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Valores de referência para solos e águas subterrâneas</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Cd em águas e humanos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4 Efeito tóxico de Cd em organismos</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5 Remediação de áreas contaminadas</b> .....	<b>16</b>
<b>2.6 Breve histórico da ‘glomalina’ e terminologias</b> .....	<b>17</b>
<b>2.6.1 GRSP em solos tropicais e temperados</b> .....	<b>18</b>
<b>2.6.2 Efeito de GRSP na manutenção da saúde do solo</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6.3 Uso de GRSP frente aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7 Obtenção de GRSP</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7.1 Extração e quantificação de GRSP</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7.2 Purificação de GRSP</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7.3 Liofilização</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8 Interação GRSP <i>versus</i> elementos potencialmente tóxicos</b> .....	<b>27</b>
<b>3 Caracterização de GRSP</b> .....	<b>29</b>
<b>4 Ensaios de adsorção</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Adsorção e os mecanismos que governam esse processo</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2 Cinética de adsorção</b> .....	<b>42</b>
<b>4.3 Isotermas de adsorção</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	<b>60</b>
<b>Artigo 1 - Caracterização da proteína do solo relacionada à glomalina em diferentes pedoambientes tropicais</b> .....	<b>60</b>
<b>Artigo 2 - Cd(II) biosorption in glomalin-related protein from tropical soils in Brazil</b> ..	<b>90</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>109</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O cádmio (Cd) é um dos metais pesados mais desafiadores devido à sua alta toxicidade e fácil transferência dos solos e para as plantas, encontrado também em águas subterrâneas e atingindo outros organismos vivos (Pendias & Szteke, 2015). As principais propriedades físico-químicas do Cd são: solubilidade, toxicidade, complexação, mobilidade, disponibilidade para organismos e adsorção. O Cd tem a capacidade de complexar com  $\text{OH}^-$  em pH acima de 8, encontra-se na forma iônica livre ( $\text{Cd}^{2+}$ ) em pH ácido a neutro, pode ser adsorvido aos constituintes do solo e componentes orgânicos por complexação de superfície através de grupamento funcionais ou atração eletrostática, tem alta mobilidade em solos arenosos, com pH ácido e baixo poder tampão, além de pode entrar na cadeia trófica pela absorção por raízes de plantas (Pendias & Szteke, 2015) tornando-o uma das substâncias mais perigosas mais os seres humanos (ATSDR, 2022).

No mundo inteiro, pesquisadores têm concentrado seus estudos a fim de buscar novas alternativas para imobilizar/remover Cd de diferentes matrizes ambientais. Uma proposta é estudar uma glicoproteína recalcitrante produzida por fungos do solo capaz de sequestrar/imobilizar EPTs, inclusive o Cd, em solos, sedimentos, águas e outras matrizes (González-Chávez et al., 2004; Wang et al., 2021; Lin et al., 2023). A proteína do solo relacionada à glomalina (GRSP) tem diversas funções benéficas ao solo e organismos, e três delas se destacam: agregação e estabilização de agregados, sequestro de carbono e imobilização de substâncias tóxicas aos organismos (Barbosa et al., 2019; Liu et al., 2022; Agnihotri et al., 2022; Singh et al., 2022). Na função ecológica de imobilizar substâncias tóxicas, as pesquisas têm se concentrado em estudar a interação entre GRSP e elementos potencialmente tóxicos (EPTs) (Wang et al., 2021; Yuan et al., 2022; Lin et al., 2023) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs (Gao et al., 2017; Chen et al., 2020; Zhou et al., 2023).

Com o propósito de realizar uma caracterização detalhada de GRSP e compreender sua interação com EPTs, estudos de caracterização e adsorção podem ser conduzidos (Wang et al., 2014). Estudos que investigam os fatores ambientais, os modelos isotérmicos e os mecanismos que regulam a adsorção de Cd são realizados por meio de experimentos de adsorção em batelada utilizando soluções com concentrações progressivamente maiores (Wang et al., 2021; Yuan et

al., 2022; Lin et al., 2023). Estudos de outros países e diferentes pedoambientes mostram que a GRSP tem uma forte afinidade com EPTs como cádmio, chumbo, cobre, zinco, estrôncio e níquel, e pode ajudar a reduzir a toxicidade desses elementos em soluções aquosas, bem como em diversas matrizes ambientais.

Neste trabalho, objetivou-se estudar as características de GRSP por seis técnicas diferentes de caracterização e os fatores importantes no processo de adsorção de Cd (II), bem como os mecanismos associados a este fenômeno físico-químico. GRSP de dois pedossistemas distintos foram estudados. Na primeira parte do trabalho, apresenta-se um referencial teórico, seguido pelos artigos 1 e 2. O artigo 1, refere-se caracterização de GRSP em solos tropicais e o artigo 2 refere-se à biossorção de Cd (II) em soluções aquosas de solos mineral e orgânico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Atividades antrópicas e elementos potencialmente tóxicos

Atividades humanas, tais como a eliminação inadequada de águas residuais, a aplicação de pesticidas e fertilizantes, a queima de combustíveis fósseis, a mineração e outras atividades, são algumas das mais relevantes para a liberação de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) no meio ambiente (Ćwieląg-Drabek et al., 2020; Qin et al., 2021). Os resíduos industriais resultantes destas operações podem afetar diretamente ou indiretamente a qualidade do solo e da água (Hudson-Edwards, 2016; Zipper et al., 2016), levantando preocupações ambientais sobre a poluição do solo e da água.

O cádmio (Cd) apresenta riscos a curto e longo prazo para o ecossistema e a saúde humana (Ali et al., 2019; ATSDR, 2022), e altas concentrações destes elementos podem ter efeitos nocivos em diferentes sistemas biológicos, exigindo soluções que excluam ou minimizem seus impactos ambientais. Em todo o mundo, locais como Kabwe, na Zâmbia, Tianying, na China, Haina e na República Dominicana, apresentam históricos de contaminação por Pb, enquanto que Norilsk, na Rússia, La Oroya e no Peru, são locais contaminados por Cd, Pb e outros metais (Reuer et al., 2012; BLACKSMITH INSTITUTE, 2013; Beng et al., 2022).

Os metais bivalentes são preocupações ambientais para solos e águas devido às suas características químicas, que os colocam como ameaças potenciais à saúde humana devido à toxicidade (ATSDR, 2022). Eles não têm papel biológico conhecido e, em concentrações altas, são prejudiciais à saúde de plantas, animais e seres humanos (Qin et al., 2021), devido a sua alta solubilidade, alta mobilidade, biodisponibilidade e forma bivalente em solução (de forma relevante em pH ácido), destacando-se pelo potencial nocivo e persistência no meio ambiente (Pendas & Szteke, 2015). Esses elementos alcançam o ar, solo, os corpos d'água a partir de minas, indústrias, queima de carvão e resíduos domésticos, e solos, rochas, além de carvão e fertilizantes minerais, também podem conter teores elevados de cádmio naturalmente (Pendas & Szteke, 2015).

No Brasil, a maioria do Cd é encontrado em produtos manufaturados e é extraído durante a produção de outros metais como zinco, chumbo e cobre ou na extração de rochas para produção de fertilizantes fosfatados (Bouida et al., 2022). O incremento de Cd no solo e água por vias de origem natural (geogênicos) e antropogênica que incluem aplicação excessiva ou inadequada de pesticidas, destinação incorreta de resíduos industriais, lodo de esgoto,

fabricação de tintas e compostos corados, deposição atmosférica, atividades de mineração, entre outras (Bouida et al., 2022).

Em Minas Gerais, a Fundação Estadual de Meio Ambiente (FEAM) disponibiliza anualmente uma lista anual de áreas declaradas contaminadas no Estado. Na lista do ano de 2022 foram listadas 713 áreas contaminadas e áreas reabilitadas no Estado, uma evolução relevante desde 2007 (nessa ocasião eram 56). Das áreas gerenciadas, 8 e 27 foram listadas devido à presença de cádmio e de chumbo, respectivamente, no solo e águas subterrâneas (FEAM, 2022). Essas áreas se encontram nos municípios de Belo Horizonte, Betim, Conselheiro Lafaiete, Contagem, Nova Lima, Ouro Preto, Paracatu, Três Marias, Uberaba e Uberlândia, com destaque para Contagem, Paracatu e Três Marias que possui três ou mais áreas contaminadas (FEAM, 2022). As microrregiões da zona da Mata, Vale do Mucuri, Norte de Minas, Central, Oeste e Triângulo Mineiro possuem locais em que as concentrações de Cd estão acima das concentrações naturalmente presentes no solo, um *background* geoquímico (Souza et al., 2015). Minas Gerais tem uma das maiores áreas de reservas minerais, é um dos maiores produtores de minerais metálicos e não-metálicos do Brasil (ANM, 2023) sendo conhecido como um Estado “minerador”. Devido ao *background* geoquímico para diversos EPTs, o Estado e os órgãos ambientais utilizam valores orientadores da qualidade do solo para substâncias potencialmente tóxicas no solo e em águas subterrâneas, Minas Gerais tem estabelecido os próprios valores orientadores da qualidade do solo para todos os solos do território mineiro.

## 2.2 Valores de referência para solos e águas subterrâneas

No contexto mundial, a concentração média de Cd é de  $0.36 \text{ mg kg}^{-1}$  (Kabata-Pendias & Szteke, 2015). Em vários países os níveis de Cd variam, por exemplo,  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$  na Austrália,  $0.18 \text{ mg kg}^{-1}$  no Brasil,  $0.27 \text{ mg kg}^{-1}$  nos EUA,  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  na Europa,  $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  no Japão (Kubier, Wilkin, Pichler, 2019). Os níveis de referência de Cd para solos brasileiros (valor de referência de qualidade, solo natural) e os níveis permitidos que não causam prejuízo às funções essenciais dos solos (valor de prevenção) são, respectivamente, para Minas Gerais,  $<0.4 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , e São Paulo,  $<0.5 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $1.3 \text{ mg kg}^{-1}$  (CONAMA, 2009; COPAM, 2011; CETESB, 2021). O solo é considerado contaminado se apresentar concentrações de Cd acima dos níveis de investigação que, para solos chega até  $20 \text{ mg kg}^{-1}$ , e águas subterrâneas,  $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em Minas Gerais, e em São Paulo,  $160 \text{ mg kg}^{-1}$  para solos, e águas subterrâneas,  $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (CONAMA, 2009; COPAM, 2011; CETESB, 2021).

Fatores do solo contribuem para a mobilidade e biodisponibilidade de Cd, a saber: pH, capacidade de troca catiônica, tipo e quantidade de matéria orgânica, outros cátions, força iônica, precipitações com carbonatos e fosfatos, teor de argila, óxidos de Fe livres, presença e diversidade de FMAs, entre outros. A maioria dos cátions pode ser adsorvida na superfície negativa das partículas de óxidos de ferro (Hill 2010; Kabata-Pendias & Szteke, 2015), controlando seu comportamento e isso resultando em níveis desses elementos abaixo do esperado.

### 2.3 Cd em águas e humanos

Os níveis de Cd em águas superficiais variam especialmente de 0.05 a 1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , no entanto, valores de 6-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram relatados em rios e estuários e alguns rios europeus contêm níveis muito maiores de Cd, até 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pela entrada de lodo de esgoto, por exemplo (Kabata-Pendias & Szteke, 2015). Quanto à mobilidade, o Cd é mais móvel na água do mar do que em outras águas, onde está presente em várias formas, a saber  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})^+$  e  $\text{Cd}(\text{CO})_3$ , e como complexos orgânicos e inorgânicos, enquanto as formas não solúveis ou adsorvidas aos sedimentos apresentam pouca mobilidade, o que é explicado pela ligação de baixa energia do Cd ao solo e sedimentos (Kabata-Pendias & Szteke, 2015). O pH e Eh (potencial redox) são os fatores determinantes para regular a disponibilidade de Cd tanto em águas, como solos e sedimentos, sendo que quanto maior a acidez maior a sua disponibilidade (pH <5.5). No Brasil, a concentração limite de Cd permitida, para o padrão de potabilidade, é de 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que em águas subterrâneas, para consumo humano e irrigação são, respectivamente, 5 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (CONAMA, 2008; CETESB, 2011). De forma geral, o Cd é tóxico em níveis extremamente baixos.

A exposição oral crônica a altos níveis de Cd pode causar, entre outros efeitos, danos aos sistemas nervoso, digestivo e respiratório (ATSDR, 2022). Cd é altamente tóxico em concentrações variadas, e pode bioacumular em organismos tornando-se uma preocupação mundial. A exposição crônica a esse metal pode resultar em sérios problemas de saúde, como doenças pulmonares, aumento da pressão arterial, infarto do miocárdio, disfunção renal, desmineralização óssea, osteoporose grave, câncer de próstata, efeito no crescimento fetal, câncer de pulmão, de próstata e de rim (Kabata-Pendias & Szteke, 2015).

Cádmio é tóxico e perigoso para todas as fases da vida, e a sua absorção, após exposição oral de uma pessoa ao Cd depende das reservas corporais de Ca, Fe e Zn, idade, estado

fisiológico, histórico de gravidez, entre outros aspectos (Kabata-Pendias & Szteke, 2015). Para um homem de 70 kg, 50 anos, a quantidade de Cd é de cerca de 20 mg, sendo os rins os locais mais representativos (com 50% da carga corporal de Cd), em outros órgãos (fígado) e tecidos (músculos), Cd bioacumula e chega a 15% e 20% de carga corporal, respectivamente (WHO, 2011). Em recém-nascidos lactentes, a depender do continente, condições socioeconômicas e de outros fatores (p. ex., ambientais), a absorção de cádmio pode ser maior que em adultos. Na população em geral, as concentrações normais de Cd estão entre 0.4 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para pessoas não-fumantes (Kabata-Pendias & Szteke, 2015).

#### 2.4 Efeito tóxico de Cd em organismos

Em plantas, não é conhecido na literatura funções biológicas positivas para Cd. No entanto, quando em altas concentrações, podem causar inibição do crescimento e morte (Kabata-Pendias & Szteke, 2015; Bouida et al., 2022). O Cd translocado para parte aérea causa fitotoxicidade provocando alterações morfológicas, bioquímicas, estruturais e fisiológicas, a exemplo de redução da taxa fotossintética, inibição da respiração, prejuízo no crescimento radicular e nas atividades enzimáticas, inibe a formação de clorofila e provoca clorose nas folhas e coloração marrom-avermelhada na margem e nervura das folhas (Kabata-Pendias & Szteke, 2015; Navarro-León et al., 2019).

Ćwieląg-Drabek et al (2020) estudando a poluição vegetal em hortas familiares levando em conta a exposição do consumidor constataram teores médios de Cd ( $0.52 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso fresco), devido principalmente à localização das plantações, que eram próximas às fontes de poluição por estes e outros elementos potencialmente tóxicos. Esses teores encontrados excederam aos teores máximos permitidos segundo o padrão de qualidade da Europa (Commission Regulation 420, 2011, 2014). Alimentos como salsa, cenoura, beterraba e batata tiveram suas concentrações elevadas e acima do permitido, sendo menores para Cd em batatas e maiores para cenoura e salsa (Ćwieląg-Drabek et al, 2020).

A contaminação por Cd é conhecida por ter efeitos negativos em microrganismos do solo, especificamente sobre os fungos micorrízicos arbusculares. Por exemplo, a germinação de esporos em *Rhizophagus clarus* e *Ambispora appendicula* foi reduzida quando submetidos a uma proporção de 20% de solo contaminado com os dois metais (Klauber-Filho et al., 2023). Neste estudo, concentrações entre 11 e 35  $\text{mg dm}^{-3}$  para o Cd foram cruciais para inibir a germinação de esporos de FMAs. Além disso, o crescimento do tubo germinativo também foi



afetado com observações de redução severa, demonstrando muita sensibilidade dessas duas espécies de FMAs ao cádmio e ao chumbo (Klauberg-Filho et al., 2023). De fato, o aumento do teor de EPTs reduz o crescimento, bem como a diversidade fúngica conforme registrado em Sánchez-Castro et al. (2017), que também verificaram redução na diversidade fúngica em solos de áreas de mineração contaminados com Cd (intervalos de 40 a 573 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente).

Contudo, podem ocorrer situações em que mesmo em elevadas concentrações de Cd identificam-se FMAs que conseguem sobreviver e contribuir para um processo conhecido como rizoestabilização, que consiste em um mecanismo biológico para proteger águas subterrâneas contra a saída de elementos potencialmente tóxicos pela ação do sistema radicular de plantas. Espécies da família Glomeraceae são frequentemente observadas em áreas com altos teores de EPTs (Öpki et al., 2006; Sun et al., 2015; Sánchez-Castro et al., 2017; Klauberg-Filho et al., 2023). Isso ocorre devido aos fungos micorrízicos arbusculares estarem presentes recorrentemente em simbiose com raízes de plantas que crescem em áreas contaminadas (Yang et al., 2010), maior taxa de esporulação (que justifica maior chance de multiplicação fúngica) (Daniell et al., 2001), tolerância (mesmo que limitada) de algumas espécies desta família a altos teores de EPTs (Hassan et al., 2011) e por apresentar diversidade funcional (Munkvold et al., 2004).

## 2.5 Remediação de áreas contaminadas

O aumento da contaminação e poluição ambiental por EPTs enfatiza a necessidade de promissoras tecnologias de remediação, pois podem entrar nos ecossistemas e alterar o funcionamento natural de micro e macrorganismos do solo. A contaminação do solo com EPTs é quase onipresente em todo o mundo e uma estratégia para reduzir a disponibilidade de EPTs para as diferentes matrizes é o uso de fungos micorrízicos arbusculares (Carneiro et al., 2001; Pedroso et al., 2018; Riaz et al., 2021) e seus subprodutos secretados (González-Chávez et al., 2004; Cornejo et al., 2008; Vodnik et al., 2008; Wang et al., 2014; Janeeshma & Puthur, 2020; Wang et al., 2020; Riaz et al., 2021; Yuan et al., 2022). FMAs são microrganismos de solo que estabelecem uma interação simbiótica mutualista com as raízes vivas de mais de 80% de espécies vegetais vasculares (Smith & Read, 2008), e pertencem ao filo *Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001). A associação estabelecida entre os FMAs e as plantas é denominada de micorriza (mico = fungo; rizo = raiz) e desempenham um papel fundamental no equilíbrio e sobrevivência das comunidades vegetais

Os FMAs desempenham várias funções importantes do ponto de vista agrícola, ecológico e ambiental, como, por exemplo, a imobilização de EPTs por uma glicoproteína produzida na parede celular de hifas extrarradiculares, denominada glomalina (Wright et al., 1996; Wright & Upadhyaya, 1998; Rillig et al., 2001; González-Chávez et al., 2004; Rillig, 2004). Acredita-se que quando as hifas extrarradiculares dos FMAs morrem, fica depositado um resíduo de glomalina no solo (Treseder & Turner, 2007) contribuindo para os processos bioquímicos e a engrenagem microbológica. Por isso, a micorrização, a produção de glomalina e seu depósito no solo melhoram os processos de remediação de áreas contaminadas, por exemplo, por metais (Cd, Cu, Pb e Zn). Estes são aderidos nas estruturas dos fungos micorrízicos e das raízes ou mesmo em sítios de ligação na molécula de glomalina, inviabilizando sua translocação para as partes aéreas de plantas.

Vários estudos têm mostrado que os FMAs desempenham um papel relevante na remediação de áreas contaminadas com metais (Carneiro et al., 2001; Carneiro et al., 2002; González-Chávez et al., 2004; Chen et al., 2005; Hildebrandt et al., 2007; Cornejo et al., 2008; Song et al., 2020) e na reabilitação de áreas com histórico de desastres ambientais (Batista et al., 2020; Rodríguez-Rodríguez et al., 2021; Silva et al., 2021; Zanchi et al., 2021; Batista et al., 2022; Santiago et al., 2022; Zanchi et al., 2022). A característica de ubiquidade em solos dos fungos micorrízicos arbusculares os tornam uma estratégia interessante em programas de monitoramento ambiental, principalmente quando se considera avaliar a proteína do solo relacionada a glomalina que contribui para a descontaminação de solo e água.

## 2.6 Breve histórico da ‘glomalina’ e terminologias

A glomalina é uma glicoproteína do solo termoestável, hidrofóbica, recalcitrante (estável e persistente no solo), com taxa reduzida de decomposição, com ação cimentante, que foi descoberta por pesquisadores do Serviço de Pesquisa Agrícola USDA em 1996 (Wright & Upadhyaya, 1996). É bastante aceita a hipótese de que a glomalina é produzida por fungos micorrízicos arbusculares (Wright, 1998), um tipo de fungo do solo que forma relações simbióticas com as raízes de mais de 90% das plantas cultivadas (Smith & Read, 2008). As terminologias mais aceitas têm se referido à 'glomalina' de forma operacional, como proteína do solo relacionada à glomalina (GRSP). Esta é uma fração da ‘glomalina’ no solo que também contém contaminantes e proteínas do solo de origem não micorrízica, extraída usando tampões de citrato e autoclavagens. São classificadas em facilmente extraível (EE-GRSP) e dificilmente

extraível (HE-GRSP), a soma é a total (T-GRSP) (Wright & Upadhyaya, 1998; Rillig, 2004; Gillespie et al., 2011; Irving et al., 2021). Essa terminologia será empregada ao longo deste texto a partir deste momento. Em anos recentes, a terminologia introduzida foi proteínas do solo extraíveis por citrato (CESP), definição que mais se aproxima de glomalina *stricto sensu* (Holátko et al., 2021).

Uma discussão da comunidade científica aborda a composição bioquímica de GRSP como ainda não totalmente definida e não somente é uma glicoproteína, bem como possui origens diversas (produzidas em hifas extrarradiculares, esporos de FMAs; por fungos ectomicorrízicos; e, como uma fração da matéria orgânica do solo). De acordo com Schindler (2007), GRSP extraído pelo método clássico de Wright & Upadhyaya (1996) carrega consigo proteínas e ácidos húmicos, devido à forte relação entre glomalina com a matéria orgânica do solo e suas frações.

### 2.6.1 GRSP em solos tropicais e temperados

Dentre as principais funções da proteína do solo relacionada à glomalina, podemos citar a agregação e estruturação do solo (Leifheit et al., 2013), atuando como uma ‘super cola’ unindo as partículas do solo entre si, possibilitando a formação de agregados e facilitando na sua estabilidade com implicações práticas na aeração do solo, atividade microbiana, infiltração de água e diminuição da suscetibilidade à erosão; sequestro de carbono, devido a este elemento compor de 20 a 60% de sua estrutura química, promovendo maior estabilidade de agregados e levando a alta proteção de carbono orgânico (COS) em ecossistemas terrestres (é conhecida como “herói desconhecido do armazenamento de carbono”, fonte de COS) evitando que seja perdido para atmosfera; e, sua atuação no sequestro e imobilização de elementos potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn), uma importante contribuição para remediação de áreas contaminadas, sejam solos agrícolas, florestais, manguezais ou até estuários e águas subterrâneas (Wang et al., 2014; Wu et al., 2014; Wang et al., 2017; Yuan et al., 2022).

De acordo com a revisão de literatura, em solos tropicais e temperados, os trabalhos têm se concentrado em estudar a contribuição de GRSP na agregação e estabilidade de agregados do solo (Leifheit et al., 2013; Barbosa et al., 2019; Bertagnoli et al., 2020; Moitinho et al., 2020; Santos et al., 2020; Barbosa et al., 2021; Pinto et al., 2022), na produtividade agrícola (Méndez et al., 2019; Cogo et al., 2020), na associação com gramíneas (Barbosa et al., 2019; Méndez et al., 2019; Santos et al., 2020; Barbosa et al., 2021; Silva et al., 2021), na fertilidade do solo

(Reyes et al., 2019; Silva et al., 2021), no estoque de carbono (Oliveira et al., 2022; Ribeiro et al., 2022; Santiago et al., 2022), em sistemas agroflorestais (Miguel et al., 2020; Silva et al., 2020; Silva et al., 2021; Matos et al., 2022a), na heterogeneidade de ecossistemas (Gomes et al., 2021), na qualidade do solo (Vasconcellos et al., 2016; Pinto et al., 2022; Vieira et al., 2022), nos solos degradados (Silva et al., 2018; Matos et al., 2022b; Oliveira et al., 2022), na recuperação e reabilitação em áreas de mineração (Kumar, Singh, Ghosh, 2018; Jordão et al., 2021; Ribeiro Junior et al., 2021; Rodríguez-Rodríguez et al., 2021; Ribeiro et al., 2022; Santiago et al., 2022) e na remediação de áreas contaminadas por diversas fontes de contaminação (Ferreira et al., 2018). Na Tabela 1 é possível visualizar teores de GRSP em função de sistemas agrícolas, florestais, áreas degradadas e de mineração em diferentes países, descritos na literatura.

