UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**" Uso de EPR na avaliação de diferentes manejos
do solo usando substâncias húmicas"**

Joselaine Ap. M. Migliato Marega

*Dissertação apresentada ao
Instituto de Física e Química de
São Carlos, Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Ciências- Física
Aplicada .*

ORIENTADOR: Dr. Ladislau Martin Neto

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

SÃO CARLOS

1993

**IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física e Química de São Carlos

Fone (0162) 72-6222
Fax (0162) 72-2218

MEMBRO DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOSELAINE APARECIDA MARTINEZ
NAREGA APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
EM 19/11/1993

Av. Dr. Carlos Botelho, 1465
Caixa Postal 369
13560-970 - São Carlos - SP
Brasil

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Otaciro Manoel Nascimento

Prof. Dr. José Pedro Donoso Gonzalez

Dr. Luiz Alberto Colnago

*Dedico aos meus pais pela
dedicação, incentivo e compreensão em
todos os momentos de minha vida. Ao
Euclydes pelo apoio e amizade nos
momentos difíceis e à minha filha
Gabrielle.*

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento deste trabalho recebi a colaboração de pessoas e instituições. Gostaria de agradecer as contribuições mais importantes.

- Ao Dr. Ladislau Martin Neto pela sua dedicação na orientação deste trabalho, seu permanente entusiasmo pelo trabalho de pesquisa e pela sua amizade.
- Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel do Nascimento por ceder o laboratório para a realização do trabalho, principalmente pela sua disposição em orientar-me durante o ano de 1993 e pela sua amizade.
- Aos pesquisadores da EMBRAPA-CNPDIÁ pela colaboração e amizade.
- Ao Dr. Mário Miyazawa, do IAPAR-Londrina, pela sugestão da área de experimentos de campo, pela coleta e caracterização dos solos utilizados nesse trabalho.
- À Profª. Eny M. Vieira pela extração e purificação das amostras de ácido húmico e pela sua disponibilidade.
- Às Profªs Leila e Rosemary pela amizade.
- À Bel, Beto e Sueli pela ajuda durante a realização das experiências, amizade e apoio.
- À amiga Cristina Lara pelo incentivo, amizade e sugestões durante a elaboração do trabalho.
- À Wanda pela colaboração nas medidas de pH.
- À Bene pela ajuda com as figuras.
- À todos os amigos do grupo de Biofísica pela amizade.
- Ao CNPq pela concessão da minha bolsa de estudo, e à EMBRAPA pelo financiamento da pesquisa.

ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
I - INTRODUÇÃO.....	1
II - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	5
II.1 - Formação das substâncias húmicas.....	5
II.2 - Estrutura.....	8
II.3 - Extração e Fracionamento.....	11
II.4 - Purificação do ácido húmico.....	14
III - RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	16
III.1 - Condição de Ressonância.....	17
III.2 - Interações.....	18
III.2.1 - Interação Spin-Órbita.....	18
III.2.2 - Efeito do Campo Cristalino - Interação Fina.....	19
III.2.3 - Interação Hiperfina.....	22
III.3 - Absorção de Energia, Relaxação Spin-Rede, Saturação.....	24
III.4 - Metais de Transição.....	27
III.4.1 - Íon V^{4+}	27
III.4.2 - Íons Mn^{2+} e Fe^{2+}	28
III.4.3 - Íon de Cu^{2+}	34
IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
IV.1 - Amostras.....	37
IV.2 - Extração e Purificação do Ácido Húmico.....	39
IV.3 - Técnicas utilizadas para a caracterização.....	41

IV.3.1 - Análise Elementar.....	41
IV.3.2 - Medidas de RPE em Radicais Livres.....	42
IV.3.2.1 - Determinação do número de spins.....	47
IV.3.3 - Medidas de RPE em Metais de Transição.....	51
IV.3.4 - Medidas com Carbonato de Cálcio.....	51
IV.4 - Medidas da razão E_4/E_6 por Absorção Eletrônica.....	51
V - RESULTADOS.....	54
V.1 - Radicais Livres.....	55
V.2 - Razão E_4/E_6	58
V.3 - Análise Elementar.....	60
V.4 - Diferentes estágios de purificação.....	63
V.5 - Medida com Carbonato de Cálcio.....	63
V.6 - Complexos com metais de transição.....	67
VI - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	75
VI.1 - Radicais Livres.....	75
VI.2 - Razão E_4/E_6	76
VI.3 - Análise Elementar.....	77
VI.4 - Diferentes estágios de purificação.....	80
VI.5 - Medida com Carbonato de Cálcio.....	80
VI.6 - Complexos com metais de transição.....	81
VII - CONCLUSÕES.....	83
VIII -REFERÊNCIAS.....	86