**Tabela 1.** Teores de proteína do solo relacionada a glomalina (GRSP) de acordo com o país de estudo e sistema agrícola ou vegetação presente.

País	Sistema/Vegetação	Descrição	Teor de GRSP (mg g <sup>-1</sup> )	Referência
		Áreas de dunas	3.50 – 11.30	Souza et al. (2013)
		Solos de Três Marias	0.70 – 2.50	Leal et al. (2016)
Brasil	Ambiente natural	Solos ácidos, rasos e pobre em nutrientes formados sob substratos quartzíticos e ferruginosos	1.14 – 135.46	Gomes et al. (2020)
		Latossolo de textura arenosa com vegetação espontânea	1.10 – 1.90	Cordeiro et al. (2021)
		Área de referência intocada com vegetação de savana	4.0 – 30.2	Gastauer et al. (2021)

		Área de referência Mata Atlântica	3.30 – 11.08	Jordão et al. (2021)
		Argissolo Vermelho Amarelo distrófico típico com pastagem degradada e floresta secundária	0.61 – 3.57	Santos et al. (2021)
Canadá		Áreas de conservação e de restauração de pradarias	0.80 – 1.90	Law & Maherali (2023)
Estados Unidos		Solos minerais e de turfa	45.10 – 113.70	Schindler et al. (2007)
		Solos de uma rede de monitoramento de florestas	0.005 – 7.10	Cissé et al. (2023)
França		Solos em todo o país	0.16 – 3.18	Staunton et al. (2020)
<hr/>				
		Latossolo Vermelho com leguminosas e gramíneas	0.41 – 5.07	Balota et al. (2014)
		Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo vermelho ácido com soja, milho e crotalária	0.28 – 4.34	Truber & Fernandes (2014)
Brasil	Plantio direto	Latossolo de textura arenosa com algodão, leguminosas, gramíneas e plantas de cobertura	0.30 – 2.0	Cordeiro et al. (2021)
		Argissolo Vermelho Amarelo distrófico textura arenosa	0.35 – 4.28	Pinto et al. (2022)

		com soja/milho, milho e braquiária com soja		
Reino Unido		Solos com trigo	28.0 – 65.0	Wilkes et al. (2021)
<hr/>				
		Cambissolo Húmico em área de pomares	4.20 – 5.60	Purin et al. (2006)
		Latossolo Vermelho com leguminosas e gramíneas	0.50 – 3.50	Balota et al. (2014)
		Solos de Cerrado	2.30 – 6.80	Carneiro et al. (2015)
		Latossolo Vermelho distrófico muito argiloso com cafeeiro	2.50 – 5.0	Cogo et al. (2020)
Brasil	Cultivo convencional	Latossolo muito argiloso com soja e milho	1.02 – 3.77	Moitinho et al. (2020)
		Cambissolo Háplico com milho, feijão, inhame e banana	1.32 – 9.50	Silva et al. (2020)
		Argissolos com pastagem replantada e pastejo extensivo	1.50 – 4.22	Matos et al. (2022)
		Argissolo Vermelho Amarelo distrófico textura arenosa em pastagem permanente	0.73 – 10.15	Pinto et al. (2022)
China		Cambosols, Chernozem, Phaeozem e Solonetz	0.30 – 6.54	Zhong et al. (2017)

		Solos com Azevém, Artemísia e Sílfo	0.30 – 3.57	Chen et al. (2022)
		Áreas com milho, trigo, soja, arroz, batata e tabaco	0.80 - > 9.60	Zhang et al. (2023)
Cuba		Gleissolo em área de pastagem	1.39 – 2.43	Barbosa et al. (2021)
Polônia		Fluvisols Gleicos com cultivo de cereais, beterraba, batata e pastagem	0.70 – 1.50	Kobierski et al. (2018)
Reino Unido		Solos com trigo	30.0 – 55.0	Wilkes et al. (2021)
República Tcheca		Albeluvisol, Cambisol, Chernozem, Fluvisol, Gleysol, Haplic Luvisol, leptosol, Phaeozem, Planosol, Regosol, Technosol	1.90 – 3.90	Zbiral et al. (2017)
<hr/>				
		Latossolos Vermelho- Amarelo da Floresta Nacional do Araripe	0.01 – 0.03	Nobre et al. (2015)
		Argissolo Vermelho Amarelo distrófico típico com árvores da Mata Atlântica	0.93 – 4.54	Santos et al. (2020)
Brasil	Floresta	Cambissolo Háptico com sistema agroflorestal	0.56 – 19.01	Silva et al. (2020)
		Latossolos em Floresta Amazônica	0.33 – 1.75	Reyes et al. (2021)

		Argissolos com sistema agroflorestal	1.28 – 3.89	Matos et al. (2022)
		Argissolo Vermelho Amarelo distrófico textura arenosa com árvores da Mata Atlântica	0.35 – 3.17	Pinto et al. (2022)
		Chernossolo com árvores lenhosas	0.40 – 10.0	Ji et al. (2023)
China		Latossolo com eucalipto e árvores nativas	0.05 – 18.0	Lin et al. (2023)
		Solos florestais	0.90 – > 9.60	Zhang et al. (2023)
República Tcheca		Albeluvisol, Cambisol, Chernozem, Fluvisol, Gleysol, Haplic Luvisol, Leptosol, Phaeozem, Planosol, Regosol, Technosol	13.70 – 35.90	Zbiral et al. (2017)
		Área de deposição de Zn	3.87 – 4.54	Pedroso et al. (2018)
Brasil	Área de mineração	Área de mineração de Fe	2.86 – 22.18	Gastauer et al. (2020)
		Área de mineração de Fe	0.15 – 1.93	Jordão et al. (2021)



		Área de mineração de Fe	0.24 – 16.47	Rodríguez- Rodríguez et al. (2021)
		Área de mineração de Fe	1.50 – 29.0	Santiago et al. (2022)
		Rejeitos de mineração de carvão	0.09 – 1.11	Vieira et al. (2022)
Chile		Solos com concentrações elevadas de cobre	6.60 – 36.80	Cornejo et al. (2008)
China		Área de fundições de Zn/Pb	0.30 – 3.57	Chen et al. (2022)
Eslovênia		Área de fundição de Pb	1.18 – 67.14	Vodnik et al. (2008)
Inglaterra		Solos poluídos	0.18 – 1.19	González- Chávez et al. (2004)
China	Mangue	Solos em florestas originais	0.18 – 1.58	Guo et al. (2023)
China	Sedimentos	Zonas úmidas costeiras	15.80 – 48.50	Wang et al. (2020)

### 2.6.2 Efeito de GRSP na manutenção da saúde do solo

A proteína do solo relacionada a glomalina atua na manutenção da saúde do solo, principalmente no que tange à estabilização do carbono no solo, atuando como um bioindicador-chave para o sequestro deste elemento e proteção do solo (Holátko et al., 2021) - o carbono armazenado no solo é importante para a redução das emissões de gases de efeito estufa na atmosfera, ajudando a mitigar as mudanças climáticas; melhoria da agregação e estruturação do solo, a formação de agregados pode melhorar a infiltração de água, aeração e a retenção de nutrientes - práticas agrícolas intensivas podem causar destruição dos agregados do solo e prejudicar componentes que atuam na agregação e estabilização de agregados (Leifheit et al., 2013); aumento do teor de matéria orgânica, com forte correlação com a glomalina que, já foi relatada como fonte mais importante de carbono no carbono orgânico solúvel (Wang et al., 2018); formação complexos com nutrientes no solo, como ferro, fósforo e nitrogênio, tornando-os disponíveis para as plantas, auxiliando na melhoria da absorção de nutrientes pelas plantas e redução da lixiviação de nutrientes do solo; auxiliar no aumento da resistência das plantas a doenças e pragas, estimulando o crescimento de microrganismos benéficos no solo e melhorando a absorção de nutrientes pelas plantas; entre outros benefícios.

### 2.6.3 Uso de GRSP frente aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU

A proteína do solo relacionada a glomalina, pode estar relacionado à algumas das 17 metas da ONU, especificamente com a (Meta 1) Erradicação da pobreza - GRSP atua no aumento da produtividade agrícola; (Meta 6) Água potável e saneamento - redução da contaminação de águas potável e subterrâneas; e (Meta 13) Ação contra mudança global do clima - sequestro de carbono por GRSP. As pesquisas do futuro devem incluir esses tópicos importantes para que até 2030 seja possível obter resultados relevantes para proteger o meio ambiente e o clima e garantir serviços ecossistêmicos para todas as pessoas.

## 2.7 Obtenção de GRSP

### 2.7.1 Extração e quantificação de GRSP

Desde os primeiros trabalhos em meados da década de 90, a extração de GRSP vem sendo realizada baseado no método descrito por Wright & Upadhyaya (1996), que utiliza, para

GRSP facilmente extraível e dificilmente extraível, respectivamente, tampão citrato de sódio 20 ou 50 mM, pH 7.4 ou 8.0, um ou mais ciclos de autoclavagem de solo à temperatura de 121°C, durante 30 ou 60 minutos. Tradicionalmente, utiliza-se 1.0 g de solo, no entanto, mantendo-se a estequiometria solo:reagente pode-se realizar modificações na quantidade de solo e citrato de sódio utilizados.

O procedimento de quantificação de GRSP na amostra extraída é realizado em espectrofotômetro na região do UV-Visível, com a utilização do método de Bradford (Bradford, 1976) e albumina bovina como proteína padrão para determinar a concentração de GRSP em  $\text{mg g}^{-1}$  de solo.

Schindler et al (2007) estudando as características químicas de GRSP de solos com teores distintos de matéria orgânica, concluíram que nessa etapa do processo de obtenção de GRSP o material era rico em proteínas, mas não era uma proteína glicosilada ou glicoproteína, e sim, uma mistura heterogênea de muitas proteínas co-extraídas com excesso de ácidos húmicos. Essa ocorrência de ácidos húmicos na mesma amostra é ocasionada por ainda ser obscura a relação entre GRSP e outras frações proteicas no solo. De acordo com esses autores, também é possível observar a mesma leitura em ressonância magnética nuclear (RMN) para GRSP extraída de frações minerais e orgânicas de solos, independentemente do método de precipitação, tornando falhos os procedimentos de precipitação com HCl por ocorrer co-extração de ácidos húmicos, por exemplo. No entanto, para Gillespie et al (2011), as substâncias húmicas compreendem uma pequena fração de GRSP e lipídios e ácidos graxos, materiais não proteicos, são co-extraídos, porém não predominantes no extrato. Além disso, há divergências sobre o uso do método de Bradford para quantificar GRSP extraída de solos com alto teor de matéria orgânica por sofrer interferência pelas frações da MOS e deixar de expressar a quantidade real de GRSP. Todavia, é comum em todos os trabalhos que envolvem a extração, quantificação e posterior purificação de GRSP utilizar os métodos clássicos propostos por Wright & Upadhyaya (1996), Bradford (1976) e purificação com HCl e NaOH validando-os como úteis na detecção e concentração de GRSP, inclusive em trabalhos recentes em que se obtém GRSP na forma sólida para caracterização e utilização como adsorvente (Yuan et al., 2022).

### 2.7.2 Purificação de GRSP

A purificação da proteína do solo relacionada à glomalina inclui duas etapas: precipitação com um ácido concentrado (geralmente HCl 1 mol L<sup>-1</sup>), que proporciona aumento da concentração de GRSP, seguido de banho de gelo, centrifugação e ressolubilização com NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>. Essa concentração de NaOH é a fase aquosa mais eficaz para concentrar e redissolver GRSP (Chen et al., 2009), devido ao efeito dispersivo causado pelos íons de sódio (Na<sup>+</sup>). Com o material redissolvido, coloca-se em membrana de acetato de celulose para diálise contra água deionizada por 48h (Wright e Upadhyaya, 1998; González-Chávez et al., 2004; Yuan et al., 2022) ou até a condutividade elétrica da água ser inferior à 1 µS cm<sup>-1</sup>. É necessário medir a concentração de íons de Na<sup>+</sup> em atividade na solução de diálise para comprovar a boa limpeza do material dialisado. É importante realizar o ajuste do pH na etapa de precipitação para 2.0-2.5 para concentrar as proteínas presentes no meio, além de monitorar a diminuição e aumento repentino do pH do meio resultante de GRSP de solos orgânicos. Este processo concentra GRSP para posteriores usos, como liofilização, caracterização e experimentos de adsorção.

### 2.7.3 Liofilização

A liofilização é um processo de secagem, separação e desidratação em que a água do produto é submetida ao prévio congelamento passa diretamente do estado sólido para o gasoso (sublimação), em condições especiais de temperatura e pressão. É constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. É o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais devem apresentar estabilidade adequada durante o período de armazenagem. As reações químicas da proteína do solo relacionada à glomalina serão interrompidas com o congelamento. Ao final do processo, tem-se um material sólido floculado de peso bem leve e com cores características do solo em que a GRSP foi extraída.

## 2.8 Interação GRSP *versus* elementos potencialmente tóxicos

Após entrar em contato com o solo, os elementos potencialmente tóxicos sofrem processos que influenciam na sua biodisponibilidade (Melo & Alleoni, 2009) que geram cenários de risco potencial a todo o funcionamento da vida no solo. Um mecanismo extracelular importante para a quelação de elementos potencialmente tóxicos e restrição de absorção de

nutrientes pelas plantas de EPTs é a presença de GRSP (Kaur et al., 2023). Sabe-se que GRSP está presente nos solos pelo mundo e, nos últimos 27 anos, vários estudos atribuíram à proteína do solo relacionada à glomalina inúmeros benefícios à saúde das plantas e do solo, incluindo a complexação de elementos potencialmente tóxicos e outros poluentes, por atuar como um aglutinante orgânico (Rillig, 2004; Singh et al., 2020; Agnihotri et al., 2021; Yuan et al., 2022). Sua caracterização em solos de clima temperado foi elucidada (Gillespie et al., 2011; Wang et al., 2014), o que permitiu pensá-la como uma alternativa sustentável de utilização em ambientes contaminados com elementos potencialmente tóxicos, como cádmio, chumbo e zinco (Wu et al., 2014; Yuan et al., 2022).

Para compreender a dinâmica dos EPTs, é necessário considerar o papel de substâncias orgânicas presentes no solo que afetam os processos de adsorção/imobilização. A porção recalcitrante de moléculas orgânicas do solo podem interagir com íons potencialmente tóxicos no ambiente devido a seu forte poder de complexação com anel benzênico, carbonila e outros grupos funcionais (Higashi et al., 2005), evitando a poluição de diversos ecossistemas terrestres e aquáticos. Como um produto microbiano, a proteína do solo relacionada à glomalina é uma molécula orgânica rica em grupos funcionais (Wang et al., 2014, 2017, 2020; Yuan et al., 2022) capazes de aumentar a capacidade de imobilização de EPTs por exibirem sítios de ligação e melhorar a eficiência dos processos de adsorção e complexação de contaminantes (Yuan et al., 2022).

Nos últimos 15 anos, a maioria dos estudos se concentrou em avaliar ou monitorar a glomalina em áreas agrícolas, florestas e degradadas, e alguns em desvendar a estrutura química e molecular de GRSP. De maneira concisa, a estrutura de GRSP contém carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e macromoléculas (carboidratos e proteínas), além de elementos essenciais para as plantas (Schindler et al., 2007; Gillespie et al., 2011; Wang et al., 2014, 2017; Yuan et al., 2022), em proporções diferentes (Agnihotri et al., 2021). Este carbono é fixado inicialmente na biomassa microbiana e retido como parte da estrutura principal da proteína do solo relacionada à glomalina, perfazendo entre 30 a 60% da sua molécula (Agnihotri et al., 2021).

A proteína do solo relacionada à glomalina tem um poder de sequestrar/imobilizar distintos elementos potencialmente tóxicos importantes no cenário de contaminação ambiental. GRSP se mostrou capaz de imobilizar Pb e Zn em soluções aquosas com GRSP extraídas de sedimentos de áreas de mangue (Yuan et al., 2022). Chen et al. (2020) verificaram que GRSP consegue reduzir a adsorção de fenantreno (um importante hidrocarboneto policíclico aromático muito abundante em sistemas aquáticos e com alta persistência ambiental) no solo, e

assim, aumentando a sua biodisponibilidade para remediação. Lin et al. (2023) avaliaram a função adsorvente pela GRSP para remover Cd(II), estrôncio e níquel (Sr(II), Ni(II)), e constataram que o subproduto fúngico tem alta afinidade por estes metais, seguindo Sr(II), Ni(II) e Cd(II), pois demonstrou capacidade máxima de adsorção de 1491, 1325 e 1249  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , respectivamente, e uma afinidade maior pelo Sr(II) e menor pelo Cd(II). Esses dados são consistentes com a descoberta de Gujre et al. (2021) que avaliaram a capacidade de ligação de GRSP de solos poluídos para Ni (0.76-3.48  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e Cd (0.05-0.30  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), demonstrando notadamente que GRSP tem poderosa capacidade de sequestrar/imobilizar elementos potencialmente tóxicos.

A proteína do solo relacionada à glomalina é considerada um bioproduto fúngico capaz de desempenhar a função ecológica de biofloculante de elementos potencialmente tóxicos e remediação em diferentes ambientes. Para entender a interação entre GRSP-EPTs em solos brasileiros é necessário isolar GRSP para caracterizá-la e utilizá-la, posteriormente, em experimentos de adsorção.

### 3 Caracterização de GRSP

Muitas técnicas podem ser empregadas na caracterização de proteínas do solo, como hidrólise química úmida e cromatografia que separa aminoácidos e macromoléculas individualmente (Gillespie et al, 2011; Zhou et al., 2022). Algumas técnicas espectroscópicas, microscópicas, espectrométricas, mineralógicas, termais e que avaliam o carbono se destacam no cenário de solos tropicais com potencial para ser utilizadas na caracterização de GRSP. Técnicas de caracterização, origem da GRSP, características químicas e os estudos são descritos na Tabela 2.

Gillespie et al. (2011) caracterizaram GRSP empregando técnicas espectroscópicas, espectrométricas e proteômicas para avaliar sua estrutura química, e constataram material proteico abundante, confirmando essa premissa que GRSP contém esse tipo de material, e suportou a hipótese de que há uma mistura homogênea de muitas proteínas, e que partes somente são glicosiladas. Além disso, compostos fenólicos (polifenólicos e N-heterocíclico), bem como proteínas chaperonas com domínio de tiorredoxina estão presentes, sugerindo que GRSP contém outras proteínas e a hipótese de um domínio semelhante à tiorredoxina (Gillespie et al., 2011). De forma geral, é aceito na comunidade científica que GRSP é uma mistura de substâncias húmicas, lipídios, mesmo que em pequenas frações, e proteínas termoestáveis.

**Tabela 2.** Estudos de caracterização da proteína do solo relacionada à glomalina (GRSP) de diferentes origens, albumina sérica bovina (BSA), técnicas de caracterização, elucidando as principais características.

Origem de GRSP	Técnica de caracterização <sup>1</sup>	Principais características químicas	Referências
Solos	<sup>13</sup> C-NMR FTIR	C-alifático, C-carboidrato, C-aromático, C-carboxila e C-carbonila, O-H, -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -. C, N, O, P.	Schindler et al. (2007)
Solos	XANES Py-FIMS LC-ESI-MS/MS	N-CO=, N-heterocíclico, C-C=O. Sinais de proteína/peptídeo (m/z 58, 59, 70, 73, 84), carboidratos (m/z 84, 96, 110, 112, 113), sinais de K <sup>+</sup> e K <sub>2</sub> Cl <sup>+</sup> , ácidos graxos, fenóis/monômeros de lignina e ceras de elevado peso molecular. Peso molecular de 55,000–65,000 Da, proteínas de 25,000–30,000 Da.	Gillespie et al. (2011)

		Estiramento O–H de ácido carboxílico, fenóis, álcoois, argilominerais e óxidos, estiramento N–H de amins orgânicas, amidas e alongamento C–aromático–H, CH–alifático, estiramento C=O de ácidos carboxílicos, cetonas e amidas, e estiramento COO–assimétrico de sais de ácidos carboxílicos, curvatura C–H de grupos –CH <sub>2</sub> – e –CH <sub>3</sub> ,	
	FTIR		
Solos	XRD	alongamento de C–O e curvatura de O–H de –COOH, estiramento C–O do polissacarídeo e estiramento Si–O–Si em minerais de argila e óxidos, curvatura O–H do OH estrutural em minerais argilosos e óxidos.	Wang et al. (2014)
	Espectroscopia de fluorescência 3D	Grãos de tamanho entre 98 – 174 nm. Tirosina, triptofano, ácido fúlvico, um subproduto microbiano solúvel, ácido húmico, nitrobenzoxadiazol, branco de calcofluor.	

---



Solos	Espectroscopia de fluorescência 3D  XPS	<p>Triptofano, ácido húmico, ácido fúlvico, nitrobenzoxadiazol, tirosina, vermelho do Nilo, um subproduto microbiano solúvel, branco de calcofluor; alongamento do alifático C–H, alongamento do dobramento C–O e O–H do –COOH, OH estrutural, C=O, COO– assimétrico, alongamento de COO– simétrico e curvatura de C–H.</p> <p>Alongamento de O–H, N–H, C–H aromático, Si–O–Si e polissacarídeo C–O.</p> <p>C, O, N, Al, Ca, Na, K, P, Fe, Mg e Si.</p>	Wang et al. (2015)
Solos	FTIR  XRD  XPS	<p>Alongamentos O–H e N–H, C–H, C=O e COO–, COO– simétrico; flexão C–H;</p> <p>alongamentos C–O e Si–O–Si.</p> <p>Quartzo, montmorilonita, ilita, plagioclásio.</p> <p>C, O, Al, Ca, Fe, K, Mg, N, Na, P, Si.</p>	Zhong et al. (2016)

Solos	NIRS	Solos aráveis: RMSECV = 0,70 e R = 0,90; Solos florestais: RMSECV = 3,8 e R = 0,94.	Zbiral et al. (2017)
-------	------	---	----------------------

---

Solos	FTIR SEM	Salinidade leva à ↓GRSP pelo ↑da capacidade de ligação com Ca e P; ↓salinidade e alcalinidade, ↑estiramento CO– em polissacarídeos e Si–O–Si em minerais de argila e óxidos. ↑salinidade, ↑capacidade de ligação de Ca e P. Cu, Zn, Mg, Fe, Au, Al.	Zhang et al. (2017)
-------	-------------	---	---------------------

---

Solos	<p style="text-align: center;">FTIR</p> <p>Espectroscopia de absorção e de fluorescência 3D</p>	<p>Alongamentos O–H, N–H, C–H alifático, C=O e COO– assimétrico, COO– simétrico, C–O, flexão de O–H de –COOH, estiramento C–O de polissacarídeos, alongamento Si–O–Si, dobra O–H. Tirosina, triptofano, ácido fúlvico, subproduto microbiano solúvel, ácido húmico, nitrobenzoxadiazol.</p>	Zhong et al. (2017)
Solos	<p style="text-align: center;">FTIR</p> <p>ICP–MS</p>	<p>Hidrocarbonetos (alongamento OH e CH), proteínas (estiramento C=O, alongamento C=O dos grupos –COO–, alongamento de NC), polissacarídeos (C–OH e CO) e ácidos nucleicos (estiramento éster O–P–O). ↑teores de As, Cd, Cr, Fe, Mn e Ni.</p>	Wang et al. (2020)

Solos	SEM/EDX	↑teores de Fe, C, N e O. ASE de 75,204 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> . Fe(II) e Fe(III). -OH, CH, CO, -COO-, CO=, -CO-	Wang et al. (2021)
	Área superficial específica	NH, -NH <sub>2</sub> , O-P-O. Presença de proteínas, polissacarídeos, compostos	
	XPS	alifáticos e aromáticos	
	FTIR	(derivado de lignina e carvão).	
	<sup>13</sup> C-NMR	CO <sub>2</sub> , CO, CH <sub>4</sub> e ésteres alifáticos.	
	TGA	Despolimerização (200 – 500 °C) e decomposição aromática (> 500 °C).	
Solos	CHNSO	Relação C:N:P de 339:19:1.	Wang et al. (2021)
	ICP-OES	C-alquila, C O-alquila, C-	
	<sup>13</sup> C-NMR	carboxílico e C-aromático.	

Solos	TOC	C, N, H, S, O. 920 – 88,310 Da ( $\bar{x}$ = 17,000 Da), domínio de > 10,000 Da.	Zhou et al (2021)
	GPC	C = O, C–N, O–H, –COO, alongamentos O–H, C = O associado a proteínas e alongamento simétrico	
	FTIR	C = O.	
	GC/MS	Álcoois, amidas, aminas, polifenóis, hidróxiácidos, ácidos graxos, ácidos benzoicos, hidrocarbonetos, benzoatos, N-orgânico, cetonas, ésteres alifáticos.	
Solos	$\mu$ XRF	Zn, Pb, Fe, Ca, Si, S.	Chen et al. (2022)
	$\mu$ XANES	ZnS, ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , Zn <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> , ZnAl-LDH, Zn-ilita, Zn- calcita.	
Solos	FTIR	Hidrocarbonetos, proteínas, polissacarídeos, componentes de ácidos nucléicos.	Guo et al. (2022)
	<sup>13</sup> C–NMR	C O–alquila, C–alquila, C– aromático, C–carboxílico.	

Solos	FTIR	Alongamento CH em – CH <sub>3</sub> e –CH <sub>2</sub> –. C, N, Fe, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Na, Pb e Zn.	Li et al. (2022)
	XPS		
	SIMS		
	ICP–MS		
<hr/>			
Sedimentos	FTIR	Alongamento CH em –CH <sub>3</sub> e –CH <sub>2</sub> –. C, N, Fe, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Na, Pb e Zn.	Li et al. (2022)
	XPS		
	SIMS		
	ICP–MS		
<hr/>			

Sedimentos	SEM	Estrutura irregular em bloco ou escamosa e com poros, sólido floculento e fofo, ↑área superficial específica.	Yuan et al. (2022)
	FTIR	Alongamento de OH em ácido carboxílico, fenóis, álcoois, minerais argilosos e óxidos; –CO–NH e –NH <sub>2</sub> ; alongamento de CH aromático; COO= de carboxila; alongamento	
	XPS	COO– de carboxilato; CO de polissacarídeos.	
	XRD	Presença de óxido de zinco, carboxilato e fosfatos principais ligantes de metais. C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> e C <sub>24</sub> H <sub>118</sub> Al <sub>6</sub> Fe <sub>3</sub> N <sub>16</sub> O <sub>65</sub> P <sub>12</sub> .	
BSA – Albumina sérica bovina	<sup>13</sup> C–NMR	NH de amida, CO, NH, CN, CH, C alifático, –COOH, OH, C–C=O, O–C–C, C–C, tirosina e triptofano.	Schindler et al. (2007)
	FTIR		

<sup>1</sup>**NMR** – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear; **XANES** – Espectroscopia de absorção de raios X próximo da estrutura da borda; **Py-FMS** - Espectrometria de massa de ionização de campo de pirólise; **LC-ESI-MS/MS** - Cromatografia líquida/Espectrometria de massa por eletropulverização em Tandem; **FTIR** – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier; **SEM** – Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva; **ICP-OES** - Espectroscopia de emissão óptica de plasma acoplado

indutivamente; **XPS** - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X; **XRD** – Difratomia de raios X; **ICP-MS** - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado; **NIRS** – Espectroscopia de infravermelho próximo; TGA – Análise Termogravimétrica; **CHNSO** – Análise elementar de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre, oxigênio; **TOC** – Análise de carbono orgânico total; **GPC** – Cromatografia de permeação em gel; **GC/MS** - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa; **SIMS** – Espectroscopia de massa de íons secundários; **μXRF** - Espectroscopia de fluorescência de raios-X de microfoco; **μXANES** - Espectroscopia de absorção de raios X de microfoco próximo à estrutura de borda.

A caracterização permite identificar potencialidades e limitações para o uso da proteína do solo relacionada à glomalina. A estrutura molecular de GRSP pode ser caracterizada por técnicas espectroscópicas, microscópicas, mineralógicas, termogravimétricas e outras. A Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), em síntese, fornece informações sobre os grupos funcionais de superfície característicos do material, identifica alterações causadas por interações com substâncias inorgânicas. Uma aplicação prática da técnica de FTIR na caracterização de GRSP é o entendimento do papel que os grupos funcionais desempenham na imobilização de elementos potencialmente tóxicos, fornecendo sítios de adsorção, e a contribuição como biofloculante na remediação de áreas contaminadas ou poluídas. Schindler et al. (2007) foram pioneiros na caracterização de grupos funcionais de GRSP em solos temperados. Zhang et al. (2017) encontraram C-aromáticos, carboxila, alquila, O-alquila, entre outros grupos funcionais, o que elevou o conhecimento da caracterização de GRSP. A técnica de FTIR mostram alterações na estrutura química de GRSP após, por exemplo, interação com metais catiônicos (Yuan et al., 2022).

A Microscopia Eletrônica de Varredura combinada com Espectroscopia de Energia Dispersiva (SEM) permite avaliar a morfologia de superfície de diferentes materiais. A superfície física de GRSP purificada e a distribuição iônica dos elementos de interesse podem ser elucidados através dessas duas técnicas combinadas, bem como suas alterações após interação com elementos potencialmente tóxicos. Essas informações são importantes e aplicadas no entendimento dos mecanismos de retenção de EPTs.

No Brasil, recentemente, as propriedades e características do solo têm sido avaliadas através do uso da Fluorescência de Raios X portátil (pXRF), que é um método rápido, ecologicamente correto, não invasivo, econômico e confiável. Ela complementa as análises químicas de laboratório, e por se tratar de uma técnica que economiza reagentes e analisa as



amostras com rapidez, pode ser empregada em diferentes materiais (Ribeiro et al., 2021). É uma excelente alternativa para realizar a caracterização de GRSP e as informações geradas não só comprovam a composição elementar como também têm implicações práticas, por exemplo, na fertilidade e conservação do solo, contaminação e manejo sustentável do solo. A aplicação de pXRF se estende à avaliação de informações associadas à mineralogia do solo e material de origem e assinatura geoquímica de elementos, concordante com Mancini et al. (2021), Silva et al. (2021) e Lima et al. (2022). A análise elementar de GRSP presente em solos temperados tem sido realizada por outras técnicas analíticas, e demonstram a presença de vários elementos na composição elementar, como C, H, O, N, P, S, Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, Si (Agnihotri et al., 2022), incluindo Cl, Cu e Zn (Zhang et al., 2017).

Para identificação de minerais, análise de morfologia e caracterização estrutural das amostras de GRSP utiliza-se a Difração de Raios X (XRD). Essa técnica é aplicada em diversas interfaces da ciência do solo (Kämpf, Marques, Curi, 2012; Silva et al., 2021; Yuan et al., 2022). A difração de raios X se baseia na difração de um feixe de raios X por uma amostra cristalina, produzindo um padrão de difração característico que pode ser interpretado para determinar a estrutura cristalina do material e, posteriormente, após contato com diferentes materiais, mudanças estruturais. Yuan et al. (2022) estudando GRSP de sedimentos superficiais originários de mangues na China, constataram que mais de 70% de GRSP é composto por um ribonucleosídeo de purina (nebularina) que tem papel como um metabólito fúngico e está intimamente relacionado a uma beta-D-ribose. Os autores verificaram a estrutura cristalina contendo óxidos de Fe e Al com implicações ecológicas na formação de aglomerados e melhoria da estabilidade do solo. A XRD mostra alterações na composição mineralógica e difratograma de GRSP após interação com metais catiônicos (Yuan et al., 2022).

Em materiais adsorventes é possível medir o ponto de carga zero (ZPC), condição em que a carga elétrica líquida do adsorvente é zero, ou seja, um valor de pH no qual o número total de cargas elétricas negativas (incluindo as permanentes) e positivas (dependentes de pH) são iguais. A esse valor de pH de uma solução em equilíbrio em que sua carga é zero se dá o nome de ZPC. Abaixo do ZPC, o material possui carga elétrica líquida positiva, enquanto acima do ZPC a carga elétrica é negativa. O conhecimento do ZPC é importante para entender a adsorção de íons e moléculas em materiais adsorventes. Isso ocorre porque o ZPC pode afetar a carga da superfície do material adsorvente e, conseqüentemente, a eficiência da adsorção.

Para conhecer o comportamento de materiais adsorventes a altas temperaturas e avaliar a estabilidade térmica pode-se empregar a Análise Termogravimétrica (TGA), que consiste em medir a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, após

transformação química, sob condições controladas de atmosfera e aquecimento. A partir dos dados obtidos, é possível determinar a temperatura de perda de massa, que corresponde à temperatura na qual ocorre a decomposição, a volatilização dos componentes da amostra, bem como a cinética desses processos. A análise termogravimétrica pode ser utilizada para avaliar diversas propriedades dos materiais, como estabilidade térmica, conteúdo de umidade, presença de impurezas, entre outras.

## 4 Ensaio de adsorção

### 4.1 Adsorção e os mecanismos que governam esse processo

A adsorção de íons é um dos fenômenos mais importantes para a ciência do solo por ser o principal atributo a afetar a concentração da maioria dos elementos minerais na solução do solo, de maneira que a concentração de uma substância numa fase torna-se maior na interface do que no seu interior (Alleoni; Melo; Rocha, 2019). Essa tendência de acumulação de uma substância sobre a superfície de outra é o resultado da manifestação de interações complexas dos três componentes envolvidos: adsorvente, adsorvato e solvente (Ciola, 1981; Arfaoui; Frini-Srasra; Srasra, 2008).

Na adsorção há o envolvimento de forças físicas e químicas e união entre íons ou moléculas presentes na solução do solo com sítios reativos (de adsorção) na superfície externa dos compostos sólidos (Ernani, 2016). Os grupos funcionais estruturais localizados nas superfícies externas dos compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo as cargas elétricas, são os sítios de adsorção da fase sólida do solo. Os principais grupos funcionais presentes na fração orgânica do solo, segundo Sparks (1995) são: carboxila, hidroxila fenólica, enol, hidroxila alcoólica, amina, amida, aldeído e cetona, muito importantes tanto na geração de cargas elétricas negativas para a química quanto para as reações físico-químicas do solo.

Os íons importantes e de interesse agrícola na adsorção são os ânions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{BO}_3^-$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$  e  $\text{SeO}_4^{2-}$ , bem como os cátions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  (Ernani, 2016). Os cátions se ligam a grupos funcionais doadores de elétrons localizados nas superfícies externas dos minerais de argila, da MOS e dos óxidos e hidróxidos de Fe e Al, e os ânions se ligam aos constituintes sólidos do solo por meio das cargas positivas presentes nas superfícies externas dos sólidos orgânicos e inorgânicos através de forças eletrostáticas. Cátions

metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  são adsorvidos por complexação de esfera interna com grupos funcionais na MOS ou outro material de origem orgânica, e nas bordas de minerais, enquanto que metais alcalinos e alcalinos-terrosos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  têm mecanismos de sorção diferentes por possuir esferas de hidratação fortes e ser adsorvidos por complexação de esfera externa em superfícies carregadas negativamente (Strawn, 2021).

A adsorção específica controla a disponibilidade de vários nutrientes catiônicos para as plantas, bem como representa o principal mecanismo de adsorção de elementos potencialmente tóxicos, como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Hg}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , entre outros (Ernani, 2016). O pH, a CTC e a presença de cátions afeta a adsorção e a especiação iônica de elementos potencialmente tóxicos nos solos (Silveira; Alleoni; Guilherme, 2003).

#### 4.2 Cinética de adsorção

A fim de avaliar o potencial de remoção de EPTs, testes de adsorção são realizados utilizando a proteína do solo relacionada à glomalina de diferentes solos. GRSP tem potencial e propriedades adsorptivas para remoção de Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Pb, Zn e outros metais, em diferentes tempos de contato, pH e concentrações. Estudos cinéticos são importantes para determinar o tempo de equilíbrio alcançado após contato entre o adsorvente e o contaminante, ou seja, situação na qual a quantidade de adsorvato adsorvida está em equilíbrio com a quantidade dessorvida. Além do equilíbrio de adsorção, também se determina a eficiência de remoção pelo adsorvente através da cinética. A capacidade de adsorção e a eficiência de remoção são estudadas nesse processo.

Os modelos cinéticos lineares disponibilizados na literatura e usualmente utilizados nos estudos cinéticos na ciência do solo são ferramentas valiosas para entender como os solos interagem com substâncias químicas, como poluentes e nutrientes (Tran et al., 2017; Guo & Wang, 2019). A cinética de adsorção descreve a velocidade na qual as moléculas de soluto são adsorvidas pela superfície do adsorvente e como essa adsorção é influenciada por diversos fatores, como a concentração inicial do soluto, temperatura e pH (Tran et al., 2017). Entre os modelos cinéticos lineares de adsorção mais comuns na ciência do solo, destacam-se a pseudoprimeira ordem, pseudossegunda ordem e difusão intrapartícula (Guo & Wang, 2019).

O modelo de pseudoprimeira ordem é comumente utilizado para entender o mecanismo de adsorção do adsorvato na fase líquida, ou seja, descreve a adsorção de um soluto e a velocidade da reação é proporcional à concentração do soluto na solução. Esse modelo tem sido

aplicado para descrever a adsorção de diversos solutos, como pesticidas e metais pesados (Tran et al., 2017; Guo & Wang, 2019).

O mecanismo de pseudossegunda ordem descreve a dependência da cinética de adsorção pela quantidade de sítios de adsorção na superfície do material adsorvente, no qual a velocidade da reação é proporcional ao produto da concentração do soluto na solução e da quantidade de adsorvente disponível. Este mecanismo é muito utilizado para experimentos de adsorção de íons metálicos em soluções aquosas e para prever a concentração final de adsorção em equilíbrio.

O modelo de difusão intrapartícula é baseado na hipótese de que a adsorção de um soluto ocorre em duas etapas: a difusão do soluto para a superfície do adsorvente e a adsorção propriamente dita. Esse modelo pode ser utilizado para prever a cinética de adsorção em sistemas complexos, como materiais com alta heterogeneidade (Guo & Wang, 2019).

#### 4.3 Isotermas de adsorção

Para especificar o equilíbrio da adsorção e a relação entre a concentração de do adsorvato em solução e a quantidade adsorvida por unidade de massa de adsorvente, as isotermas são ferramentas importantes (Foo & Hameed, 2010; Tran et al., 2017). São modelos matemáticos representados por equações simples. Entre as isotermas de adsorção mais utilizadas na ciência do solo, destacam-se as isotermas de Freundlich, Langmuir e outras isotermas que são a combinação ou aperfeiçoamento dos modelos citados (Al-Ghouti & Da'ana, 2020).

A isoterma de Freundlich é uma equação empírica que descreve a relação não-linear entre a concentração de um soluto em solução e a quantidade adsorvida por unidade de massa de adsorvente. Essa isoterma é amplamente utilizada na caracterização da capacidade de adsorção do solo, pois leva em consideração a heterogeneidade dos materiais adsorventes e sua interação com os solutos em solução (Al-Ghouti & Da'ana, 2020).

A isoterma de Langmuir é uma equação que assume a formação de uma monocamada de moléculas adsorvidas sobre a superfície do adsorvente. Essas isotermas são úteis para prever a concentração máxima de adsorção, ou seja, a quantidade de soluto que pode ser adsorvida por um determinado adsorvente (Foo & Hameed, 2010). Além disso, a isoterma de Langmuir assume que a energia de adsorção é constante e independente da cobertura da superfície, o que

pode limitar sua aplicabilidade em situações de adsorção em camadas múltiplas (Al-Ghouti & Da'ana, 2020).

Por fim, a isoterma de Sips, que é uma equação que combina as vantagens da isoterma de Freundlich e da isoterma de Langmuir (Foo & Hameed, 2010; Al-Ghouti & Da'ana, 2020). Essa isoterma é útil para descrever a adsorção em sistemas heterogêneos, nos quais a energia de adsorção pode variar ao longo da superfície do adsorvente. Além disso, a isoterma de Sips pode ser utilizada para prever a concentração máxima de adsorção, assim como a isoterma de Langmuir (Foo & Hameed, 2010; Al-Ghouti & Da'ana, 2020).

## 5 Utilização da proteína do solo relacionada à glomalina natural em processos de descontaminação ambiental

GRSP surge como um adsorvente natural alternativo e podemos considerá-lo uma tecnologia ambientalmente amigável por ser somente extraído de solos com uso de poucos reagentes. Consequentemente, faltam dados sobre a caracterização química de GRSP de solos tropicais e seu potencial como um adsorvente de Cd, uma informação útil no manejo de áreas contaminadas afetando seu destino ambiental. Como ainda é incipiente a utilização de GRSP para imobilização de elementos potencialmente tóxicos, sem nenhum relato no Brasil até onde sabemos, mais testes de laboratório necessitam ser conduzidos a fim de avaliar a contribuição de sequestro de EPTs em soluções aquosas e esclarecimento dos mecanismos de adsorção e sua caracterização química. Para isso, esse trabalho de tese foi conduzido visando elucidar a composição química de GRSP de diferentes ambientes, avaliá-la e propor aplicações ambientais deste material.

## REFERÊNCIAS

ANUÁRIO MINERAL BRASILEIRO - ANM: principais substâncias metálicas. 2023. **Agência Nacional de Mineração**, Brasília, 23 p.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. 2023. **Substance Priority List 2022**. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2022spl>. Acesso em 16 Mar.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. 2023. **Toxicological Profile for Lead**. U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>. Acesso em 10 Apr.

AGNIHOTRI, R. et al. 2021. Glomalin related protein and C16:1 $\omega$ 5 PLFA associated with AM fungi as potential signatures for assessing the soil C sequestration under contrasting soil management practices. **European Journal of Soil Biology**, v. 103.

ALEXANDRINO, R. C. S. et al. Lead acetate ecotoxicity in tropical soils. 2021. **Ecotoxicology**, v. 30, p. 1029–1042.

AL-GHOUTI, M. A.; DA'ANA, D. A. 2020. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 393, 122383.

ANDRADE, M. F., MORAES, L. R. S. 2013. Lead contamination in Santo Amaro defies decades of research and delayed reaction on the part of the public authorities. **Ambient. Soc.**, v. 16 (2).

ARFAOUI, S.; FRINI-SRASRA, N.; SRASRA, E. 2008. Modelling of the adsorption of the chromium ion by modified clays. **Desalination**, Amsterdam, v. 222, pp. 474-481.

BALOTA, E. L. et al. 2014. Benefits of winter cover crops and no-tillage for microbial parameters in a Brazilian Oxisol: A long-term study. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 197, pp. 31-40.

BARBOSA, M. V. et al. 2021. Aggregation of a Ferruginous Nodular Gleysol in a pasture area in Cuba, under the influence of Arbuscular mycorrhizal fungi associated with hybrid *Urochloa*. **Soil and Tillage Research**, v. 208.

BARBOSA, M. V. et al. 2019. Do different arbuscular mycorrhizal fungi affect the formation and stability of soil aggregates? **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43.

BATISTA, E. R. et al. 2020. Environmental drivers of shifts on microbial traits in sites disturbed by a large-scale tailing dam collapse. **Science of the Total Environment**, v. 725, 139453.

BATISTA, E. R. et al. 2022. Organic substrate availability and enzyme activity affect microbial-controlled carbon dynamics in areas disturbed by a mining dam failure. **Applied Soil Ecology**, v. 169, 104169.

BENG, R. F. et al. 2022. Pollution and health: a progress update. **The Lancet Planetary Health**, v. 6, p. 535-547.

BERTAGNOLI, B. G. P. et al. 2020. Poultry litter and liquid swine slurry applications stimulate glomalin, extraradicular mycelium production, and aggregation in soils. **Soil and Tillage Research**, v. 202.

BLACKSMITH INSTITUTE The world's worst 2013: the top ten toxic threats. 2013. Available in: <https://www.worstpolluted.org/docs/TopTenThreats2013.pdf>. Acesso em 16 Mar. 2023.

BOUIDA, L. et al. 2022. A Review on Cadmium and Lead Contamination: Sources, Fate, Mechanism, Health Effects and Remediation Methods. **Water**, 14(21), 3432.

CÂNDIDO, G. S. et al. 2020. Toxic effects of lead in plants grown in Brazilian soils. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 305–313.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. 2001. Estabelecimento de plantas herbáceas em solos contaminados com metais pesados: Efeito da mistura de espécies e inoculação com fungos micorrízicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 36, n.12, p. 1443-1452.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. 2002. Comportamento de trinta e uma espécies herbáceas em solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília - DF, v. 37, n.11, p. 1629-1639.

CHEN, H. et al. 2022. Sequestration of heavy metals in soil aggregates induced by glomalin-related soil protein: A five-year phytoremediation field study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 437(5).

CHEN, S. N.; RILLIG, M. C.; WANG, W. 2009. Improving soil protein extraction for metaproteome analysis and glomalin-related soil protein detection. **Proteomics**, v. 9, pp. 4970-4973.

CHEN, S. et al. 2020. Glomalin-related soil protein reduces the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by soils. **Chemosphere**, v. 260, 127603.

CIOLA, R. 1981. **Fundamentos de catálise**. São Paulo: Moderna, 377 p.

CISSE, G. et al. 2023. Accumulation and vertical distribution of glomalin-related soil protein in French temperate forest soils as a function of tree type, climate and soil properties. **Catena**, v. 220, part A.

COGO, F. D. et al. 2020. High rates of agricultural gypsum affect the arbuscular mycorrhiza fungal community and coffee yield. **Bragantia**, v. 79(4).

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. 2021. Atualização dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2021/12/DD-125-2021-E-Atualizacao-dos-Valores-Orientadores-para-solo-e-aguas-subterraneas.pdf> . Acesso em 16 Mar. 2023.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL - COPAM. 2011. Deliberação Normativa COPAM nº 166, 29 de junho de 2011: LISTA DE VALORES ORIENTADORES PARA SOLOS E ÁGUAS SUBTERRÂNEAS.



CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2009. RESOLUÇÃO No. 420, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2009: LISTA DE VALORES ORIENTADORES PARA SOLOS E PARA ÁGUAS SUBTERRÂNEAS.

CORDEIRO, C. F. S. et al. 2021. Glomalin and microbial activity affected by cover crops and nitrogen management in sandy soil with cotton cultivation. **Applied Soil Ecology**, v.167.

CORNEJO, P. et al. 2008. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. **Science of The Total Environment**, v. 406(1-2), p. 154-160.

ĆWIELAĞ-DRABEK, M. et al. 2020. Risk of cadmium, lead and zinc exposure from consumption of vegetables produced in areas with mining and smelting past. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 3363.

DANIELL, T. J. et al. 2001. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 36, pp. 203-209.

ERNANI, P. R. 2016. Química e disponibilidade de nutrientes. Santa Catarina: UDESC, 2<sup>a</sup> ed., 256 p.

FERREIRA, P. A. et al. 2018. Rhizophagus Clarus and Phosphorus in *Crotalaria juncea*: Growth, Glomalin Content and Acid Phosphatase Activity in a Copper-Contaminated Soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 42.

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. 2010. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 156(1), pp. 2-10.

GASTAUER, M. et al. 2020. Integrating environmental variables by multivariate ordination enables the reliable estimation of mineland rehabilitation status. **Journal of Environmental Management**, v. 256.

GILLESPIE, A. W. et al. 2011. Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43(4), p. 766-777.

GOMES, V. M. et al. 2021. Glomalin-Related Soil Protein Reflects the Heterogeneity of Substrate and Vegetation in the Campo Rupestre Ecosystem. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, p. 733–743.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. C. et al. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution**, v. 130(3), p. 317-323.

GUJRE, N. et al. 2021. Deciphering the dynamics of glomalin and heavy metals in soils contaminated with hazardous municipal solid wastes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416.

GUO, X.; WANG, J. 2019. A general kinetic model for adsorption: Theoretical analysis and modeling. **Journal of Molecular Liquids**, v. 288, 111100.

GUO, Z. et al. 2022. Spatial heterogeneity in chemical composition and stability of glomalin-related soil protein in the coastal wetlands. **Science of The Total Environment**, v. 835.

GUO, Z. et al. 2023. Variation of glomalin-metal binding capacity in 1 m soil profiles from mangrove forests to mudflat and affected factor analysis. **Science of The Total Environment**, v. 863.