RESUMO

No Brasil existem escassos estudos sobre caracterização qualitativa da matéria orgânica, submetida a diferentes tipos de manejo. Neste trabalho realizou-se um estudo para determinar seus efeitos sobre as propriedades do ácido húmico extraídos de um latossolo roxo distrófico depois de 11 anos de contínuo cultivo.

Para determinar o grau de humificação das substâncias húmicas foram realizadas medidas de radicais livres pela técnica de RPE e confirmadas pela medida da razão E_4/E_6 , obtidas por absorção eletrônica.

Encontrou-se uma concentração de radicais livres semiquinona em torno de 10^{14} spins/g. Comparando amostras de áreas de mata virgem, plantio direto e manejo convencional, observou-se uma concentração maior de radicais na primeira e menor no manejo convencional.

Como a concentração de radicais livres indica o grau de humificação do ácido húmico, pode-se concluir que o manejo convencional causa uma decomposição da substância húmica mais intensiva quando comparado com o plantio direto.

Usou-se a técnica de RPE para examinar a formação de complexos micronutrientes-substâncias húmicas para amostras em diferentes estágios de purificação.

Outra experiência realizada foi a adição de carbonato de cálcio em uma turfa da região de Ribeirão Preto. Esta técnica é muito usada pelos agricultores para diminuir a acidez do solo. Entretanto, foi observado que a adição de Carbonato de Calcio além de diminuir a acidez provoca uma diminuição do grau de humificação.

ABSTRACT

There are practically no information about the changes in organic materials of the brazilian soil, submitted to different kinds of tillage. In this work we report effects that occurs in the humic acid of a brazilian soil Oxisol dystrophic, after eleven years of continuous tillage.

We use the EPR spectroscopy to determine the degree of soil humification, which was confirmed by the ratio E_4/E_6 , obtained by absorption spectroscopy.

The concentration of Semiquinone free radicals are about 10^{14} spins/g, greater in virgin soil than in a soil submitted to conventional tillage, analyzed for three different depths.

The free radicals concentration gives the degree of humification for the humic substances, and help us to determine that the degradation of a soil submitted to conventional tillage is more intensive that in the no tillage practice.

Also EPR technique are used to examine the formation of micronutrient metal complexes (Cu^{+2} , VO^{+2} , Mn^{+2} and Fe^{+3}) due to different degrees of purification.

The effect of Calcium Carbonate addition was studied in a peat from Ribeirão Preto region. This is a common technique used by the farmers to decrease the degree of acidification of the soil. Although this addition provide the decreasing of the degree of humification.

I-INTRODUÇÃO

Substâncias húmicas são os maiores constituintes de solos sedimentares, ocorrendo em quase todos os sítios terrestres e aquáticos. Surgem de degradações biológicas de resíduos de plantas e animais e de atividades sintéticas de microorganismos⁽¹⁾.

Existem a mais de 200 anos investigações químicas e físicas das substâncias húmicas⁽²⁾ sendo que uma das primeiras observações feitas foi a capacidade para adsorver água e nutrientes de plantas. Apesar de ter sido escrito inúmeros artigos científicos, muito ainda permanece para ser apreendido sobre sua origem, síntese, estrutura química, reações e funções em meios terrestres e aquáticos.

Esses materiais são geralmente divididos em três frações principais: ácido húmico (AH) que é solúvel em extrato alcalino, mas precipita-se sob acidificação do extrato; ácido fúlvico (AF) que é a fração que permanece em solução quando o extrato alcalino é acidificado, isto é, solúvel em extrato alcalino e ácido; humina é a fração húmica que não pode ser extraída de solos e sedimentos por diluição básica ou ácida.

Em decorrência de sua alta capacidade de retenção de água (até 20 vezes seu peso) o húmus é importante na conservação do solo contra a erosão. Na combinação com argilas forma um complexo argilo-orgânico que cimenta as partículas do solo em agregados, o que permite a aeração, e aumenta sua permeabilidade. Devido a sua coloração escura, o húmus contribui para retenção de calor pelo solo influenciando na germinação de sementes e desenvolvimento de raízes.