HASSAN, S. E. et al. 2011. Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. **Mol. Ecol.**, v. 20, pp. 3469-3483.

HIGASHI, R. M., CASSEL, T., GREEN, P. G., FAN, T. W.-M. 2005. <sup>13</sup>C-Tracer Studies of Soil Humic Substructures That Reduce Heavy Metal Leaching. ACS Symposium Series, chapter 7, pp. 138-157. 2005. DOI: 10.1021/bk-2005-0904.ch007. In. BERKEY, E., ZACHRY, T. Subsurface Contamination Remediation: Accomplishments of the Environmental Management Science Program. 2005. **American Chemical Society**, v. 904, 396 p.

HILL, M. 2010. Understanding Environmental Pollution, 3rd edn, **Cambridge University Press**, New York, EUA.

HOLÁTKO, J. et al. 2021. Glomalin – Truths, myths, and the future of this elusive soil glycoprotein. **Soil Biology and Biochemistry**, Elsevier, v. 153-108116.

HUDSON-EDWARDS, K. 2016. Tackling mine waste. **Science**, 352, 288–290. DOI: 10.1126/science.aaf3354.

IRVING, T. B., ALPTEKIN, B., KLEVEN, B., ANÉ, J. 2021. A critical review of 25 years of glomalin research: a better mechanical understanding and robust quantification techniques are required. **New Phytologist**, v. 232, p. 1572–1581.

JANEESHMA, E., PUTHUR, J. T. 2020. Direct and indirect influence of arbuscular mycorrhizae on enhancing metal tolerance of plants. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1-16.

JI, X. et al. 2023. Tree species richness and arbuscular mycorrhizal tree fraction of leaf litter increase carbon and nitrogen retention in soil with macroaggregate and glomalin accrual. **Plant and Soil**, 15 March.

JORDÃO, T. C. et al. 2021. Shifts in Arbuscular Mycorrhizal fungal properties due to vegetative remediation of mine spoil contamination from a dam rupture in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 162.

KABATA-PENDIAS, A., SZTEKE, B. 2015. Trace Elements in Abiotic and Biotic Environments. **CRC Press**, 1st Ed., 468 p.

KAUR, H et al. 2023. Reconditioning of plant metabolism by arbuscular mycorrhizal networks in cadmium contaminated soils: Recent perspectives. **Microbiological Research**, Elsevier, v. 268-127293.

KLAUBERG-FILHO, O. et al. 2023. An alternative risk assessment framework for tropical soil multi-metal contamination using arbuscular mycorrhizal fungi. **Science of The Total Environment**, v. 874.

KOBIERSKI, M. et al. 2018. Humic substances and aggregate stability in rhizospheric and non-rhizospheric soil. **Humic Substances in the Environment**, v. 18, pp. 2777–2789.

KUBIER, A., WILKIN, R. T., PICHLER, T. 2019. Cadmium in soils and groundwater: A review. **Appl. Geochem.**, 1;108, p. 1-16.

KUMAR, S., SINGH, A. K., GHOSH, P. 2018. Distribution of soil organic carbon and glomalin related soil protein in reclaimed coal mine-land chronosequence under tropical condition. **Science of The Total Environment**, v. 625, p. 1341-1350.

KÄMPF, N; MARQUES, J. J.; CURI, N. 2012. Mineralogia de solos brasileiros. In. KER, J. C. et al. *Pedologia-Fundamentos*, SBCS, Viçosa, pp. 81-146.

LAW, S. M. & MAHERALI, H. 2023. Variation in glomalin-related soil protein and plant growth response to arbuscular mycorrhizal fungi along a nutrient gradient in temperate grasslands. **Plant and Soil**, 10 March.

LEIFHEIT, E. F. et al. 2014. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation—a meta-analysis. *Plant and Soil*, v. 374, pp. 523-537.

LI, H. et al. 2022. Extraction and purification of glomalin-related soil protein (GRSP) to determine the associated trace metal(loid)s. **MethodsX**, v. 9.

LIMA, F. R. D. et al. 2022. Geochemistry signatures of mercury in soils of the Amazon rainforest biome. **Environmental Research**, v. 215(1), pp. 114-147.

LIN, L. et al. 2023. Sequestration of strontium, nickel, and cadmium on glomalin-related soil protein: Interfacial behaviors and ecological functions. **Science of the Total Environment**, v. 881:163461.

MANCINI, M. et al. 2021. Formation and variation of a 4.5 m deep Oxisol in southeastern Brazil. **Catena**, v. 206.

MATOS, P. S. et al. 2022a. Short-term modifications of mycorrhizal fungi, glomalin and soil attributes in a tropical agroforestry. **Acta Oecologica**, v. 114.

MATOS, P. S. et al. 2022b. Beneficial services of Glomalin and Arbuscular Mycorrhizal fungi in degraded soils in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 79(5).

MELO, V. F. et al. 2012. Chumbo e zinco em águas e sedimentos de área de mineração e metalurgia de metais. **Química Nova**, 35(1): 22–29.

MÉNDEZ, D. F. S. et al. 2019. Maize Productivity, Mycorrhizal Assessment, Chemical and Microbiological Soil Attributes Influenced by Maize-Forage Grasses Intercropping. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 62.

MIGUEL, D. L. et al. 2020. Soil microbiological properties and enzyme activity in agroforestry systems compared with monoculture, natural regeneration, and native Caatinga. **Bioscience Journal**, v. 36(1), p. 1–16.

MOITINHO, M. R. et al. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation in a no-tillage system with crop rotation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 183, p. 482-491.

MUNKVOLD, L. et al. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytol.**, v. 164, pp. 357-364.

NAVARRO-LEÓN, E. et al. 2019. Possible role of HMA4a tilling mutants of *Brassica rapa* in cadmium phytoremediation programs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Elsevier, v. 180, p. 88-94.

NOBRE, C. P. et al. 2015. Agregação, glomalina e carbono orgânico na chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28(1), pp. 138 –147.

OLIVEIRA, T. et al. 2022. Carbon and nitrogen stocks and microbial indicators in tropical semiarid degraded Luvisols. **Catena**, v. 210.

ÖPKI, M. et al. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). **New Phytol.**, v. 188, pp. 223-241.

PEDROSO, D. F. et al. 2018. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Favor the Initial Growth of *Acacia mangium*, *Sorghum bicolor*, and *Urochloa brizantha* in Soil Contaminated with Zn, Cu, Pb, and Cd. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 101, p. 386-391.

PINTO, L. A. S. R. et al. 2022. Stability, labile organic carbon, and glomalin of biogenic aggregates in sandy soils under management systems in the subtropical region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 46.

PURIN, S. et al. 2006. Mycorrhizae activity and diversity in conventional and organic apple orchards from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38(7), pp. 1831-1839.

QIN, G. et al. 2021. Soil heavy metal pollution and food safety in China: Effects, sources and removing technology. **Chemosphere**, v. 267.

REUER, M. K. et al. 2012. Lead, Arsenic, and Cadmium Contamination and Its Impact on Children's Health in La Oroya, Peru. **International Scholarly Research Notices**, ID 231458, 12 p.

REYES, H. A. et al. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi along secondary forest succession at the eastern periphery of Amazonia: Seasonal variability and impacts of soil fertility. **Applied Soil Ecology**, v. 136, p. 1-10.

RIBEIRO, A. P. et al. 2015. Effects of contamination with toxic metals on the environmental quality of Sepetiba Bay (SE Brazil). **Management of Environmental Quality: an International Journal**, v. 26, n. 4, p. 538–551.

RIBEIRO JUNIOR, A. C. et al. 2021. Biochemical attributes and establishment of tree seedlings in soil after *Urochloa decumbens* cultivation in soil with deposition of iron mining residues. **Cerne**, v. 27.

RIBEIRO, P. G. et al. 2022. Spectral and Soil Quality Index for Monitoring Environmental Rehabilitation and Soil Carbon Stock in an Amazonian Sandstone Mine. **Sustainability**, v. 14(2), 597. p. 1-16.

RILLIG, M. C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 84(4).

RILLIG, M. C. et al. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, v. 233, p. 167–177.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R. M. et al. 2021. Native arbuscular mycorrhizal fungi respond to rehabilitation in iron ore mining areas from the Eastern Brazilian Amazon. **Pedobiologia - Journal of Soil Ecology**, v. 89.

SANTIAGO, F. L. A. et al. 2022. Rehabilitation promotes rapid recovery of arbuscular mycorrhizal fungi in iron mining areas. **Pedobiologia**, v. 95.

SANTOS, A. et al. 2020. Glomalin in soil aggregates under different forest and pasture systems in the North of Rio de Janeiro state, Brazil. **Environmental and Sustainability Indicators**, v. 8.

SCHINDLER, F. V., MERCER, E. J., RICE, J. A. 2007. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39(1), p. 320-329.

SCHÜBLER, A. et al. 2001. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: Implications for primer design and phylogeny. **Mycol. Res.**, 105: 5–15.

SILVA, A. O. et al. 2021. Chemical, physical, and biological attributes in soils affected by deposition of iron ore tailings from the Fundão Dam failure. **ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT**, v. 193, p. 1.

SILVA, C. F. et al. 2020. Enzyme Activity, Glomalin, and Soil Organic Carbon in Agroforestry Systems. **Floresta e Ambiente**, v. 27(3).

SILVA, C. F. et al. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungal communities and soil organic matter in pasture and analog agroforestry systems. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 16(2).

SILVA, C. P. et al. 2018. Glomalin-Related Soil Protein Content in Areas of Degraded and Revegetated Caatinga in the Municipality of Irauçuba. **Journal of Agricultural Science**, v. 10(1).

SILVA, F. M. et al. 2021. Chemical and mineralogical changes in the textural fractions of quartzite-derived tropical soils, along weathering, assessed by portable X-ray fluorescence spectrometry and X-ray diffraction **Journal of South American Earth Sciences**, v. 112(2).

SINGH, A. K. et al. 2020. The role of glomalin in mitigation of multiple soil degradation problems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50: 1-35.

SMITH, S. E., READ, D. J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. **London**, Academic Press, 3rd ed.

SOUZA R. G. et al. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated mined dunes. **Land Degradation & Development**, v. 24(2), pp. 147-155.

STAUNTON, S. et al. 2020. Can soil properties and land use explain glomalin-related soil protein (GRSP) accumulation? A nationwide survey in France. **Catena**, v. 193.

STRAWN, D. G. 2021. Sorption Mechanisms of Chemicals in Soils. **Soil Systems**, 5(1), 13.

SUN, Y. et al. 2015. The molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the arsenic mining impacted sites in Hunan province of China. **J. Environ. Sci.**, v. 39, pp. 110-118.



TRAN, H. N. et al. 2017. Mistakes and inconsistencies regarding adsorption of contaminants from aqueous solutions: A critical review. **Water Research**, v. 120, pp. 88-116.

TRESEDER, K. K., TURNER, K. M. 2007. Glomalin in ecosystems. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, pp. 1257 - 1266.

TRINDADE, W. M., HORN, A. H., RIBEIRO, E. V. 2012. Concentrações de metais pesados em sedimentos do rio São Francisco entre Três Marias e Pirapora-MG: geoquímica e classificação de risco ambiental. **Geonomos**, 20(1), 64-75.

TRUBER, P. V., FERNANDES, C. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungal communities and soil aggregation as affected by cultivation of various crops during the sugarcane fallow period. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 38(2).

VASCONCELLOS, R. L. F. et al. 2016. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin-Related Soil Protein as Potential Indicators of Soil Quality in a Recuperation Gradient of the Atlantic Forest in Brazil. **Land Degradation & Development**, v. 27(2), p. 325-334.

VIEIRA, C. K. et al. 2022. Does a decrease in microbial biomass alter mycorrhizal attributes and soil quality indicators in coal mining areas under revegetation process?. **Science of The Total Environment**, v. 802.

VODNIK, D. et al. 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. **Science of The Total Environment**, v. 392(1), p. 130-136.

WANG, Q. et al. 2017. Changes in soil properties, X-ray-mineral diffractions and infrared-functional groups in bulk soil and fractions following afforestation of farmland, Northeast China. **Scientific Reports**, 7:12829.

WANG, Q. et al. 2021. Coastal soil texture controls soil organic carbon distribution and storage of mangroves in China. **Catena**, v. 207.

WANG, Q. et al. 2020. Interactions of soil metals with glomalin-related soil protein as soil pollution bioindicators in mangrove wetland ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 709, 136051.

WANG, Q. et al. 2015. Role and Variation of the Amount and Composition of Glomalin in Soil Properties in Farmland and Adjacent Plantations with Reference to a Primary Forest in North-Eastern China. **PLoS ONE**, USDA Forest Service USA, 10(10).

WANG, Q. et al. 2018. Spatial distribution of glomalin-related soil protein and its relationship with sediment carbon sequestration across a mangrove forest. **Science of The Total Environment**, v. 613: 548-556.

WANG, Q. et al. 2014. Spatial Variations in Concentration, Compositions of Glomalin Related Soil Protein in Poplar Plantations in Northeastern China, and Possible Relations with Soil Physicochemical Properties. **The Scientific World Journal**, Hindawi Publishing Corporation, 160403, Epub, Apr 6. PMID: 24955385; PMCID: PMC3997909.

WANG, W. et al. 2017. Glomalin contributed more to carbon, nutrients in deeper soils, and differently associated with climates and soil properties in vertical profiles. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13.

WILKES, T. I. et al. 2021. Zero Tillage Systems Conserve Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Enhancing Soil Glomalin and Water Stable Aggregates with Implications for Soil Stability. **Soil Systems**, 5(1), 4.

WRIGHT, S., UPADHYAYA, A. 1998. A Survey of Soils for Aggregate Stability and Glomalin, a Glycoprotein Produced by Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Plant and Soil**, 198, 97-107.

WU, Z. et al. 2014. Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration: Field experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 283-290.

YANG, R. et al. 2010. Variation in community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with a Cu tolerant plant—*Elsholtzia splendens*. **Appl. Soil Ecol.**, v. 44, pp. 191-197.

YUAN, B. O. et al. 2022. Immobilization of lead(II) and zinc(II) onto glomalin-related soil protein (GRSP): Adsorption properties and interaction mechanisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 236.

ZANCHI, C. S. et al. 2022. Pre-cultivation with Herbaceous Plants Assists in the Revegetation Process of Iron Mining Tailings with *Enterolobium contortisiliquum*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232(231).

ZANCHI, C. S. et al. 2021. Recovering Soils Affected by Iron Mining Tailing Using Herbaceous Species with Mycorrhizal Inoculation. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232(110).

ZHANG, M. et al. 2023. Decades of reforestation significantly change microbial necromass, glomalin, and their contributions to soil organic carbon. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 346.

ZHANG, Z. et al. 2017. Effects of soil salinity on the content, composition, and ion binding capacity of glomalin-related soil protein (grsp). **Science of The Total Environment**, v. 581, pp. 657–665.

ZHONG, Z. et al. 2016. Compositional variation of glomalin-related soil protein in different forest stands and farmland. **Journal of Beijing Forestry University**, pp. 107-115.

ZHONG, Z. et al. 2017. Glomalin amount and compositional variation, and their associations with soil properties in farmland, northeastern China. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180(5), pp. 563-575.

ZHOU, X. et al. 2022. Characterization of Different Molecular Size Fractions of Glomalin-Related Soil Protein From Forest Soil and Their Interaction With Phenanthrene. **Front. Microbiol.**, 12:822831.

ZIPPER, C. E. et al. 2016. Spatial and temporal relationships among watershed mining, water quality, and freshwater mussel status in an eastern USA river. **Science of The Total Environment**, 541, pp. 603–615.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**Artigo 1** - Caracterização da proteína do solo relacionada à glomalina em diferentes pedoambientes tropicais<sup>1</sup>

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

<sup>1</sup>Artigo redigido conforme normas do periódico científico Archives of Agronomy and Soil Science (ISSN: 1476-3567). Este artigo é uma versão preliminar e, portanto, poderão surgir alterações para adequá-lo. Os gráficos e tabelas foram inseridos no decorrer do texto para facilitar a leitura.

## Highlights

1. GRSP of mineral and organic soil were characterized
2. Fe, Al and Si are intrinsic to GRSP in tropical soils
3. Goethite and gibbsite are the striking minerals in GRSP
4. Physicochemical, microscopic, and mineralogical properties suggest new insights into the structure and applications of GRSP.

## Abstract

Analysis of the chemical, physical, morphological and mineralogical properties of glomalin-related soil protein (GRSP) can help to understand the structure of GRSP and its responses to different Brazilian pedosystems. Knowledge of the chemical and structural composition of GRSP is still incipient, especially in tropical pedosystems. Therefore, the objective of this study is to characterize the GRSP of two Brazilian soils using different characterization techniques. To do this, we characterize: functional groups (FTIR), elemental contents (XRF), mineralogical composition (XRD), surface morphology (SEM), mass loss as a function of temperature rise (TGA) and electrical charges ( $\text{pH}_{\text{ZPC}}$ ). GRSP as a complex of macromolecules, with different elements, rich in functional groups, was similar even in completely different pedosystems. It was observed that the dominant functional groups were OH of alcohol or phenol, -CH, COOH, C=O, C-aromatic and aliphatic,  $\text{NH}_2$ , CO-NH belonging to polysaccharides, proteins and amino acids, acting as adsorption sites, in addition to the marked presence of Fe/Al and O-Si-O oxy(hydro)oxides. By portable XRF, Fe, Al and Si are the main elements present in GRSP, but in GRSP LV their contents are accentuated (29, 10 and 2%). The mineralogical composition reveals that goethite and gibbsite are the main minerals present in GRSP, but it also contains hematite, maghemite, kaolinite and quartz. The surface morphology indicates that GRSP is a biofloculant material rich in Fe, Al and Si. TGA data demonstrate that GRSP has high thermostability and recalcitrance.  $\text{pH}_{\text{ZPC}}$  of GRSP Org (3.3) and GRSP LV (4.7) demonstrate high potential for cation adsorption. These properties, linked to different soil systems, provide us with information about the ecological functions of GRSP in soils with different original materials and pedological processes, and about the use of GRSP in the removal of potentially toxic elements.

**Keywords:** Ecological function, Histosol, Characterization of adsorbents, Glomalin, Tropical soils, Pedosystems.

## ***1. Introduction***

Glomalin-related soil protein (GRSP) is normally defined as a complex of proteins with a marked presence of carbon (C) and nitrogen (N), in addition to Fe, Al and other elements (Agnihotri et al., 2021). It is released by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which establish a mutualistic relationship with plant roots. GRSP is widely distributed in different ecosystems (forests, agricultural crops, natural or cultivated pastures, degraded lands) (Mattos et al., 2022), whose levels around the world vary between 0.005 (Cissé et al., 2023) to 113 mg g<sup>-1</sup> of soil (Schindler et al. 2007) and, specifically in Brazil, range from 0.01 (Nobre et al., 2015) to 135 mg g<sup>-1</sup> of soil (Gomes et al., 2020).

GRSP has important properties for soil health, as it is thermostable and recalcitrant (persistent in the soil), insoluble in water, with a reduced rate of decomposition (Rillig et al., 2001; Steinberg, 2003), with a cementing and aggregating action soil particles, favors the stabilization of soil aggregates (Barbosa et al., 2019) and the supply of organic carbon in its structure, which can be used by soil organisms in situations of soil degradation (Agnihotri et al., 2022 ; Matos et a., 2022), in addition to actively participating in the maintenance of physical, chemical and biological processes in the soil, helping the resilience of ecosystems.

Research carried out around the world has characterized GRSP, demonstrating that its chemical structure is mainly composed of non-fungal materials (humic acids), thermostable proteins, amino acids, lipids (Schindler et al., 2007; Gillespie et al., 2011; Wang et al., 2014; Zhong et al., 2017; Yuan et al., 2022) and functional groups (CH, C=O, OH, NH, mainly). The chemical composition of GRSP includes 30 to 60% carbon (Agnihotri et al., 2022; Lovelock et al., 2004) and organic carbon stocks in the surface layer of Brazilian soils, on average, are 45 t ha<sup>-1</sup>, led by the Atlantic Forest (50 t ha<sup>-1</sup>), Pampa (49 t ha<sup>-1</sup>), Amazon (48 t ha<sup>-1</sup>), Cerrado (41 t ha<sup>-1</sup>), to smaller stocks in the Pantanal (38 t ha<sup>-1</sup>, 1) and Caatinga (31 t ha<sup>-1</sup>) (MapBiomass, 2023). In other words, GRSP greatly contributes to the carbon stock in Brazilian soils.

Other studies have characterized GRSP using mineralogical (Zhong et al., 2017; Yuan et al., 2022) and spectrometric (Chen et al., 2022) techniques. GRSP has a mineralogical composition with smectite, vermiculite, montmorillonite, illite, feldspar, plagioclase, cristobalite, quartz, calcite and huntite, in addition to kaolinite and Fe and Al oxides. GRSP also exhibits its complexity in terms of elements in its composition. It has been reported that in addition to C,

O, H and N, GRSP contains Si, Fe, Al, Na, K, Ca, Mg, P (Agnihotri et al., 2022), Zn, Pb and S (Chen et al., 2022).

Using the scanning electron microscopy (SEM) technique, a scaly surface morphology with irregular, porous, amorphous structure and the presence of C, N, O, H, Fe, Al, Ca, P, Cu Na, Mg, Si, Zn, Au, can be observed (Wang et al., 2021; Agnihotri et al., 2022; Yuan et al., 2022). Finally, thermogravimetric analysis (TGA) indicates the mass loss of GRSP as a function of increasing temperature (Wang et al., 2021). These authors discovered that from 200 °C onwards, degradation of simpler macromolecules occurs, depolymerization, and above 500 °C by aromatic decomposition.

However, characterization of GRSP from tropical soils is scarce. As far as we know, in Brazil, there is only one study that characterized GRSP from different ecosystems, and using SEM, FTIR and NMR techniques (De Souza, 2016). According to Holátko et al. (2021), the structure of GRSP still needs to be elucidated with a more detailed examination, given its highly complex nature and importance in its three main ecological functions: aggregation, structuring and stability of aggregates; carbon sequestration; immobilization of potentially toxic elements (EPTs), mainly in different Brazilian pedosystems.

Our hypothesis is that the mineralogical and elemental structure and composition of GRSP differs depending on the type of pedosystem. Thus, the general objective of this study was to use chemical, physical and mineralogical analyzes together to characterize the soil protein related to glomalin from a dystroferic Red Oxisol and a Haplic Histosol originating from different source materials and pedoenvironments. It is expected that this study will demonstrate a structural composition for GRSP that responds according to the type of pedosystem in which it is found, with its due particularities.

## ***2. Material and methods***

### *2.1. GRSP origin and soils source materials*

The different GRSPs used in this study were obtained from soils on the university campus of the Federal University of Lavras (UFLA), in the city of Lavras (21°13'41.3" S 44°58'12.7" W and 21°13'49.0" S 44 °57'43.0" W). These soils were chosen based on the soil classification by



Curi et al. (2017), mainly due to the organic matter, iron and clay content. The source material is basically for the Dystriferric Red Oxisol (LVdf), a gabbro with a higher content of  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  and clay, and for the Haplic Histosol (OX), a mixture of colluvial and colluvial sediments from Oxisols under gabbro and granite-gneiss and with a predominance of organic materials (Curi et al., 2017). The LVdf vegetation consists of a preserved secondary forest with no history of land use and OX with the presence of preserved natural shrubs and grasses, which enhances the maintenance of the soil's original characteristics. The UFLA campus is located on the South American geomorphic surface, with altitudes of 875 to 950 m, where the influence of leucocratic and mesocratic granitic gneisses, gabbro intrusions and colluvial sediments occurs (Curi et al., 2017). The soils used represent around 35.1% of the area. The local climate is type Cwa, with hot, humid summers and cold, dry winters, according to the Köppen classification.

## 2.2. Soil characterization, reagents, isolation and purification of GRSP

Soil samples were collected at a depth of 0-0.1 m, immediately taken to a cold room at 4°C subsequently air-dried and homogenized for chemical analysis (Table 1).

Table 1. Physicochemical properties of soil samples collected (0-0.10 m) from two natural soils (Oxisol and Hystosol) in two pedosystems.

Properties	Soils		
	Oxisol	Histosol	
$\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$			
	Sand	18	36
Texture (%)	Silt	19	23
	Clay	63	41
CEC ( $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ )	11.0	15.7	
OM (%)	6.5	15.8	
P-rem ( $\text{mg L}^{-1}$ )	24.7	8.1	
K ( $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ )	0.2	0.2	
Ca ( $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ )	5.0	1.5	
Mg ( $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ )	0.6	0.3	
P ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	3.5	9.9	
Al ( $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ )	0.2	1.6	
H + Al ( $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ )	5.3	13.7	

B (mg dm <sup>-3</sup> )	0.1	0.1
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	2.4	1.1
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	58.6	41.2
S (mg dm <sup>-3</sup> )	8.1	3.5
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	3.3	1.1
Cd (mg dm <sup>-3</sup> )	0.002	0.002
Total N (g kg <sup>-1</sup> )	3.3	5.6

pH in water soil:solution 1:2.5; Ca-Mg-Al- Extractant: KCl - 1 mol L<sup>-1</sup> ; OM; Organic matter oxidized by Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (4N) + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10N); H+Al; SMP extractor; B; hot water extractant; S; monocalcium phosphate extractor in acetic acid; P-K-Fe-Zn-Cu-Cd Extractant Mehlich-1; Total N; Kjeldahl method; P-rem; remaining phosphorus t: effective exchange cation capacity; V: base saturation index.

Extraction and purification of easily extractable glomalina related soil protein (EE-GRSP) from soils was carried out by the easily extractable soil protein extraction method with some modifications (Wright & Upadhyaya, 1998; Rillig). For the extraction of EE-GRSP from the two soils, the protein extraction method with some modifications was used (Wright and Upadhyaya, 1996). Initially, the soil containing EE-GRSP is subjected to sodium citrate buffer (8 mL, 20 mM, pH = 7.2) and autoclaved at 121 °C for 30 minutes. The resulting supernatant was collected by centrifugation at 3200 rpm for 15 minutes.

Subsequently, the EE-GRSP present in the supernatant was precipitated by the slow addition of 1 M HCl until the pH reached 2.0. To ensure complete precipitation, the solution was kept in an ice bath for at least 24 hours. The precipitate obtained was then redissolved with 1.0 ml of 0.1 M NaOH and subjected to dialysis in deionized water for up to 48 hours or until the electrical conductivity of the solution was  $\leq 1.0 \mu\text{S cm}^{-1}$ . The dialysis water was changed every 12 hours and the pH, electrical conductivity and Na<sup>+</sup> concentration were determined using a pH meter/conductivity meter and flame photometer and/or ICP-OES.

Finally, the purified EE-GRSP samples were previously frozen at -80 °C in an ultrafreezer and, after freezing, they were sent to the freeze dryer (Liotop L101) where the temperature was kept stable at -45 °C ( $\pm 5$  °C), with initial pressure around 650  $\mu\text{Hg}$  for the freeze-drying process. After 48 hours, the process was completed and a material of lightness and characteristic color was obtained in accordance with the soil from which it was extracted. After freeze-drying, the

materials were placed in a closed container and placed in a desiccator to keep it dry. They were then macerated in a mortar with an agate pestle, sieved through a #0.250 mm mesh, homogenized (Fig. 1) and transferred to a closed container for further characterization.

Figure 1. GRSP of Dystroferric Red Oxisol and Haplic Histosol after freeze-drying and homogenization.



### *2.3. Spectroscopic, spectrometric, mineralogical, microscopic, thermal and zero charge point characterizations of GRSP*

In this research, the characterization of natural GRSP extracted from typical dystroferric Red Oxisol (GRSP LV) and Haplic Histosol (GRSP Org) was carried out. The characterization techniques were Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), portable X-ray fluorescence spectroscopy (pXRF), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and zero charge point ( $\text{pH}_{\text{ZPC}}$ ).

The surface functional groups of these samples were measured using a Varian 600-IR Fourier Transform Infrared spectrometer equipped with a Pike Technologies GladiATR accessory for attenuated total reflectance (ATR) measurements at a  $45^\circ$  angle with zinc selenide crystal (where the sample was placed without any prior treatment). The spectral range analyzed was  $4,000$  to  $400 \text{ cm}^{-1}$ , resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$  and 32 scans. The identification of functional groups and interpretation of spectra followed the records of Schindler et al (2007), Gillespie et al (2011), De Souza et al (2016) and Yuan et al (2022). The correspondence between functional

groups and peak wavenumbers was determined following the methodologies described by De Souza et al. (2016) Zhang et al. (2017) and Yuan et al. (2022).

X-ray fluorescence spectrometry was used to analyze elements present in GRSP. The samples were scanned with a portable XRF S1 Titan 800 equipment, model Bruker® (series 800N8578), using the same settings as the previously described equipment. The operating conditions were “Geoexploration” mode and dwell time of 90 s. Approximately 2 g of GRSP was placed in a container and placed on the circular film. For quality assurance and control, readings of NIST SRM 2710a standards certified by the National Institute of Standards and Technology (NIST) were performed, along with a sample certified by the pXRF manufacturer.

To analyze the crystalline structure and morphology of the samples, X-ray diffraction (XRD) techniques were used. The analysis was carried out on a Bruker D2-Phaser diffractometer equipped with a linear detector (TYNXEYETM type) and DIFFRAC.SUITE™ analysis software. The diffractometer was operated with Cu  $\kappa\alpha$  radiation ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ) generated at 30 kV and 10 mA. The slides were made with powdered material (without guidance). The scanning amplitude was from 4 to 50  $^{\circ}2\theta$  with an interval of 0.01  $^{\circ}2\theta$  for 1 s. The identification of reflections in the diffractograms was carried out according to the identification tables of Brown and Brindley (1980).

The microscopic characteristics, surface morphology and elements present in GRSP were characterized using the SEM technique. For this, a scanning electron microscope/energy dispersive X-ray spectroscopy was used (Carl Zeiss mod. EVO 50/IXRF Systems mod. 500 Digital Processing). The samples were placed on an aluminum stub and fixed on carbon strips, covered with a thin layer of gold (5 nm thick), with a gold deposition time of 120 s to improve image definition, and magnified at 100x, 500x and 1000x.

To evaluate thermal stability, TGA was used using a thermogravimetric analyzer, with a recording system (TA-60WS). The equipment consists of a scale, oven, sample holder, temperature sensor, oven temperature programmer (DTG-60A/ 60AH), furnace flow and atmosphere controller (FC-60A). Approximately 10 mg of each sample was heated in an alumina crucible, with a flow rate of 50 mL min<sup>-1</sup> and a temperature gradient between 25 °C and 1000 °C, at a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>, under a continuous flow of synthetic air and

nitrogen (N<sub>2</sub>). Then, the first derivative of the TGA curve was calculated, which establishes the mass loss over the temperature range used.

For the qualitative characterization of the surface charge of GRSP, the point of zero charge of each GRSP was determined from potentiometric titration, with a mixture of 0.010 g of GRSP with 10.00 mL of a 0.100 M NaCl solution, and initial pH previously adjusted. The initial pH values investigated were 3.00; 4.00; 5.00; 6.00; 8.00; 9.00; 10.50 and 12.00, obtained by adding HCl (0.1 M) or NaOH (0.1 M) solution and using a SevenMulti pH meter (METTLER TOLEDO). The suspended samples containing the GRSP mixtures with each pH-adjusted solution were shaken on a SL 180/DT bench shaker table, with agitation at 150 rpm and temperature maintained at 25 °C for a period of 24 h and remained at rest for 24 h, and then the final pH of the supernatant was read (Mimura et al., 2010). With the data, an initial pH versus  $\Delta$ pH curve was constructed, with the ZPC value calculated using the linear adjustment model with the averages of the points at which the pH values behaved as a buffer, that is, the surface charge of the adsorbent is zero ( $\Delta$ pH = 0).

#### **2.4. Statistical analysis**

Statistical analyzes and graphs were performed using Origin 2023 (OriginLab) and, when convenient, Microsoft Excel 2013.

### **3. Results and discussion**

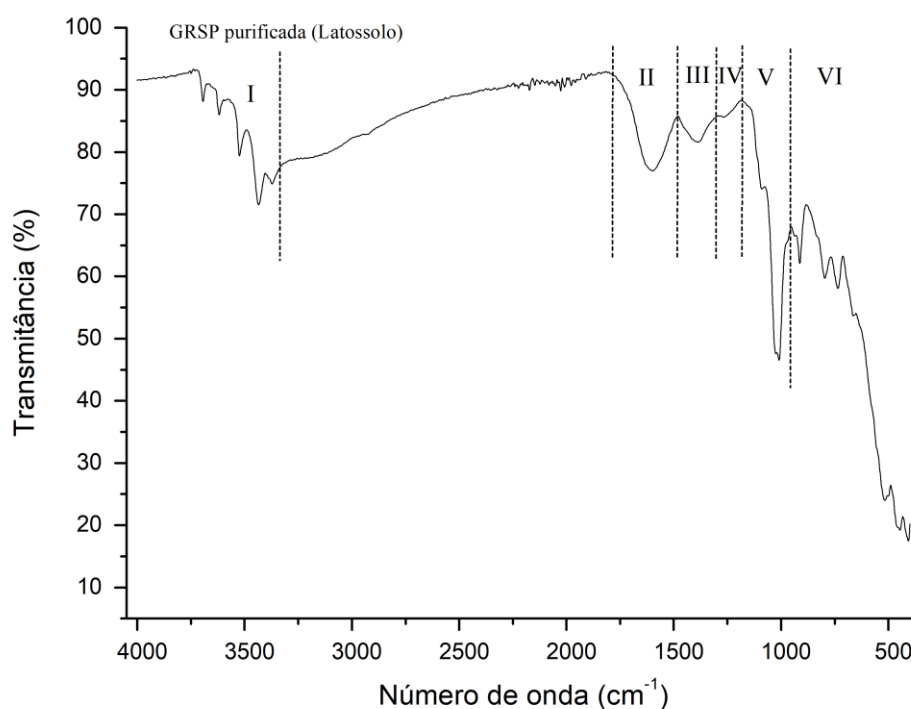
Our soils were mainly of different origin material, texture, organic matter content and pedo-landscapes, parameters that could contrast in the characterization of GRSP. However, our tested hypothesis was partially confirmed as characterization techniques demonstrated many similarities between the two GRSP used, but subtle physicochemical, microscopic and mineralogical differences.

#### **3.1 Functional groups – FTIR**

The GRSP of both soils, in general, contains C, H, N, O and other elements. GRSP LV (Fig. 1) contains dominant functional groups CH, NH<sub>2</sub>, OH, COOH (carboxyl), CO-NH (amide), C=O (carbonyl) and oxides and hydroxides of Fe and Al, identified by the infrared spectrum of the material. There are six characteristic regions that appear at I) 3524 to 3332 cm<sup>-1</sup>, II) 1785 to 1484 cm<sup>-1</sup>, III) 1484 to 1295 cm<sup>-1</sup>, IV) 1295 to 1182 cm<sup>-1</sup>, V) 1182 to 952 cm<sup>-1</sup> and VI) < 952

$\text{cm}^{-1}$ . The respective functional groups were: I) stretching of  $\text{NH}_2$  and  $\text{CO-NH}$ , free  $\text{O-H}$ ,  $\text{N-H}$  and  $-\text{CH}_2$ ; II) aliphatic and aromatic  $\text{C-H}$ ; III) aliphatic  $\text{C-H}$ ,  $\text{C-O}$ ,  $\text{O-H}$  and  $\text{COOH}$ ; IV)  $\text{C-N}$  of amides; V)  $\text{Al-OH}$ ,  $\text{C-O}$  stretching,  $\text{Si-O}$  stretching; VI)  $\text{O-Si-O}$ ,  $\text{FeOOH}$ ;  $\text{O-H}$  stretching of hydroxyl groups linked to  $\text{Fe}$  and  $\text{Al}$  oxides ( $\text{Fe}$  or  $\text{Al-OOH}$ );  $\text{O-H}$  stretching in clay minerals; stretching and  $\text{Fe-O}$  vibrations, and carbonates. More details can be seen in Fig. 1.

Figure 1. FTIR spectra of natural GRSP from a Dystroferric Red Oxisol.

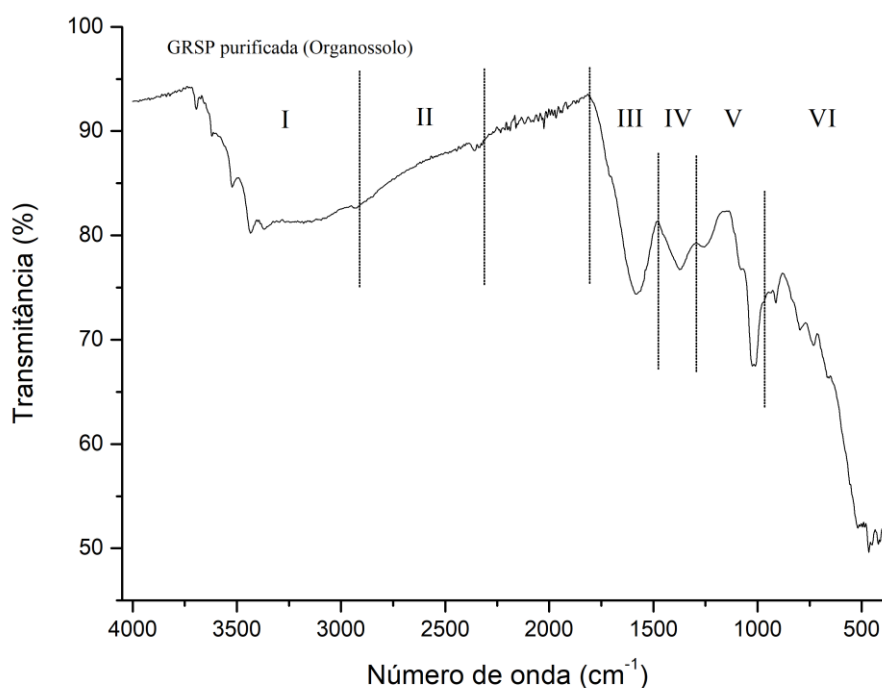


The FTIR spectrum of GRSP Org (Fig. 2) consists of regions with very broad bands and notable differences between GRSP LV. Six characteristic regions were also identified that appear at  $3692$  to  $2914 \text{ cm}^{-1}$ ;  $2913$  to  $2310 \text{ cm}^{-1}$ ;  $2309$  to  $1475 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1474$  to  $1293 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1292$  to  $963 \text{ cm}^{-1}$ ;  $< 963 \text{ cm}^{-1}$ , with the respective functional groups: I)  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  stretching with H bonds,  $\text{COOH}$ , phenols, alcohols, clay minerals and oxides, aromatic  $\text{CH}$  stretching (Zhang et al., 2017; Wang et al., 2017; Yuan et al., 2022) and  $-\text{CH}_2$ ; II)  $-\text{CH}_2$ ,  $\text{C=O}$ , aliphatic and aromatic  $-\text{CH}$ ; III)  $-\text{C=O}$  (amide) and  $-\text{CH}$  or  $-\text{CH}_2$  groups; IV) aliphatic  $-\text{CH}$  or  $-\text{CH}_2$ ; V)  $\text{C-O}$  stretching,  $-\text{CN}$  groups (amide); VI)  $\text{O-Si-O}$ ,  $\text{C-O}$ ,  $\text{C-N}$  of amides,  $\text{C-O}$  and  $\text{O-H}$  stretching in clay minerals,  $\text{FeOOH}$ ,  $\text{O-H}$  stretching of hydroxyl groups linked to  $\text{Fe}$  and  $\text{Al}$  oxides ( $\text{Fe}$  or  $\text{Al-OOH}$ ) and carbonates. This spectrum is similar to other GRSP spectra around the world

(Schindler et al., 2007; De Souza, 2016; Zhang et al., 2017; Wang et al., 2020; Yuan et al., 2022; Zhou et al., 2022).

GRSP LV showed less intense infrared bands in regions III and IV and narrower and more intense in I, II, V and VI, while GRSP Org showed lower absorbance in IR, wider band in I and narrower and more intense in regions III, V and VI. The broad O-H band in region I is characteristic of carboxylic acid (-COOH) (Smith, 1999; Schindler et al., 2007) and is very evident in GRSP Org.

Figura 2. FTIR spectra of natural GRSP from Haplic Histosol.



The functional groups of natural GRSP from the respective soils were associated with four molecular categories, including polysaccharides, hydrocarbons, proteins, nucleic acids, which corroborates Wang et al., (2020), and emphasizes that GRSP is a complex of several molecules (MacCarthy & Rice, 1985; Schmitt & Flemming, 1998; Schindler et al., 2007; Yin et al., 2015; Wang et al., 2020). To only be considered as a glycoprotein, there should be a significant amount of glycan residues (Schindler et al., 2007). However, the  $^{13}\text{C}$  DPMAS NMR technique has already demonstrated little amount of carbohydrate carbon (Schindler et al., 2007), and the amount of carbon in GRSP can vary from 35 to 60% (Agnihotri et al., 2022). Even so, it may indicate a structural pattern of GRSP in soils. The hydrogen-bonded OH band is common to the

spectra of the mentioned authors and in this work, as well as in region VI in which functional groups associated with clay minerals and Fe/Al oxides were identified, appear in some studies (Wang et al., 2021; Yuan et al., 2022).

The difference in environmental processes occurring in the two selected soils reflects some effects on the type of GRSP functional groups. The broad band in the range between 3500 and 3000  $\text{cm}^{-1}$  of GRSP Org is not identified in GRSP LV, and this is due to the greater presence of carboxylic acids with O-H bonded to hydrogen, as a result of the higher organic matter content of the Histosol and the compounds organic substances present in the material. The surface layer (0-10 cm) of the Histosol contained some reddish/orange spots, which demonstrates the presence of iron oxides and this fact is observed in the FTIR spectrum with a marked presence of these in the region 4000 – 3000 and  $< 1000 \text{ cm}^{-1}$  in both GRSP. Thus, these results implied highlighting the complex pedoenvironmental processes for the Oxisol and Histosol area, affecting the GRSP composition (Schindler et al., 2007; Zhang et al., 2015; Zhou et al., 2022). Soils with higher iron content are associated with gabbro, while floodplain soils receive sediments from high points in the landscape that mix with organic materials at different stages of decomposition (Curi et al., 2017).

Another point is the drainage of floodplain soils, which goes through different stages in relation to mineral soils rich in iron, so that at times of the year the Histosols are flooded, promoting other physical-chemical-biological processes that oxidic Oxisols do not undergo. Meanwhile, the weathering process of an oxidic soil is much more intense than in floodplain soils, and this implies a massive presence of Fe/Al oxides, kaolinite, higher clay content and less organic matter in Oxisols (Resende et al., 2014; Curi et al., 2017). These facts affect, in part, the type of GRSP functional groups and the peak intensity of these functional groups.

Vegetation cover and the presence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi also affect functional groups (Bu et al., 2010; Li et al., 2013; De Souza, 2016; Zhong et al., 2016; Wang et al., 2017). Forest soils exhibit different GRSP production dynamics than arable soils (corn, for example), while they also differ in the materials returned to the soil, reflecting the functional groups present in the soil and in GRSP (Wang et al., 2017). The association with AMF, organic matter content and other soil factors contribute to the differences and similarities between functional groups in opposing vegetation covers and soil management. AMF produce enzymes capable of degrading soil organic materials, and Wang et al. (2014) studied the differences in



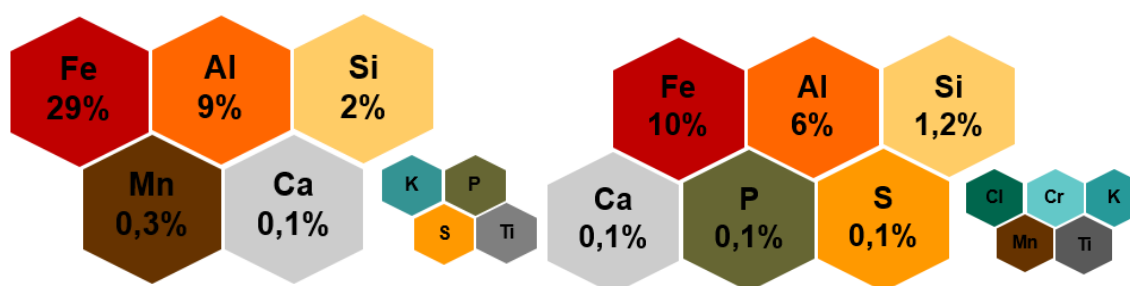
enzymes produced by soil fungi and their influence on functional groups, pointing out that soil fungi with lower enzymatic activities induced less reduction in the type and quantity of functional groups compared to fungi with higher enzymatic activities. This fact plays key roles in the decomposition of organic residues and the variation of peaks and regions in the FTIR spectrum.

The abundant functional groups in GRSP from this study (O-H, -CH, NH<sub>2</sub>, OH, C=O, COOH, CO-NH, and C-N) are similar to other studies (Wang et al., 2014; De Souza, 2016; Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2022; Yuan et al., 2022). Our study is in agreement with the old and recent studies that reported several molecules in the composition of GRSP (Gillespie et al., 2011). Yin et al. (2015) associated the peaks at 4000 – 3000 cm<sup>-1</sup> with hydrocarbons, at 1800 – 1200 cm<sup>-1</sup> with proteins, at 1200 – 1000 cm<sup>-1</sup> with polysaccharides and 1000 – 800 cm<sup>-1</sup> with nucleic acids. We also added to the peaks < 1000 cm<sup>-1</sup> the marked presence of silicate clay minerals and Fe/Al oxides, very present in the soils selected in this study. The surface functional groups reported here are ionizable and contribute to the interaction with cationic metals (Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), functioning as adsorption sites and contributing to the sequestration of these ions in soils and waters.

### 3.2 Element contents – pXRF

This is the first report of characterization of GRSP from tropical soils by X-ray fluorescence. pXRF analyzes included 11 elements detected in both GRSP (Fig. 3). Elements such as Ca, K and P were detected in low concentrations in the evaluated layer of 0-10 cm, this may be an indication of weathering of minerals carrying the element, leaching in the soil profile or fixation in the clay fraction of the soil, respectively.

Figure 3. Element contents (%) in natural Oxisol and Histosol GRSP, respectively, by XRF



It is important to highlight that pXRF analysis does not detect elements such as C, H, O and N (Weindorf et al., 2014) and in the chemical composition of GRSP these are key elements. However, elements important for soil fertility and/or soil genesis such as Al, Ca, Cr, K, P, S, Cl, Fe, Mn, Si, and Ti are possible to detect. These findings demonstrate the complexity and range of elements in GRSP, a fact that corroborates several results (Schindler et al., 2007; Aguilera et al., 2011; Gillespie et al., 2011; Gil-Cardesa et al., 2014; Meier et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2017). Our study reveals the first report of the presence of Ti in GRSP.

Phosphorus, calcium and sulfur, important elements in plant nutrition, were detected at low levels in the GRSP samples from the evaluated layer. The pXRF detection limit for these elements ( $P = 50 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $Ca = 25 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $S = 50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and the content of each one in native vegetation in tropical soils makes it common to low detection or non-detection of these elements (Ribeiro et al., 2010; Silva et al., 2018). The aggravating factor for GRSP not exhibiting significant P content in GRSP is due to the presence of gibbsite, hematite and goethite (Curi, 1983, Gualberto et al., 1987; Ker, 1995; Resende et al., 2014) detected by ray diffraction X, in addition to P species in the soil that are negatively charged, which does not promote its retention in the negative charges of GRSP. The fraction that is capable of being detectable in GRSP in the pXRF analysis is that retained by Fe/Al oxides, that is, the presence of P is highly related to the clay mineralogy and the content found in the soils.

Regarding Ca, pXRF analysis in weathered soils can detect the majority of Ca being available (Benedet et al., 2021), i.e., 0.1% of Ca in GRSP is in available form. As for Al and K, pXRF analysis cannot discern the available content from the content of silicate minerals, which makes the result the sum of these two fractions (Silva et al., 2018; Andrade et al., 2020; Mancini et al., 2021). Fe, Al, Si, Mn and Ca were the elements found in highest concentrations in GRSP LV, while, for GRSP Org, the highest levels found were Fe, Al, Si, Ca, P and S. Other elements such as Cl, Cr, K, and Ti had their lowest contents in each GRSP. Iron was an element with a relevant presence in the GRSP samples. This is due to the characteristics of the two soils that had low Fe content ( $58.63 \text{ mg kg}^{-1}$  – LVdf and  $41.20 \text{ mg kg}^{-1}$  – OX), the source material of both, the colluvial sediments in OX, the Fe oxides composing the clay fraction of LVdf and the position in the landscape of each soil, which reflect the stability of Fe oxides (Kämpf et al., 2012), indicating their dominant occurrence in GRSP of tropical soils. Due to its greater

stability in soils, Fe is used in soil genesis studies (Curi and Franzmeier, 1987; Carvalho Filho et al., 2015).