Outra característica importante é a capacidade de troca de cátions (CTC), que em geral varia de 300 à 1400 meq/100g de húmus, o que representa de 20 a 70 % da CTC do solo. As substâncias húmicas formam complexos com vários íons metálicos micronutrientes (como Fe, Cu, Mn, Zn, Mo e outros) influenciando a disponibilidade para as plantas. Da mesma forma pode combinar com metais tóxicos como o chumbo e o alumínio, diminuindo a concentração do íon livre e assim reduzindo sua toxidez. Além disso tem sido mostrado que muitas moléculas orgânicas, incluindo pesticidas extensivamente usados na agricultura, interagem preferencialmente com as substâncias húmicas no solo, afetando a bioatividade e biodegradabilidade desses pesticidas.

Resultados recentes na literatura^(30,31) têm proposto que alterações na quantidade e qualidade da matéria orgânica podem ocorrer em função do manejo praticado nos solos. O chamado manejo convencional, que envolve queima de vegetação, aração, gradeação e controle químico e mecânico de ervas daninhas, quando comparado com plantio direto que utiliza somente controle químico das ervas daninhas, mostrou redução no conteúdo total da matéria orgânica do solo, e uma diminuição acentuada da proporção ácido húmico (AH) / ácido fúlvico (AF), com importantes implicações para a estrutura do solo. Uma das preocupações com a redução na proporção AH/AF é o fato que o AH é a fração húmica de maior peso molecular, é insolúvel nos pHs normalmente encontrado nos solos, e com importante papel estrutural e o AF é solúvel nesses pHs e pode ser lixiviado e assim compromete a estrutura do solo, facilitando processos de erosão, por exemplo.

No Brasil, tem sido utilizados diferentes práticas agrícolas. No entanto, não existem estudos que avaliem adequadamente os referidos manejos. Sabe-se que o manejo inadequado, juntamente com queimadas e desmatamento são responsáveis pela perda de 1 bilhão de toneladas de solo por ano no Brasil devido ao processo de erosão. Para se ter uma idéia do

que isso significa, trata-se da perda de uma área equivalente a Alagoas a cada 15 anos.

A identificação e caracterização dos diferentes compostos húmicos (ácido húmico, ácido fúlvico e humina), bem como a avaliação das alterações qualitativas desses compostos têm sido efetuadas através do uso de técnicas espectroscópicas, como Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), absorção eletrônica, infravermelho e outras.

A técnica de RPE é uma das poucas entre métodos de laboratório que pode fornecer informações estruturais, sem artefatos ou condições experimentais restritivas sobre a complexação dos íons metálicos com substâncias húmicas⁽³⁾. RPE também detecta com alta sensibilidade radicais livres estáveis que influenciam nas reações de polimerização e despolimerização das cadeias húmicas e indicam o grau de humificação dos compostos, e nas reações com compostos orgânicos, tais como pesticidas e poluentes tóxicos⁽⁴⁾.

Neste trabalho foram utilizadas amostras de latossolo roxo distrófico obtidas dos campos experimentais do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), situado em Londrina - PR. Foram caracterizadas amostras de ácido húmico provenientes de uma região com 11 anos de cultivo, submetidos a diferentes manejos e rotação de culturas, e também uma área de floresta nativa para comparação.

Usando a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica foi possível quantificar os radicais livres semiquinona, que indicam o grau de humificação da substância húmica, além de detectar e caracterizar os complexos com íons metálicos, que se encontram naturalmente presentes nas amostras.

Através da medida de absorção eletrônica em solução alcalina dos ácidos húmicos, determinou-se a razão E_4/E_6 (absorbância em 465nm e absorbância em 665nm), que dá informação sobre a humificação das substâncias húmicas⁽¹⁾.

Realizou-se também a Análise Elementar das substâncias húmicas para quantificar os elementos C,N,H e O das amostras de ácido húmico e através desta porcentagem foram obtidas a relação C/N e as razões atômicas O:C e H:C.

O capítulo II desta dissertação apresenta uma breve discussão sobre a formação, estrutura e extração das substâncias húmicas, assim como sua importância para a agricultura. No capítulo III encontra-se uma introdução aos princípios de espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.