The presence of titanium and chlorine in both GRSP is due to the fact that they resist weathering/ authigenesis (Ti oxides: rutile and ilmenite, for example), inherited from the source material, presence of residues in the sand and silt fraction, weathered by acids organic compounds or deposition in the A horizon by organic compounds (Melo & Alleoni, 2009). Al and Fe are marker elements of weathering in soils (Mancini et al., 2019). The greater abundance of gibbsite in the two GRSP is due to the weathering of the dystroferric Red Oxisol and colluvial sediments in the Histosol. In general, Fe oxides are more abundant than Al oxides in GRSP and soils. One of the implications of this fact is that the zero charge point (ZPC) of a material is increased by the presence of Fe/Al oxides due to the ZPC of hematite or goethite and gibbsite. Furthermore, the charge exchange capacity (CEC) and anion exchange capacity (AEC) of gibbsite for oxidic Oxisols are estimated at approximately 10 and 30 mmolc kg<sup>-1</sup>, respectively (Raij & Peech, 1972), which appears to promote an increase in the ZPC of GRSP extracted from oxidic Oxisols.

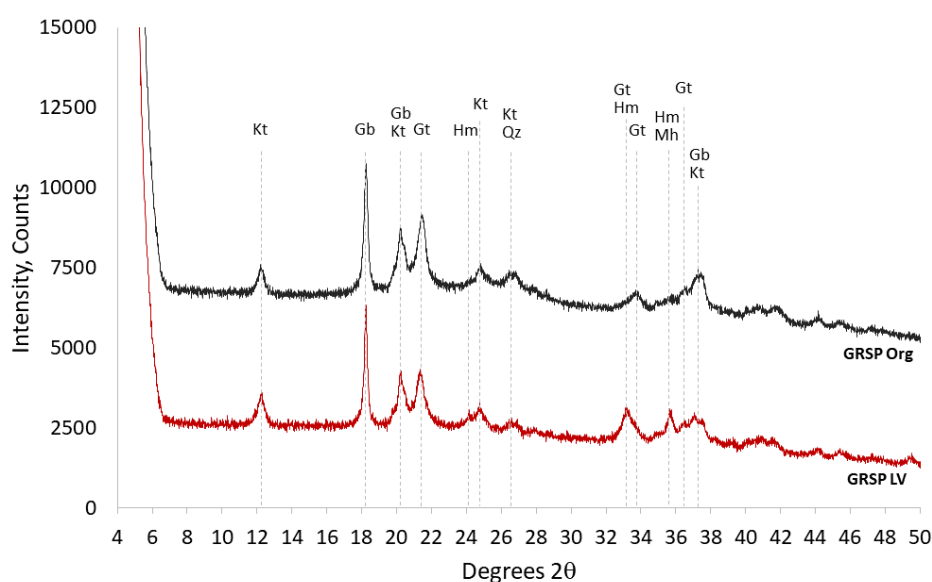
The detection of Si in both GRSP is due to the presence of quartz (SiO<sub>2</sub>) in the soil, inherited from the source material as a primary mineral, in the clay fraction and the high strength of the Si-O-Si bond, previously confirmed by FTIR. In the characterization by XRD, the reflection of quartz was low in relation to other minerals. Si contents are relatively low, even in Oxisols, due to the accumulation of Si in the sand fraction and lower content in the coarse (2-0.2 µm) and fine (< 0.2 µm) clay fractions, combined with the weathering of minerals less resistant silicates (Schaetzl and Anderson, 2005; Melo & Alleoni, 2009; Silva et al., 2018).

On this way, pXRF can also contribute to studies related to the characterization of soil proteins related to glomalin using elemental contents. Elements such as Fe, Al and Si can be considered tracers (fingerprints) of source materials for GRSP of tropical soils, due to their contents that corroborate with gabbro (higher iron content, mafic minerals), granite-gneiss (higher iron content, silica, felsic minerals) (Mancini et al., 2019), as they are closely linked to soil mineralogy. The marked presence of these elements can help identify the origin of GRSP composition in soils. Another important fact is that cationic elements present in GRSP can indirectly relate to the sorption capacity of anionic elements or substances.

### 3.3 Mineralogical composition – XRD

This is the first report of the use of X-ray diffraction to characterize and elucidate the mineral characteristics of GRSP in tropical soils. The diffractogram of the two GRSP (Fig. 4) showed that there is a predominance of gibbsite ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) and goethite ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ), associated with smaller amounts of kaolinite, hematite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) and maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Kaolinite reflections in GRSP LV were generally higher. However, when kaolinite was associated with gibbsite in GRSP Org, the reflection was of greater intensity. The mineralogical composition of both powdered GRSP showed remarkable mineralogical similarity between LV and Org GRSP, formed from different source materials.

Figure 4. X-ray diffraction pattern of samples from natural GRSP from the 0-10 cm layer of Oxisol and Histosol. Gt: goethite; Hm: hematite; Kt: kaolinite; Gb: gibbsite; Mh: maghemite; Qz: quartz.



There was reflection of Mh associated with Hm in GRSP LV, greater intensity of reflection of Gb associated with Kt in GRSP Org and reflections of Gb. Mh appears in GRSP Org due to reduced drainage during some periods of the year, which promotes a reduction in Fe in the structure of the minerals in which it is present (Curi et al., 2017), and XRD is widely used to quantify Mh in soils (Curi & Franzmeier, 1987; Poggere et al., 2018; Zhou et al., 2018). The higher Mh content can be explained by the higher  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  - hematite content correlation (Poggere

et al., 2018) and, according to these authors, the increase in Mh and Hm can be accompanied by a decrease in the goethite content and Mh accumulates in soils more weathered (Poggere et al., 2018). The low Mh content in GRSP Org (reflection at  $2\theta = 35.8^\circ$ ) may be due to detection being hampered by the overlap with Hm, which is normally in greater quantity in Fe oxide concentrates, a fact that can mask the main reflection of Mh (Poggere et al., 2018).

Gt is the predominant mineral in both GRSP. This fact corroborates Resende et al. (2011) that goethite is a mineral that exists in greater quantities than kaolinite in soil, for example. The main oxides present were Gb (high global peak of Gb at  $2\theta = 18.4^\circ$ ) and Gt ( $2\theta = 20.3^\circ$ ) in both GRSP, in addition to greater Gt reflection in GRSP Org and Hm associated with Gt in GRSP LV. It is common to find Gb in the clay fraction of soils and, as it is at the end of the Goldich weathering series, it indicates highly weathered soil (Rezende et al., 2022). Despite the formation of Gb ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) being favored in the virtual absence of silica in the soil solution, and kaolinite being formed at higher silica contents (Resende et al., 2014), Gb had a prominent presence in both GRSP. Kt present in GRSP may be a product of the recombination of Si in solution, which is released by the loss of tetrahedron sheets with Al-OH precipitates, a situation that favors the formation of Kt in the soil (Hus, 1989).

This fact highlights the variation in the water content of the two soils, with the Histosol having greater variation during the year, and the deposition of silicon-containing sediments in the pedo-landscape where this soil is located, favoring both the accumulation and loss of silica and allowing the formation of kaolinite and gibbsite, since chemical transformations (precipitation, leaching, dissolution kinetics and weathering) occur to maintain the balance of the system. The discovery of the marked presence of Fe oxides in GRSP associated with the carbonaceous nature and the property of binding organic molecules with the mineral fraction, highlights the ecological function of GRSP in the formation and stability of soil aggregates (Yuan et al., 2022). We hypothesize that the binding of GRSP with goethite, both being prominent aggregating agents, increases the stability in the aggregates due to the presence of amorphous material on the surface of the minerals where GRSP can bind. The quartz reflections are very similar for the two GRSP, and source material such as gabbro is made up of less quartz and a greater quantity of easily weatherable primary minerals - MPFI (Resende et al., 2014). However, the presence of decomposable minerals in these soils and in the respective GRSP does not mean that they provide nutrients in the long term and are classified as fertile. Qz is an indicator

mineral for sediment deposition (Gao & Schulze, 2010) and this highlights its presence in GRSP Org.

The different intensities of black and reddish color in the Histosol and Oxisol profiles are related to the levels of organic matter and biological activity, and hematite, favored by the higher organic carbon content in the Histosol (Loss et al., 2015; Soares et al., 2021) and higher Fe(III) content in solution in the Oxisol (Resende et al., 2021), combined with good drainage conditions (higher Fe(III) content and reducing conditions (Curi et al., 2016; Soares et al., 2021). It is important to highlight that the Histosol collection area receives colluvial and colluvial sediments from areas of Red Yellow Oxisol and Red Oxisol with coffee cultivation (Curi et al., 2017), influencing, in turn, the mineralogical composition, mainly due to the presence of oxides and hydroxides. The proportions of hematite and goethite differ due to the iron-rich nature of the gabbro and the gneisses that are rich in silicon (and which have a lower iron content). Furthermore, these variations are influenced by weathering processes and humidity regimes specific to each location, including water percolation, which mainly governs the intensity of hydrolysis (Resende et al., 2014).

The properties of the GRSP samples, the crystal layer spacing and the average crystal diameter were determined (Table 1). The DMC (110) of Gt found in this study was approximately 180 Å for both materials, and falls within the range relative to Gt formed in tropical soils proposed by Dick (1986), Kämpf et al. (1988) and Ker, (1995). Zhong et al. (2017) characterized glomalin-related soil protein from Chinese agricultural soils by XRD, and found variations in grain sizes (in Å, 113 to 180) and subtle variations in  $2\theta$  diffraction (in °, 19.74 to 19.9). Yuan et al. (2022) found a characteristic peak for total GRSP at  $2\theta = 19.8^\circ$  and a grain size of 129 nm.

XRD results combined with other characterization techniques showed that the composition of GRSP was quite similar to adjacent agricultural lands and forests in the area (Wang et al., 2014; Zhong et al., 2017). In our study, the DMC of kaolinite and goethite were close, while that of gibbsite and hematite showed a greater difference. GRSP Org presented a DMC of Kt 1.17 times greater, while GRSP LV presented a DMC of Gb 1.2 times greater than the Gb of GRSP Org. According to Dick (1986), kaolinites formed in Brazilian soils have shown a DMA close to 20 nm, and our study is consistent with this generalization. The spacing between layers (d) presented very close values in the two GRSP.

Table 1. Mineralogical and crystalline properties of GRSP LV and GRSP Org.

Mineralogical property		GRSP	
		LV	Org
Kt/(Kt+Gb)		0,287	0,212
Hm/(Hm+Gt)		0,246	0,085
d (nm)	Kt	0,714	0,723
	Gb	0,483	0,486
	Gt	0,413	0,414
	Hm	0,251	0,251
MCD (nm)	Kt	18,43	21,61
	Gb	40,34	33,01
	Gt	18,35	17,93
	Hm	30,31	nd

Kt = kaolinite; Gb = gibbsite; Gt = goethite; Hm = hematite; d (Å) = interlayer spacing of the crystal in the considered plane; MCD (Å) = average crystalline diameter in the considered plane; nd = not defined.

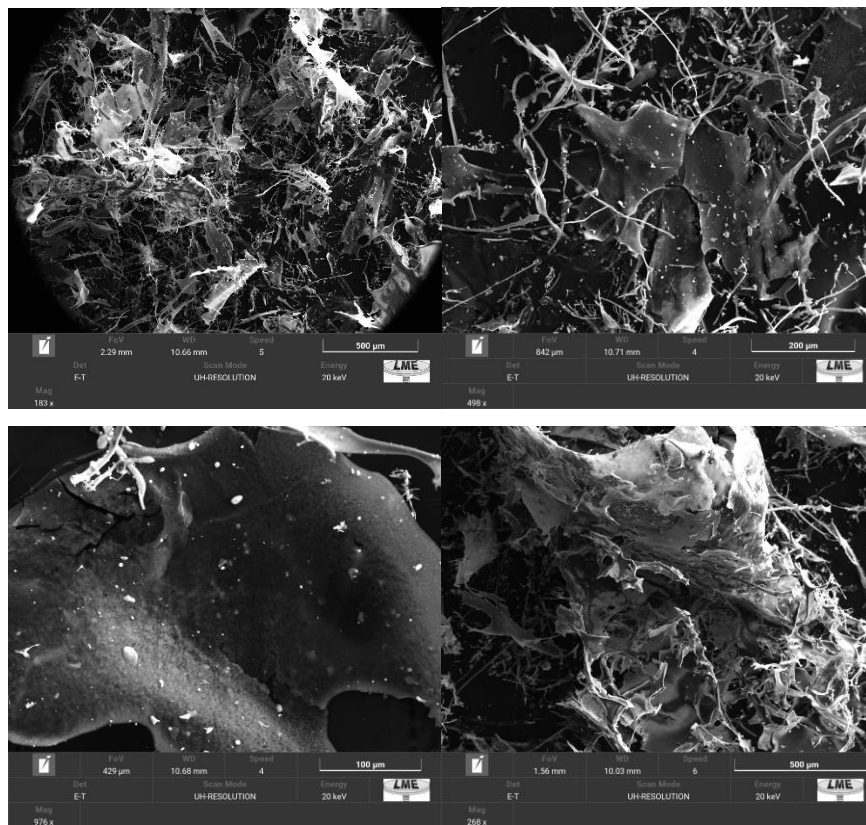
GRSP characterization work by XRD in countries with a temperate climate shows a predominance of 2:1 clay minerals and quartz (Wang et al., 2017; Zhong et al., 2017). The presence of montmorillonite, illite, illite and mixed layer of montmorillonite, plagioclase (Zhong et al., 2016), smectite-vermiculite, quartz, cristobalite, quartz+illite, feldspar, calcite and huntite (Wang et al., 2017) is common in GRSP from temperate climates, whereas when characterizing GRSP from weathered soils, as in our study, Fe/Al oxides, kaolinite, quartz and some presence of clay mineral 2:1 prevail, depending on the source material. Yuan et al. (2022) also found Fe/Al oxides by XRD in GRSP from Chinese soils. Therefore, XRD is suitable for characterizing GRSP and, added to FTIR and XRF, allows us to understand that Fe, Al and Si are present in the lyophilized material after extraction using sodium citrate buffer.

Therefore, the presence of kaolinite (clay mineral, 1:1), hematite and goethite (Fe oxides, 1:1), and gibbsite (Al oxide, 0:1) in GRSP of tropical soils is intrinsic, natural for it to occur, mainly due to the characteristics of pH, content and quality of organic matter, mycorrhizal activity and diversity, and the dynamic chemical transformations that occur in the soil.

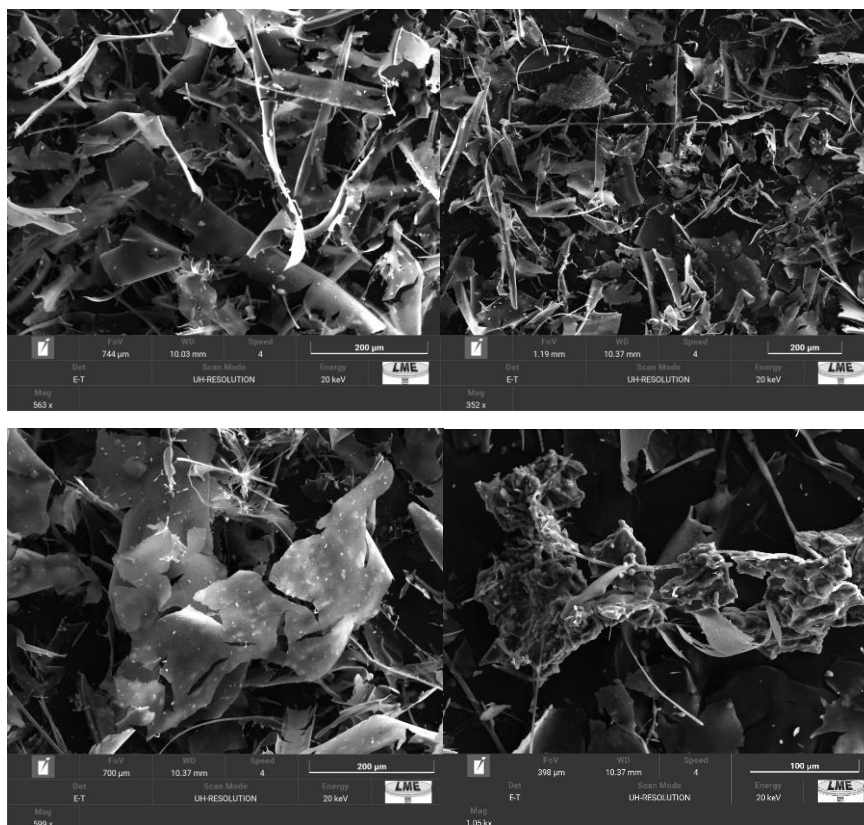
### 3.4 Surface morphology and elements – SEM

Images obtained by scanning electron microscopy of two types of GRSP are presented in Fig. 5 to analyze the surface morphology responses. After purification and freeze-drying, GRSP from the two soils was a fluffy, light-weight flocculent solid, with an amorphous appearance and a color typical of the soil from which it was extracted (reddish for GRSP LV and black for GRSP Org).

Figure 5. Images of natural GRSP from Oxisol and Histosol by SEM.







It is noted that there are differences in the surface morphology of the two GRSP. In both GRSP there was a high quantity of large flakes with fine and elongated structures. The appearance observed in GRSP LV is similar to materials that have a scaly, irregular and flat surface texture. There are some thin, irregular and long materials, which makes the appearance similar to GRSP Org. It also has an appearance with smaller and relatively smooth surfaces, but the majority is represented by thin and irregular materials, as evidenced in the micrograph with magnification of  $\geq 350$  times. In the case of GRSP LV, the  $>970\times$  micrograph shows an amorphous scaly block-like structure, similar to the results of Tian et al. (2021) and Yuan et al. (2022). In the micrograph  $> 1000$  times, it was possible to identify a structure with a scaly, irregular and porous texture. According to Tian et al. (2021), the adsorption mechanism and ability to sequester metals in mangroves is associated with differences in GRSP surface morphology, which is interesting to reduce the ecological risk of these areas. In our study, we can hypothesize that the surface morphology found for the two GRSP may contribute to the mechanisms of Cd adsorption through surface complexation.

### 3.5 Thermostability – TGA

These are the first reports of TGA for GRSP in Brazilian soils. Thermogravimetric analysis was used to investigate the thermal stability of the GRSP of the two soils (Figs. 6 and 7). We observed three regions where GRSP degradation was most intense. In the first region (20 to ~100 °C), there was a loss of mass, due to the elimination of bound and physically adsorbed water from the material, which are related to the carboxyl groups present in polysaccharides (Wang et al., 2021). Up to 150 °C, mass loss reached 5.7% and 11%, in GRSP LV and GRSP Org, respectively, representing the beginning of losses of rapidly decomposed materials. In the second region, > 150 and 500 °C, a degradation and depolymerization process occurred, reaching a mass loss of 36% of GRSP LV and 55.8% of GRSP Org. According to Wang et al. (2021), the loss of mass in the region between 200 to ~500 °C is related to the pyrolysis of thermostable structures formed by bonds of alkyl chains and amino acids in the protein.

Figure 6. TGA and DTG curve of natural GRSP from Dystroferric Red Oxisol.

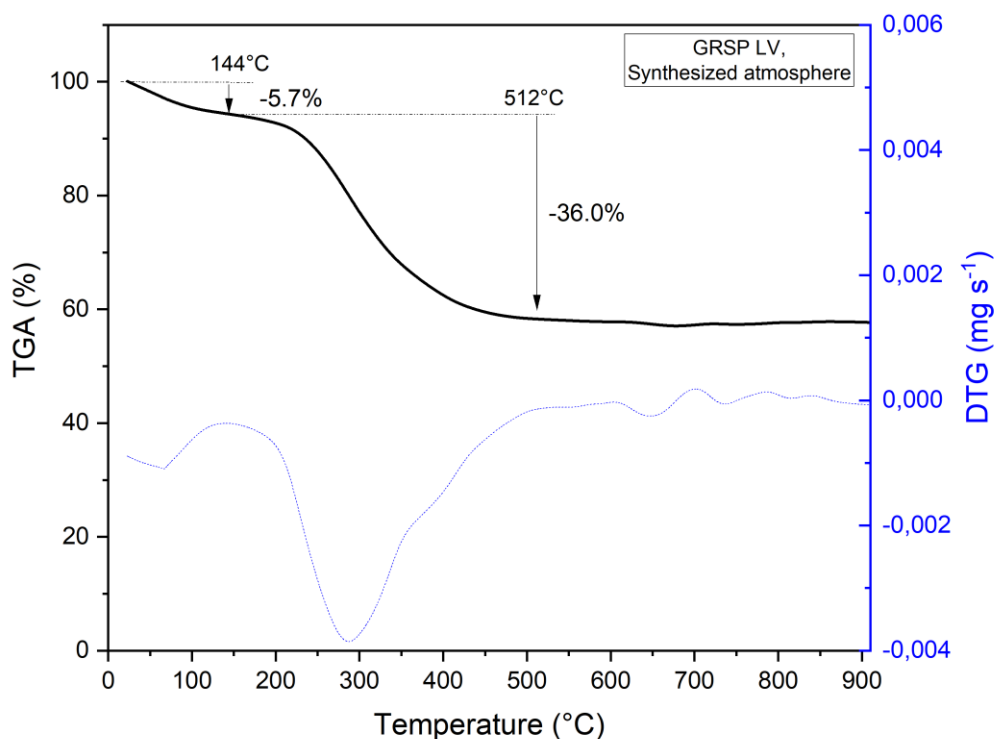
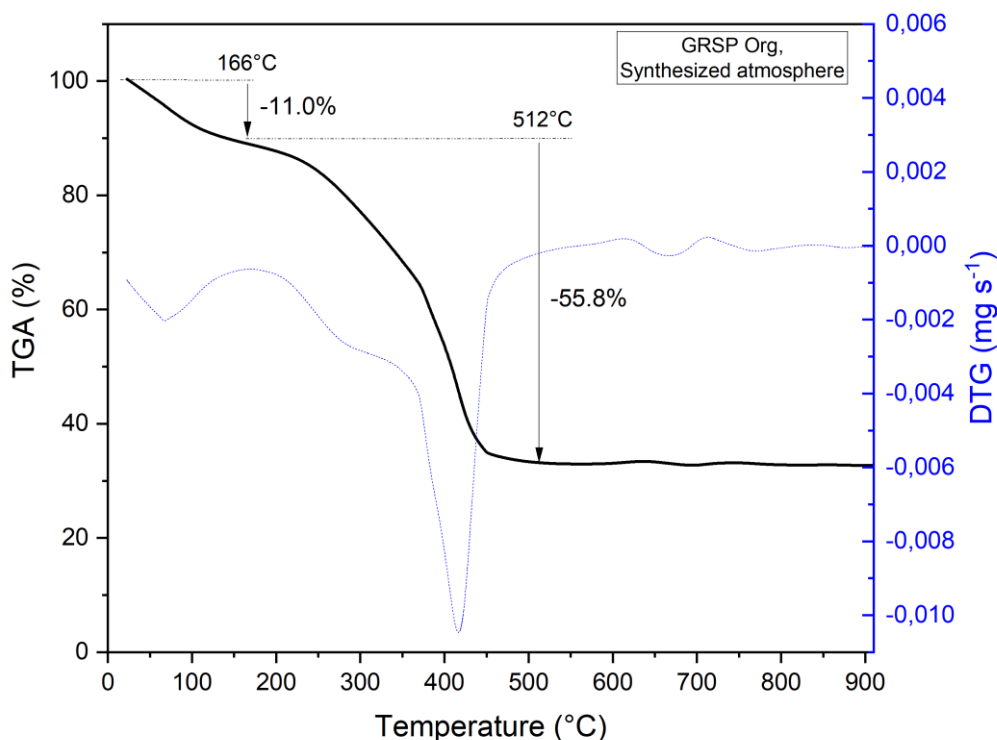


Figure 7. TGA and DTG curve of natural GRSP from Haplic Histosol.



The last phase corresponds to 500-1000 °C, demonstrate that GRSP is degraded and this fact is attributed to the decomposition of the aromatic structure (Wang et al., 2021). At 1000 °C, the solid residual (ash) of GRSP LV was 58.3%, and for GRSP Org, it was 33.2%. Parikh & Madamwar (2006) state that high levels of solid residues of other organic materials (such as extracellular polysaccharides from cyanobacteria), even after 800 °C in laboratory conditions, are due to the complexity of the physicochemical composition and the presence of mono and divalent cations (e.g., Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) that act as a bridge between different charged sugar moieties. In materials that have a high content of inorganic substances such as clay minerals, the solid residual remains higher compared to materials that are mostly composed of organic substances (Wang et al., 2021).

This point is interesting, as Rillig (2001) already stated that GRSP is thermostable and can last in the soil for up to 42 years. Harner et al. (2004) evaluated the renewal of GRSP based on the age of the site and found that in floodplain soils GRSP was renewed after 35 years. In our study, it is evident that as the temperature increases, GRSP is degraded, but not completely. Forest fires, common in Brazil and, mainly, in Cerrado areas and/or Amazon Forest areas, can exceed these two temperatures. These results confirm our hypothesis that GRSP is degraded with its

elevation to the point that even at high temperatures it showed high thermal stability, which confirms its thermostable characteristic (Rillig, 2004). It is assumed that in environments with a high rate of recovery after the use fire, the concentration of GRSP may increase again due to the return of microbiological and biochemical processes in the soil, including the return of AMF colonization of plants that resprout in the area, decomposition of organic residues, the secretion of GRSP by AMF and deposition in the soil, and the increase in soil organic matter. When these processes occur again, the amounts of GRSP are increased in the soil.

### 3.6 $pH_{(ZPC)}$

In relation to  $\Delta pH$  (final pH – initial pH) as an estimate of the behavior of GRSP surface charges (Figures 8 and 9), it was possible to determine the  $pH_{ZPC}$  values. The  $pH_{ZPC}$  was 4.70 and 3.31 for GRSP LV and GRSP Org respectively, demonstrating values close to  $pH_{ZPC}$  which is explained by the surface chemical similarity confirmed by FTIR. The data were well fitted to the linear model, with  $R^2$  of 0.998 for GRSP LV and 0.989 for GRSP Org.

Figure 8. Zero charge point ( $\text{pH}_{\text{ZPC}}$ ) for natural GRSP from Dystroferric Red Oxisol.

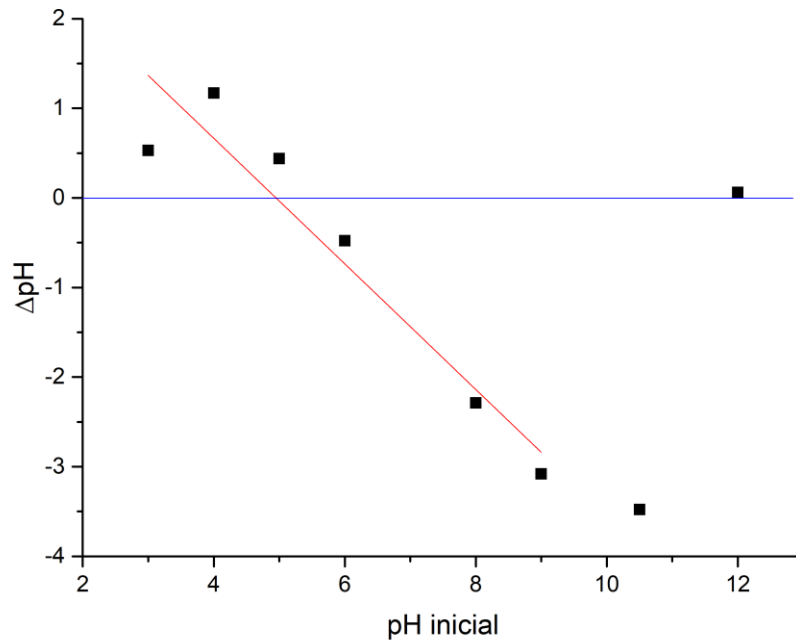
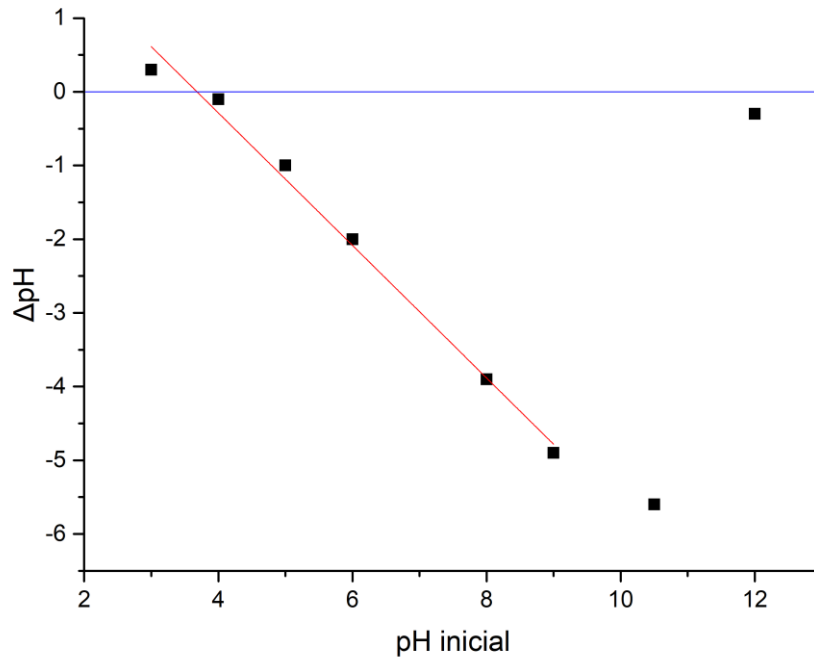


Figure 9. Zero charge point ( $\text{pH}_{\text{ZPC}}$ ) for natural GRSP from Haplic Histosol.



The pH values above the  $\text{pH}_{\text{ZPC}}$  determined for each GRSP demonstrate a behavior of negatively charged surface charges due to the presence of chemical groups with acidic ( $-\text{COO}^-$ ,

-SiOH), basic (-NH<sub>3</sub>, -FeOH, -AlOH) and amphoteric (amino acids), the deprotonation of carboxylic and phenolic groups that generate OH<sup>-</sup> groups and mineral exchange sites in the clay fraction (due to the increase in the pH of the solution, pH-dependent charges), and limitation of the cation adsorption capacity.

Oxides present in GRSP can develop negative charges when the solution pH > ZPC and positive charges when the pH value < ZPC. Due to pH < ZPC, GRSP becomes negatively charged and the cation exchange capacity predominates over the anion exchange capacity. According to Gupta & Sharma (2002), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with a ZPC of approximately 8.6 contributes to increasing the final ZPC of an adsorbent, in the case of this study GRSP. The lowest ZPC recorded for GRSP extracted from Histosol is related to its higher organic matter content (~15 dag kg<sup>-1</sup>), while the ZPC from typical Dystroferric Red Oxisol, a more weathered soil, is related to the higher content of Fe oxides of this order of soils, which greatly contributes to increasing the net positive surface charge and ZPC of GRSP.

These are the first reports on the evaluation of the pH<sub>ZPC</sub> of the soil protein related to glomalin in both subtropical and tropical and temperate soils. The results indicate that the surface charges of the two GRSP are fundamental to understanding the influence of soil physical and chemical phenomena such as dispersion and flocculation, aggregation and stability of aggregates, susceptibility to erosion, cation and anion exchange capacity and adsorption of substances inorganic and organic, as GRSP actively participates in physicochemical processes in soils, groundwater and aqueous solutions. These results show that GRSP consists of a range of elements and functional groups to provide adsorption sites and act in the immobilization of potentially toxic elements in environments.

#### **4. Conclusions**

This study characterized soil proteins related to glomalin from two soils with distinct properties and characteristics, a mineral soil and an organic soil. Our tested hypothesis was partially confirmed, as the physicochemical characteristics elucidated here by the characterization techniques and the pH<sub>ZPC</sub> of the two GRSP demonstrated notable similarities. The differences present are due to the richness in Fe/Al oxides and hydroxides and organic materials, helping to highlight the presence of hydrocarbons, polysaccharides, proteins and nucleic acids, and that these cause subtle changes in the infrared spectra, in X-ray diffraction and thermogravimetry.

GRSP from tropical soils is rich in Fe, Al and Si, confirmed by XRF. Therefore, GRSP from undisturbed pedosystems tend to contribute more stable organic materials, that is, with greater aromaticity, difficult to decompose and release nutrients. This fact contributes to the health and balance of the soil. The  $pH_{ZPC}$  of the two GRSP demonstrates the negative charges that this material has, they are pH-dependent charges with high potential to remove inorganic substances in different environmental matrices.

This information also supports the ecological functions of GRSP, for example, as a biofloculant and the ability to sequester potentially toxic elements. This study is the second in Brazil, and is the first using different characterization methods. With these insights, adsorption experiments can be tested in the laboratory with potentially toxic elements to understand the interaction between GRSP-EPT, the adsorption mechanisms involved and the parameters that modulate the adsorption capacity by GRSP.

## References

- ANDRADE, R. et al. 2020. Prediction of soil fertility via portable X-ray fluorescence (pXRF) spectrometry and soil texture in the Brazilian Coastal Plains. *Geoderma*, 357, 113960.
- BENEDET, L. 2021. Rapid soil fertility prediction using X-ray fluorescence data and machine learning algorithms. *Catena*, 197, 105003.
- BROWN, G; BRINDLEY, G. W. 1980. X-ray diffraction procedures for clay mineral identification. In: BRINDLEY, GW; BROWN, G. *Crystal structures of clays minerals and their X-ray identification*. London, England: Mineralogical Society, p. 305-360.
- CARVALHO-FILHO, A. et al. 2015. Iron oxides in soils of different lithological origins in Ferriferous Quadrilateral (Minas Gerais, Brazil) *Appl. Clay Sci.*, 118, pp. 1-7.
- CURI, N.; FRANZMEIER, D. P. 1987. Effect of parent rocks on chemical and mineralogical properties of some Oxisols in Brazil *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51, pp. 153-158.
- CURI, N. et al. 2017. Mapeamento de solos e magnetismo no campus da UFLA como traçadores ambientais. Lavras : Ed. UFLA. 147 p.
- GAO, X.; SCHULZE, D. G. 2010. Chemical and mineralogical characterization of arsenic, lead, chromium, and cadmium in a metal-contaminated Histosol. *Geoderma*, 156 (3-4), p. 278-286.
- GERARD, F. 2016. Clay minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils - a myth revisited. *Geoderma*, 262, pp. 213-226.
- HUS, P. H. 1989. Aluminium oxides and oxyhydroxides. In: DIXON, J.B. & WEED, S.B., eds. *Minerals in soil environments*. 2.ed. Madison, Soil Science Society of America, p. 331-378.
- KÄMPF, N.; MARQUES, J. J.; CURI, N. Mineralogia de solos brasileiros. In: KER, J. C. et al. 2012. *Pedologia - Fundamentos*, SBCS, Viçosa, pp. 81-146.



MANCINI, M. et al. 2019. Tracing tropical soil parent material analysis via portable X-ray fluorescence (pXRF) spectrometry in Brazilian Cerrado Geoderma, 337, pp. 718-728.

MANCINI, M. et al. 2021. Formation and variation of a 4.5 m deep Oxisol in southeastern Brazil. *Catena*, 206, 105492.

MANCINI, M. et al. 2022. Proximal sensor data fusion for Brazilian soil properties prediction: Exchangeable/available macronutrients, aluminum, and potential acidity. *Geoderma Regional*, 30, e00573.

POGGERE, G. C. et al. 2018. Maghemite quantification and magnetic signature of Brazilian soils with contrasting parent materials. *Applied Clay Science*, 161, pp. 385-394.

RAIJ, B. & PEECH, M. 1972. Electrochemical properties of some Oxisols and Alfisols of the tropics. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, 36:587-593.

RESENDE, M. et al. 2014. *Pedologia: base para distinção de ambientes*. Lavras : Editora UFLA, 6. ed. rev., amp. 378 p.

RESENDE et al. 2021. *Pedologia, Fertilidade, Água e Planta: Inter-relações e Aplicações* (second ed.), Editora UFLA, Lavras.

RIBEIRO, B. T. et al. 2010. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse *Sci. Agric.*, 67, pp. 441-447.

SCHAETZL, R.; ANDERSON, S. 2005. *Soils: Genesis and geomorphology*. Cambridge University Press, New York. 817 p.

SCHINDLER, F. V. et al. 2007. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), pp. 320-329.

SILVA, S. H. G. et al. 2018. Soil weathering analysis using a portable X-ray fluorescence (PXRF) spectrometer in an Inceptisol from the Brazilian Cerrado. *Applied Clay Science*, 162, pp. 27-37.

WANG, Q. et al. 2020. Interactions of soil metals with glomalin-related soil protein as soil pollution bioindicators in mangrove wetland ecosystems. *Science of The Total Environment*, 709, 136051.

ZHONG, Z.; WANG, W.; WANG, Q. 2016. Compositional variation of glomalin-related soil protein in different forest stands and farmland. *Journal of Beijing Forestry University*, 38(4):107-115.

**Artigo 2 - Cd(II) biosorption in glomalin-related protein from tropical soils in Brazil<sup>1</sup>**

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

<sup>1</sup>Artigo redigido conforme normas do periódico científico Environmental Technology & Innovation (ISSN: 2352-1864). Este artigo é uma versão preliminar e, portanto, poderão surgir alterações para adequá-lo. Os gráficos e tabelas foram inseridos no decorrer do texto para facilitar a leitura.

## Highlights

1. Foram estudadas GRSP de solos oxídico e orgânico.
2. A imobilização de Cd (II) pelas duas GRSP ocorreu intensamente.
3. As GRSP imobilizaram Cd (II) por atração eletrostática e complexação de superfície.
4. A capacidade de adsorção por GRSP de Cd (II) afeta seu destino ambiental.

## Abstract

Cadmium (Cd) is listed among the most dangerous substances for organisms. Its chemical properties of availability in the acid and alkaline environment, persistence, at low concentrations it is already considered toxic makes it one of the most studied potentially toxic elements (EPTs) in the world. Many researches are developed using physical, chemical and biological methods for the removal and decontamination of different matrices. However, a solution derived from soils and arbuscular mycorrhizal fungi has emerged with great potential. Soil glomalin-related protein (GRSP) has physicochemical properties for immobilization/removal of Cd (II) from aqueous solutions. Therefore, the objective of this work was to carry out studies of pH, contact time and adsorption isotherms to understand the GRSP-Cd interaction and explain the contribution of GRSP to immobilize Cd in aqueous solutions. Results revealed that, in general, there were no drastic differences in Cd (II) removal (pH 7.0 and 24h contact time: 97% removal). The isothermal data indicated that the adsorption capacity of Cd (II) followed the Sips isothermal model. The adsorption mechanisms by GRSP were electrostatic attraction and surface complexation, supported by the HSAB theory. Our results reveal a high capacity for Cd (II) immobilization by GRSP and this can be used as an effective adsorbent in water, which is relevant in the decontamination of areas contaminated/polluted by this element.

Keywords: Cadmium, Aqueous solution, Sorption isotherm, Glomalin, Microbial adsorbent.

## 1. Introduction

Environmental contamination caused by toxic elements is a growing concern on a global scale, negatively affecting soils and bodies of water around the world. Among these dangerous substances, cadmium (Cd) stands out for its high toxicity and the ease with which it is transferred from soil to plants and other living organisms (Pendias & Szteke, 2015). Efficient immobilization and removal of Cd (and other toxic elements) has been a constant pursuit,

driving research into adsorption as an economical and effective strategy (Lin et al., 2023). Recently, interest has focused on the development of adsorbents from alternative sources, such as soil fungi, for the sequestration and immobilization of toxic elements (Wang et al., 2021; Lin et al., 2023). In this context, glomalin-related soil protein (GRSP), a microbial byproduct produced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), has been the subject of extensive study and considered a promising solution.

Ion adsorption is one of the most important phenomena for soil science because it is the main attribute that affects the concentration of most mineral elements in the soil solution, so that the concentration of a substance in a phase becomes greater at the interface than inside it (Alleoni; Melo; Rocha, 2019). In adsorption, there is the involvement of physical and chemical forces and the union between ions or molecules present in the soil solution with reactive (adsorption) sites on the external surface of the solid compounds (Ernani, 2016). The structural functional groups located on the external surfaces of organic and inorganic compounds, including electrical charges, are the adsorption sites of the soil solid phase. The main functional groups present in the organic fraction of the soil, according to Sparks (1995), are: carboxyl, phenolic hydroxyl, enol, alcoholic hydroxyl, amine, amide, aldehyde and ketone, very important both in the generation of negative electrical charges for chemistry and for the physical-chemical reactions of the soil.

In order to evaluate the removal potential of EPTs, adsorption tests are carried out using glomalin-related soil protein from different soils. GRSP has potential and adsorption properties for removing Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Pb, Zn and other metals, at different contact times, pH and concentrations. To specify the adsorption equilibrium and the relationship between the concentration of adsorbate in solution and the amount adsorbed per unit mass of adsorbent, isotherms are important tools (Foo & Hameed, 2010; Tran et al., 2017). They are mathematical models represented by simple equations. Among the most used adsorption isotherms in soil science, the Freundlich, Langmuir isotherms and other isotherms that are the combination or improvement of the aforementioned models stand out (Al-Ghouti & Da'ana, 2020).

Freundlich isotherm is widely used in characterizing soil adsorption capacity, as it takes into account the heterogeneity of adsorbent materials and their interaction with solutes in solution (Al-Ghouti & Da'ana, 2020). The Langmuir isotherm is useful for predicting the maximum adsorption concentration, that is, the amount of solute that can be adsorbed by a given adsorbent

(Foo & Hameed, 2010). Furthermore, the Langmuir isotherm assumes that the adsorption energy is constant and independent of surface coverage, which may limit its applicability in multilayer adsorption situations (Al-Ghouti & Da'ana, 2020). Finally, the Sips isotherm, which is an equation that combines the advantages of the Freundlich isotherm and the Langmuir isotherm (Foo & Hameed, 2010; Al-Ghouti & Da'ana, 2020). This isotherm is useful for describing adsorption in heterogeneous systems, in which the adsorption energy can vary along the surface of the adsorbent (Foo & Hameed, 2010).

Few studies have been carried out on the GRSP-Cd interaction and its immobilization and removal in aqueous solutions (in Brazil, this is the first), and studies exploring in detail the retention mechanisms using GRSP are relevant. Therefore, the objective of this work was to clarify the contribution of GRSP in the sequestration/immobilization of cadmium, through the adsorption kinetics and isotherm, and the mechanisms involved in this process. Our hypotheses were: i) GRSP is an adsorbent with high Cd biosorption capacity; ii) pH and contact time are the main parameters that modulate the adsorption process by GRSP; iii) surface complexation is the main mechanism of Cd adsorption by GRSP.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Study site, sampling and analysis*

The different GRSPs used in this study were obtained from soils on the university campus of the Federal University of Lavras (UFLA), in the city of Lavras (21°13'41.3" S 44°58'12.7" W and 21°13'49.0" S 44°57'43.0" W). These two pedosystems were chosen based on the soil classification by Curi et al. (2017), mainly due to the organic matter, iron and clay content. The source material is basically for the Dystroferric Red Oxisol (LVdf), a gabbro with a higher content of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and clay, and for the Haplic Histosol (OX), a mixture of colluvial and colluvial sediments from Oxisols under gabbro and granite-gneiss and with a predominance of organic materials (Curi et al., 2017). The LVdf vegetation consists of a preserved secondary forest with no history of land use and OX with the presence of preserved natural shrubs and grasses, which enhances the maintenance of the soil's original characteristics. Sampling was carried out by collecting soil from eight equidistant points from three different locations in the two areas, totaling 24 points, and subsequently mixing the simple samples, transforming them into a composite sample. The chemical analysis of the soils is described in Table 1.

Table 1. Physicochemical properties of soil samples collected (0-0.10 m) from two natural soils (Oxisol and Hystosol) in two pedosystems.

Properties	Soils	
	Oxisol	Histosol
pH <sub>H2O</sub>		
	Sand	18
	Silt	36
Texture (%)	Clay	19
		63
		41
CEC (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )		11.0
OM (%)		6.5
P-rem (mg L <sup>-1</sup> )		24.7
K (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )		0.2
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )		5.0
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )		0.6
P (mg dm <sup>-3</sup> )		3.5
Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )		0.2
H + Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )		5.3
B (mg dm <sup>-3</sup> )		0.1
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )		2.4
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )		58.6
S (mg dm <sup>-3</sup> )		8.1
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )		3.3
Cd (mg dm <sup>-3</sup> )		0.002
Total N (g kg <sup>-1</sup> )		3.3

pH in water soil:solution 1:2.5; Ca-Mg-Al- Extractant: KCl - 1 mol L<sup>-1</sup> ; OM; Organic matter oxidized by Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (4N) + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10N); H+Al; SMP extractor; B; hot water extractant; S; monocalcium phosphate extractor in acetic acid; P-K-Fe-Zn-Cu-Cd Extractant Mehlich-1; Total N; Kjeldahl method; P-rem; remaining phosphorus t: effective exchange cation capacity; V: base saturation index.

## 2.2 Extraction and purification of easily extractable glomalina related soil protein (EE-GRSP)

For the extraction of easily extractable glomalin-related soil protein (EE-GRSP) from the two soils, the protein extraction method with some modifications was used (Wright and Upadhyaya, 1996). Initially, the soil containing EE-GRSP is subjected to sodium citrate buffer (8 mL, 20 mM, pH = 7.2) and autoclaved at 121 °C for 30 minutes. The resulting supernatant was collected by centrifugation at 3200 rpm for 15 minutes. The EE-GRSP content ( $\text{mg g}^{-1}$ ) was quantified by spectrophotometer in the UV/Visible region, with Comassie Blue and Bradford reagent, 95% ethanol, 85% phosphoric acid, and bovine serum albumin (BSA) to construct the standard curve (Bradford, 1976; Wright & Upadhyaya, 1998).

Subsequently, the EE-GRSP present in the supernatant was precipitated by the slow addition of  $1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl until the pH reached 2.0. To ensure complete precipitation, the solution was kept in an ice bath for at least 24 hours. The precipitate obtained was then redissolved in 1.0 ml of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH and subjected to dialysis in deionized water for up to 48 hours or until the electrical conductivity of the solution was  $\leq 1.0 \mu\text{S cm}^{-1}$  (Mendonça & Matos, 2017). Dialysis water was changed every 12 hours and pH, electrical conductivity, and  $\text{Na}^+$  concentration were determined using a pH/conductivity meter and flame photometer and/or ICP-OES.

Finally, the purified EE-GRSP samples were previously frozen at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  in a deep freezer and, after freezing, they were sent to the freeze dryer (Liotop L101) where the temperature was kept stable at  $-45 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), with an initial pressure of around  $650 \mu\text{Hg}$  for the freeze-drying process. After 48 hours, the process was completed and a light weight material with a characteristic color was obtained in accordance with the soil from which it was extracted.

### *2.3 Freeze-drying, maceration and homogenization of EE-GRSP*

After freeze-drying, the material was placed in a closed container and placed in a desiccator to keep it dry. They were then macerated in a mortar with an agate pestle, sieved through a #0.250 mm mesh, homogenized and transferred to a closed container for further characterization.

### *2.4 Adsorption experiments*

Adsorption experiment was used to investigate the GRSP-Cd interaction through the adsorption/immobilization capacity of cadmium ions in aqueous solution. The study was carried out in triplicate and a stock solution of Cd (II) was prepared with 3.053 g of  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$  of Cd) dissolved in distilled water and subsequent dilution ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$  of Cd).



For the effect of pH and contact time, 50 ml centrifuge tubes were placed on a shaking table with a constant temperature oscillator for 24 h, agitation at 150 rpm, at 25 °C, 30 mg of adsorbent and initial volume of solution of 30 ml. To stabilize the pH and ionic strength, respectively, HNO<sub>3</sub> and NaOH solutions (0.01 mol L<sup>-1</sup>) and background electrolyte solution (20 ml of Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mmol L<sup>-1</sup>) were used. 5 ml of Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> spike solution (for pH and contact time, 1 mmol L<sup>-1</sup>) were added to increase the studied contaminant. The pH values studied were 4.0, 5.5 and 7.0, due to the availability of Cd verified in Visual Minteq 3.1, the possible interactions with the ions present in solution, the pH of Brazilian soils being in this range of values (Lopes & Guilherme, 2016) and the physicochemical transformations involved in the adsorption mechanisms. The contact times were, in minutes: 5; 10; 20; 40; 60; 120; 240; 480; 720; and, 1440 min.