No capítulo IV está descrito as características das amostras analisadas, processo de purificação e o procedimento experimental usado neste trabalho.

Nos capítulos V e VI encontram-se os resultados e discussões para os dados obtidos pelas técnicas de RPE e absorção eletrônica.

A conclusão do trabalho, assim como as propostas de trabalhos futuros, estão apresentadas no capítulo VIII.

II - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Os solos e sedimentos contêm uma grande variedade de materiais orgânicos que consistem de uma mistura de produtos em vários estágios de decomposição resultantes da degradação química e biológica de resíduos de plantas e animais e da atividade sintética de microorganismos. São classificados em substâncias húmicas, também chamados de húmus e substâncias não húmicas. A diferença encontra-se no fato que as substâncias não húmicas possuem natureza definida, como por exemplo: aminoácidos, carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, ao passo que as substâncias húmicas são de estrutura química complicada⁽⁵⁾.

Estes materiais são usualmente divididos em três frações principais: a) ácido húmico (AH)- é solúvel em extrato alcalino, mas precipita-se sob acidificação do mesmo; b) ácido fúlvico (AF) - é a fração que permanece em solução quando o extrato alcalino é acidificado, isto é, solúvel em extrato alcalino e ácido; c) humina é a fração que não pode ser extraída de solos ou sedimentos por diluição básica ou ácida.

II.1 - FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As substâncias húmicas podem ser formadas durante a decomposição de restos de plantas e animais por vários caminhos. No entanto há quatro mecanismos que são os mais prováveis para a síntese do ácido húmico e ácido fúlvico na natureza (figura II.1):

Figura II.1- Mecanismos de formação das substâncias húmicas.

1 - Teoria da lignina

De acordo com esta teoria, os resíduos que não são utilizados pelos microorganismos fazem parte do húmus, tendo como produto inicial o ácido húmico e o ácido fúlvico como resultado de oxidações e fragmentações desse.

Sabe-se que a lignina é menos atacada pelos microorganismos do que outras componentes das plantas, entretanto existem mecanismos na natureza para a sua completa decomposição aeróbica. Os fungos que a degradam não são normalmente encontrados em sedimentos úmidos. Sendo assim, as ligninas modificadas podem dar maior contribuição para a formação do húmus da turfa, de sedimento de lagos e de solos encharcados.

2 - Teoria de Polifenóis

Esta teoria refere-se aos caminhos 2 e 3 da figura II.1, sendo que no caminho 3 a

fonte de polifenóis é a lignina e no caminho 2 são sintetizados por microorganismos usando outras fontes de carbono.

Durante a biodegradação da lignina na formação dos polifenóis os fungos são os microorganismos mais importantes por serem responsáveis pela quebra desta⁽⁶⁾.

Os polifenóis obtidos pela decomposição da lignina ou síntese microbiana, não são estáveis e estão sempre sujeitos à serem decompostos por microorganismos⁽⁵⁾. Alternativamente eles podem sofrer recombinações entre si, ou com outras moléculas orgânicas, e, finalmente, converterem-se em quinonas. Os fenóis podem ser, espontaneamente, oxidados por quinonas em meio alcalino, ou por enzimas.

3 - Condensação Amino Açucar

De acordo com esta teoria, açúcares e aminoácidos reduzidos sofrem polimerização não enzimática para formar polímeros nitrogenados de cor marrom, do tipo produzido durante a desidratação de certos produtos alimentícios.

Como foi visto, há uma variedade de reações que podem levar à formação de substâncias húmicas. O caminho mais provável, para a maioria dos solos, parece ser através das reações de condensação envolvendo polifenóis e quinonas⁽⁵⁾. Acredita-se que os fenóis derivados de lignina ou sintetizados por microorganismos, sejam, enzimaticamente, convertidos para quinonas, as quais sofrem condensações entre si ou combinam com compostos nitrogenados para formarem polímeros. Tanto o número de moléculas precursoras como o de caminhos de combinação são grandes, o que justifica a natureza heterogênea dos materiais húmicos de um dado solo.

II.2 - ESTRUTURA

A estrutura das substâncias húmicas até hoje não é bem conhecida. Várias investigações foram feitas e não se chegou a resultados satisfatórios.