For the isothermal experiment, the initial concentrations used were 0.06; 0.125; 0.25; 0.5; 1; two; and, 3 mmol L<sup>-1</sup> of Cd, in the form of Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. These concentrations were chosen based on initial laboratory studies, Brazilian legislation (Cetesb, 2021; Conama, 2009), previous studies with cadmium (Ribeiro et al., 2021) and glomalin (Lin et al., 2023; Yuan et al., 2022). The same conditions of adsorbent mass, initial volume of solution, temperature and agitation as performed in the kinetic experiment were maintained. The stirring time and pH were, respectively, 24 h and 7.0.

After experiments on the effect of pH, contact time and isotherms, the supernatant was subjected to a filtration system with a cellulose acetate filter membrane with an opening of 0.45µm (Yuan et al., 2022). Cd concentrations in each step were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), with a wavelength of 228 nm. Using equations 1 and 2, the removal efficiency (RE, %) and adsorption capacity (q<sub>e</sub>, mg g<sup>-1</sup>) were calculated, respectively.

$$RE (\%) = \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m} \quad (2),$$

where: C<sub>0</sub> is the initial concentration of Cd and C<sub>e</sub> is the final concentration in the extract (mg L<sup>-1</sup>); V is the volume of solution (mL); and, m is the mass of the adsorbent.

## 2.5 Isothermal models

The isothermal models for adjusting the equilibrium data used were from Langmuir, Freundlich and Sips, and the subsequent non-linear equations are presented below, according to Foo & Hameed (2010):

$$q_e = \frac{Q_o b C_e}{(1 + b C_e)} \quad (3)$$

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (4)$$

$$q_e = \frac{K_S C_e^{\beta_S}}{1 + a_S C_e^{\beta_S}} \quad (5),$$

where:  $q_e$ : amount of adsorbate in the adsorbent at equilibrium ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $K_L$ : Langmuir isothermal constant ( $\text{L mg}^{-1}$ );  $Q_o$ : maximum monolayer coverage capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $b$ : Langmuir isothermal constant ( $\text{dm}^3 \text{ mg}^{-1}$ );  $C_e$ : equilibrium concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $K_F$ : Freundlich isotherm constant ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ( $\text{dm}^3 \text{ g}^{-1}$ ); related to adsorption capacity;  $n$ : adsorption intensity;  $K_S$ : constant of the Sips isothermal model;  $\beta_S$ : exponent of the Sips isothermal model;  $a_S$ : constant of the Sips isothermal model ( $\text{L mg}^{-1}$ ).

Cd total in the aqueous solution samples was calculated after the adsorption process, individually for each sample, considering that the total adsorbed was the difference between the initial concentration and the final concentration of Cd in solution.

## 2.6 Statistical analysis

The data set from the batch adsorption experiment was processed and its isothermal models adjusted using the Origin 2023 software (OriginLab Corporation) expressed as ANOVA and, when necessary, Microsoft Excel 2013 using the 'Solver' function to compare model adjustments.

## 3. Results and discussion

### 3.1 pH effect

The two adsorbent materials (GRSP LV and GRSP Org) showed subtle differences in Cd immobilization in aqueous solutions at different pH (Fig. 1). Briefly, the removal efficiency

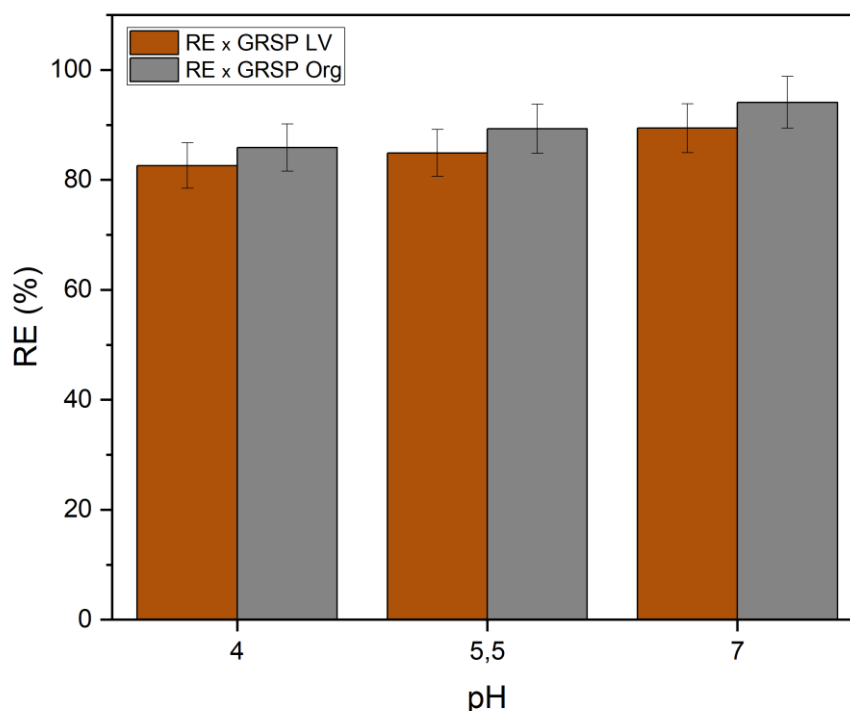
was higher with the pH increasing from 4.0 to 7.0, that is, at this pH value RE reaches its maximum in this experiment. GRSP Org was the adsorbent with the highest Cd adsorption capacity, with an average of 94% of the original immobilized Cd. With GRSP LV, the adsorbed Cd reached an average of 89%. This high Cd immobilization capacity by GRSP was recently reported in GRSP from Chinese soils (Lin et al., 2023) and the increasing trend with increasing pH is consistent with the results of these authors.

This fact can be explained by two reasons, which are the high number of adsorption sites (negative charges and hard bases) in the material which, despite originally having a strong influence of oxy(hydr)oxides, proved to be effective in immobilizing Cd, and, the formation of a chemical complex between Cd and a ligand (functional groups), in which the HSAB (Hard-Soft-Acid-Base) theory considers the  $\text{Cd}^{2+}$  ion to be a soft acid according to Sparks (1995) or borderline soft (Hamisu et al., 2020) in the Lewis classification. Hard acids have high electronegativity and small ionic radii, tending to form complexes with hard bases, while soft acids tend to associate with soft bases -  $\text{NO}_3^-$  (Sparks, 1995) and hard base Lewis functional groups from Pearson.

Another important point is the  $\text{pH}_{\text{ZPC}}$  of this material, which for GRSP LV is 4.70 and for GRSP Org is 3.31, indicating that at lower pH values GRSP LV has predominantly positive charges due to its higher  $\text{pH}_{\text{ZPC}}$ . Cationic metal species are affected by pH variation (Lin et al., 2021). At low pH, the functional groups that contain oxygen bind to  $\text{H}^+$  (Tian et al., 2021), that is, protonation occurs and prevent association with metal ions (electrostatic repulsion), and positive electrical charges predominate on the surface of the adsorbent (Singh et al., 2016; Penido et al., 2019), configuring an inner sphere surface complex. This mechanism promotes a bond capable of keeping the ions tightly bound and with low reversibility, an important fact for the non-recurrence of contamination/pollution of an environmental matrix. Cadmium has the property of not biodegrading in the environment (Deng et al., 2020; Iamsaard et al., 2022) and GRSP is a very recalcitrant fraction that allows it to remain in the soil for long years (Rillig, 2004), rich in organic compounds and negative charges, providing Cd adsorption for a long time. Furthermore, it has been found that GRSP easily extractable from soils with high Cd content has low decomposition in 140 days, meaning that the proportion of this fraction of GRSP is increased in the soil by secretion by AMF (Wu et al., 2014).

On the other hand, with increasing pH, deprotonation of the functional groups in GRSP occurs without signs of electrostatic repulsion between Cd and the adsorbent. Thus, the deprotonation of functional groups and alkaline pH favor the Cd adsorption process by GRSP (Lin et al., 2023) through mechanisms such as surface complexation and/or electrostatic attraction (Tang et al., 2021; Lin et al., 2023). For these reasons, contact time and isothermal studies were conducted at pH = 7.0.

**Figure. 1.** Effect of pH on the removal efficiency of Cd (II) (%) by GRSP from Dystroferic Red Oxisol and Histosol after 24 h of agitation. Fixed parameters: GRSP dose = 30 mg; initial concentration = 1 mmol L<sup>-1</sup> Cd (II).



### 3.2 Efeito do tempo de contato

Cd removal/immobilization process occurred quickly, reaching values close to the maximum removal capacity in a short period (see Fig. 2). The removal efficiency (RE) by GRSP increased in the first 40 minutes and reached its maximum point in 24 hours, with 97% Cd removal by GRSP Org ( $q_e = 3.2 \text{ mg g}^{-1}$ ) and 93.4% by GRSP LV ( $q_e = 7.5 \text{ mg g}^{-1}$ ). In other words, after 24 hours, the maximum amount of adsorbed Cd was 109 mg L<sup>-1</sup> for GRSP Org and 105 mg L<sup>-1</sup> for GRSP LV. also observed a rapid adsorption of metals such as lead (Pb) and zinc (Zn) by

GRSP, reaching maximum adsorption capacity in just 20 minutes. This suggests that the process is mainly controlled by chemical reactions, as demonstrated by Wu et al. (2019). This suggests that the rate of Cd adsorption is related to the availability of active sites, and the rate-limiting step may involve chemical processes, such as electron sharing or exchange, as mentioned by Penido et al. (2021) and Lin et al. (2023). Our results indicate rapid adsorption followed by a slower process until maximum capacity is reached within 24 hours. Therefore, we chose 24 h as the equilibrium point for our isothermal experiment.

In field experiments, Wu et al. (2014) found an increase in Cd and Pb immobilization ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) in EE-GRSP and T-GRSP as the concentrations in the treatments increased. Lin et al. (2023) also found greater immobilization of Cd when its concentrations were increased in the aqueous solution, and found that Cd is quickly adsorbed in the first hours (0-2 h) reaching dynamic equilibrium from 2 to 12 h, considering this interval the maximum adsorption verified in the experiment. Its results are similar to those of our study, within limits, and reinforces a hypothesis that when cadmium comes into contact with GRSP it is immediately adsorbed and in almost its entirety, making it immobilized in the functional groups hydroxyl, carboxyl, carbonyl, amide, among others (hard Lewis bases).

**Figure 2.** Effect of contact time (minutes) on the removal of Cd (II) by GRSP from Dystroferric Red Oxisol and Histosol after 24 h of agitation. Fixed parameters: GRSP dose = 30 mg; initial concentration =  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  Cd (II).



LV	741.69	0.01	0.76	16.86	0.71	18.10	-0.01
Org	367.23	0.09	0.50	48.94	0.70	46.67	0.08

$q_{\max}$  is the maximum adsorption capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_e$  is the equilibrium concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $K_F$  is the Freundlich affinity coefficient and  $n$  is the Freundlich nonlinearity factor and  $\beta_s$  is the adsorption constant Sips.

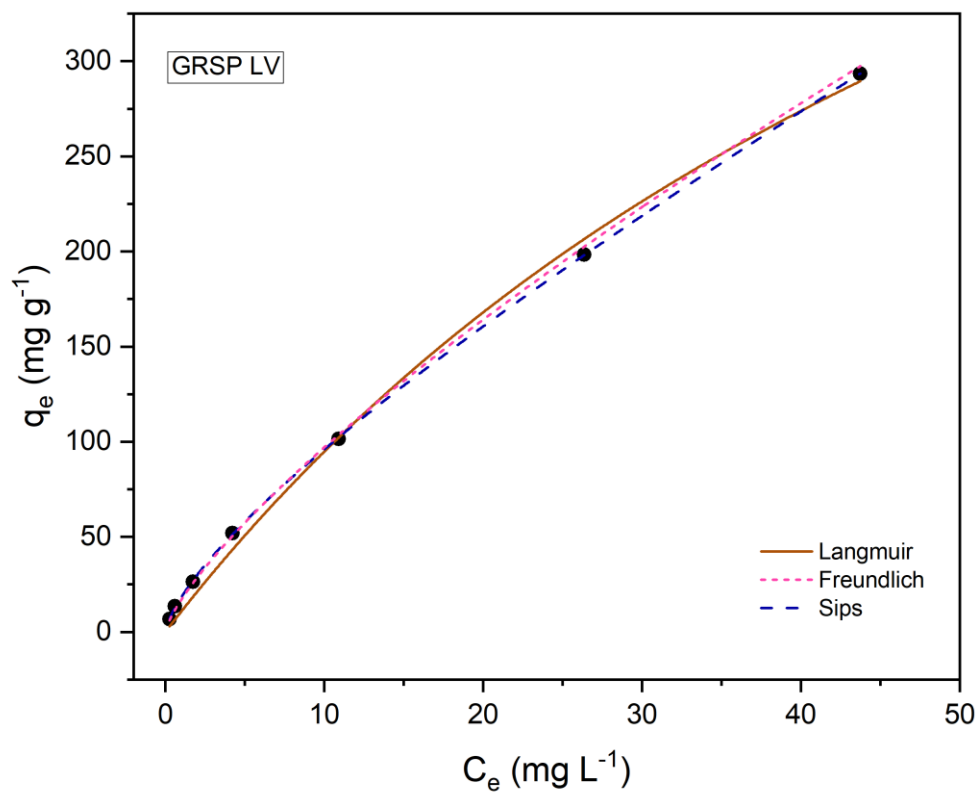
The analysis of the statistical parameters adjusted  $R^2$  and the error sum of squares (ERRSQ) (Table 3) showed that the Sips, Freundlich and Langmuir model adjusted well to predict the heterogeneous Cd (II) adsorption systems. The Sips model reduces the limitation of the increase in adsorbate concentration, since at low concentrations it is reduced to the Freundlich model and at high concentrations, it approaches the Langmuir isothermal model (Foo and Hameed, 2010). Because different models explain the adsorption of Cd (II) by GRSP, this metal is adsorbed in a monolayer system and also in a multilayer and heterogeneous system, which makes this a complex process (Foo and Hameed, 2010; Lin et al., 2023).

**Table 3.** Statistical parameters generated by isotherm models.

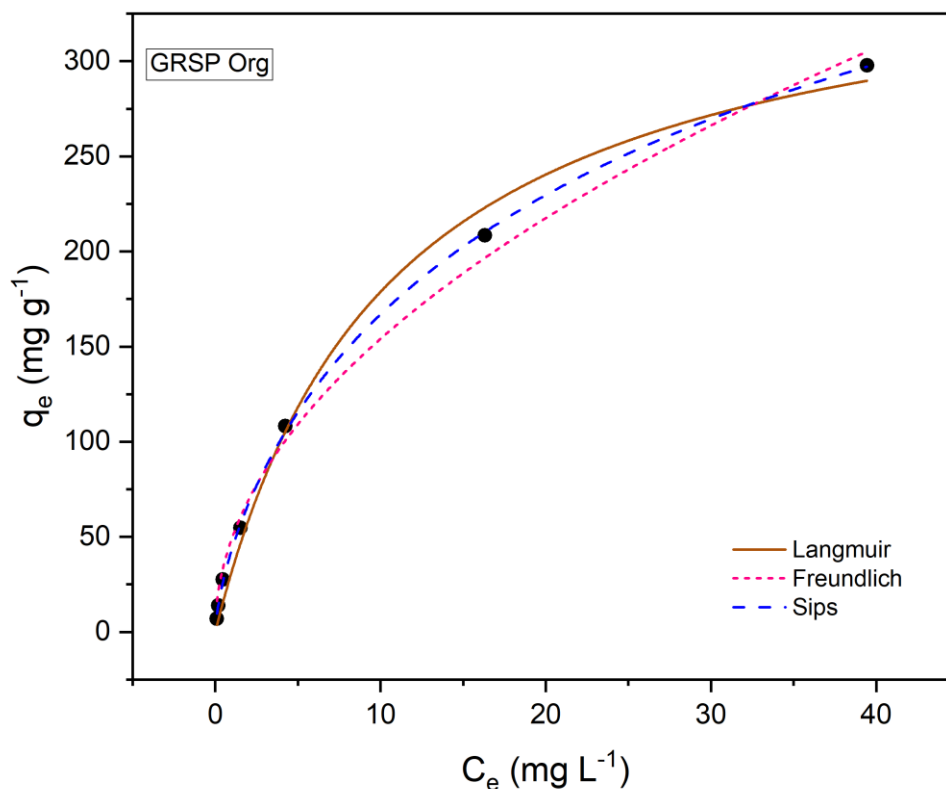
GRSP	Isotherm models					
	Langmuir		Freundlich		Sips	
	$R^2$ adj	ERRSQ	$R^2$ adj	ERRSQ	$R^2$ adj	ERRSQ
LV	0.995	285.12	0.997	16,771.79	0.999	2.52
Org	0.991	559.88	0.992	468.33	0.999	27.81

In our study, it is not possible to categorically determine  $q_{\max}$  due to the data not demonstrating a constant level. The values tabulated for the Langmuir model ( $q_{\max}$ ) are estimates of the model, however, within limits, reliable. Figure 3 demonstrates the isothermal adsorption models of Langmuir, Freundlich and Sips.

**Figure 3.** Cd (II) adsorption isotherms in GRSP according to the Langmuir, Freundlich and Sips models.







Given the ability of GRSP to immobilize Cd (II), a comparison can be made with GRSP from soils from other countries and other adsorbents most studied and applied in aqueous solutions, namely: GRSP, biochar and soils (Table 4).

**Table 4.** Adsorption parameters (maximum adsorption capacity, pH and adsorbate dose) and isothermal models for Cd (II) adsorption with different adsorbents compared to GRSP.

Adsorbate	Adsorbent	Maximum adsorption (mg g <sup>-1</sup> )	pH	Maximum dosage (mg L <sup>-1</sup> )	Isothermal model	R <sup>2</sup>	Reference
	GRSP	741.69	7.0	337.2	Langmuir	0.99	This work
	GRSP	367.23	7.0	337.2	Langmuir	0.99	This work
Cd (II)	GRSP	1.47	7.0	337.2	Langmuir	0.99	Lin et al. (2023)
	Biochar	31.3	5.0	800	Langmuir	0.98	Zhang et al. (2023)

Biochar	1.18	Sem ajuste	16	Langmuir	0.99	Carnier et al. (2022)
Biochar	135.7	7.0	1000	Langmuir	0.89	Liu et al. (2021)
Biochar	116.9	7.0	1000	Langmuir	0.99	Liu et al. (2021)

Our study demonstrates the potential of GRSP, also from tropical soils, to immobilize and remove Cd(II) in aqueous solutions. These findings demonstrate the importance of using GRSP isolated in the laboratory as a Cd adsorbent at concentration levels close to the values required by current legislation, within limits. For example, at the lowest concentrations (0.0625 and 0.125 mmol L<sup>-1</sup> Cd), for GRSP LV and GRSP Org it remained 0.0023 and 0.0053 mmol L<sup>-1</sup> and 0.001 and 0.002 mmol L<sup>-1</sup> in aqueous solution, equivalent to 0.26, 0.60 mg L<sup>-1</sup> of Cd after adsorption by GRSP LV, and 0.11, 0.19 mg L<sup>-1</sup> of Cd after adsorption by GRSP Org. In environmental legislation for the state of São Paulo (Cetesb, 2021), Minas Gerais and nationally (Conama, 2009) , respectively, the acceptable value of Cd in soils is < 1.3 mg kg<sup>-1</sup>, and the value that requires intervention for groundwater is 3 µg L<sup>-1</sup>. Within limits, we can say that GRSP contributed to immobilizing and removing Cd (II) from aqueous solutions in low and high concentrations and that it approaches acceptable levels under current Brazilian legislation.

## Conclusions

In this study we evaluated the potential of GRSP from two Brazilian soils to adsorb cadmium. Work is emerging with interest in immobilizing cationic metals from aqueous solutions and other environmental matrices. As in other recent studies, GRSP exhibited strong adsorption capacity, removal efficiency and affinity for Cd(II).

The mechanisms that can explain this fact are electrostatic attraction and surface complexation, supported by the theory of hard and soft acids, hard and soft bases. The Sips isotherm was the model that best explained the data set, and this model was used for what was proposed, it was effective, understandable, realistic and predictive.

GRSP has been successfully applied in aqueous solutions to several potentially toxic elements and more research needs to be carried out to better understand the interaction of GRSP-EPT and with organic substances used in agriculture and industrial waste.

## References

- Carnier, R. 2022. Cadmium and lead adsorption and desorption by coffee waste-derived biochars. **Soil and Plant Nutrition**, pp. 1-15.
- Deng, Y. et al. 2020. Bioresource technology competitive adsorption behaviour and mechanisms of cadmium, nickel and ammonium from aqueous solution by fresh and ageing rice straw biochars. *Bioresour. Technol.*, 303, 122853.
- Hamisu, A. M., Ariffin, A., Wibowo, A. C. 2020. Cation exchange in metal-organic frameworks (MOFs): the hard-soft acid-base (HSAB) principle appraisal. **Inorg. Chim. Acta**, v. 511, 119801.
- Iamsaard, K. et al. 2022. Adsorption of metal on pineapple leaf biochar: key affecting factors, mechanism identification, and regeneration evaluation. *Bioresour. Technol.*, 344, 126131.
- Lin, L. et al. 2023. Sequestration of strontium, nickel, and cadmium on glomalin-related soil protein: Interfacial behaviors and ecological functions. **Science of The Total Environment**, v. 881, 163461.
- Liu, P. et al. 2021. Capacity and potential mechanisms of Cd(II) adsorption from aqueous solution by blue algae-derived biochars. **Science of The Total Environment**, v. 767, 145447.
- Lopes, A. S., Guilherme, L. R. G. 2016. Chapter One - A Career Perspective on Soil Management in the Cerrado Region of Brazil. **Advances in Agronomy**, v. 137, pp. 1-72.
- Penido, E. S., Melo, L. C. A., Guilherme, L. R. G., Bianchi, M. L. Cadmium binding mechanisms and adsorption capacity by novel phosphorus/magnesium-engineered biochars. **Science of The Total Environment**. v. 671, pp. 1134-1143.
- Singh, A. K., Rai, A., Singh, N. 2016. Effect of long term land use systems on fractions of glomalin and soil organic carbon in the indo-gangetic plain. **Geoderma**, v. 227, pp. 41-50.
- Sparks, D. L. Environmental Soil Chemistry. **New York**, Academic Press, 1995. 276 p.

Tian, Y. et al. 2021. Potential and mechanism of glomalin-related soil protein on metal sequestration in mangrove wetlands affected by aquaculture effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 420, 126517.

Wu, Z. et al. 2014. Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration: Field experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, pp. 283-290.

Zhang, Na, Reguyal, F., Praneeth, S. Sarmah, A. K. 2023. A novel green synthesized magnetic biochar from white tea residue for the removal of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution: Regeneration and sorption mechanism. **Environmental Pollution**, v. 330, 121806.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo caracterizamos a proteína do solo relacionado a glomalina de dois pedossistemas, mineral e várzea (solo orgânico) e avaliamos o potencial do GRSP de dois solos brasileiros para adsorver cádmio. Evidenciou-se que técnicas simples ainda são importantes para caracterizar subprodutos microbianos. Técnicas mais refinadas e modernas promovem insights importantes na compreensão da composição de GRSP. Além disso, GRSP como uma substância excretada por fungos micorrízicos arbusculares, pode ser utilizada como adsorventes de substâncias inorgânicas prejudiciais aos organismos e ao ser humano. O cádmio é um elemento extremamente perigoso e pode ser imobilizado/removido de soluções aquosas por GRSP. Estão surgindo trabalhos com interesse na remoção/imobilização de metais catiônicos de soluções aquosas e outras matrizes ambientais. Como em outros estudos recentes, a GRSP exibiu forte capacidade de adsorção, eficiência de remoção e afinidade por Cd(II). A GRSP tem sido aplicada com sucesso em soluções aquosas para vários elementos potencialmente tóxicos e mais pesquisas precisam ser realizadas para melhor compreender a interação do GRSP-EPT e com substâncias orgânicas utilizadas na agricultura.