Usando técnicas como pirólise, cromatografia a gás, espectroscopia de massa, cromatografia gélida, difração de raios X, microscopia eletrônica, ressonância magnética nuclear e várias outras, têm sido possível alguns avanços para esclarecer este ponto. Entretanto, levam a poucas informações devido a dificuldade para relacionar os dados obtidos nas diversas informações, já que não existe um método padrão.

O uso de métodos degradativos não tem levado a informações muito precisas a respeito da estrutura, pela falta de conhecimento sobre os possíveis mecanismos envolvidos nas reações de degradação do húmus⁽⁷⁾.

Existem várias estruturas propostas para as substâncias húmicas, entre elas destacam-se as sugeridas por Dragunov, citada em Kononova⁽²⁾ e de Flaig⁽⁸⁾ mostrada nas figuras II.2 e II.3

Figura II.2- Estrutura do ácido húmico sugerida por Dragonov.

Figura II.3- Estrutura do ácido húmico proposta por Flaig.

Figura II.4- Estrutura do ácido húmico, segundo Stevenson.

repectivamente.

Para o modelo de Dragunov ser inteiramente aceitável deveria ser considerada a ocorrência de quantidade significativa de grupos COOH aromáticos e algum arranjo em posição que permita a formação de anidrido cíclico por tratamento químico.

Por outro lado o modelo de Flag contém abundância de OH fenólico e quinonas, mas a molécula é deficiente de grupos COOH.

Outra estrutura é a proposta por Stevenson⁽⁹⁾ (figura II.4), que mostra os grupos OH fenólicos livres e ligados, estruturas quinonas, nitrogênio ligando unidades estruturais e grupos COOH em diferentes pontos dos anéis aromáticos. Estes grupos seriam os responsáveis pela atividade química, biológica e fisiológica destas substâncias, nos ecossistemas aquáticos e terrestres.

Schnitzer e Khan⁽¹⁰⁾ apresentaram uma estrutura parcial para o ácido fúlvico (figura II.5), formado por estruturas fenólicas e ácidos carboxílicos aromáticos, que se unem por pontes de hidrogênio para formar uma estrutura polimérica de considerável estabilidade. Suas moléculas são constituídas de poros de diferentes dimensões que podem aprisionar compostos orgânicos de baixo peso molecular e compostos inorgânicos, tais como inseticidas e íons metálicos.

Essa estrutura tem sido criticada por vários cientistas, entre eles Maximov⁽¹¹⁾, pois, a energia da ligação formada por pontes de hidrogênio entre ácidos carboxílicos não excede 15kcal/mol e assim na presença de alcalinos diluídos, seria quebrada formando sal. A degradação do ácido fúlvico pela oxidação alcalina com permanganato leva 50% do conteúdo de carbono a dióxido de carbono e ácido benzenocarboxílico. Se as estruturas do ácido fúlvico fossem formadas por moléculas monoméricas não seria necessário condições tão drásticas para liberar tais compostos.

Figura II.5- Estrutura do ácido fúlvico proposta por Schnitzer e Khan.

As substâncias húmicas são constituídas de uma mistura heterogênea de compostos onde cada fração (ácido fúlvico, ácido húmico e humina) deve ser considerada como sendo constituído de uma série de moléculas de tamanhos diferentes, sendo que a maioria delas não possuem a mesma configuração estrutural ou grupos reativos na mesma posição. As estruturas das substâncias húmicas parecem variar de solo para solo, pois são, função do clima, tipo de vegetação, hidrologia, etc. Apesar de serem diferentes em sua composição, possuem os mesmos grupos funcionais..

II.3 - EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

As substâncias húmicas só são estudadas quando estão livres dos componentes

inorgânicos e das substâncias não húmicas do solo. Para isso é necessário obedecer dois procedimentos, que são:

a) extração da matéria orgânica do substrato do solo, que tem sido feita através do uso de solução de NaOH, com concentração entre 0.1 e 0.5N.

b) purificação na qual é eliminada a matéria inorgânica e a matéria orgânica não húmica.

Foi comparada a capacidade de extração de substâncias húmicas⁽¹²⁾ de vários solventes e verificou-se que a maior capacidade para a extração simultânea de ácido húmico e ácido fúlvico, é do hidróxido de sódio 0.5N.

Entretanto, o uso de solução alcalina tem sido muito criticado, pois nestas condições a matéria orgânica pode ser alterada através de hidrólise e auto oxidações⁽¹³⁾. No entanto, parecem ser poucas as evidências que a solução alcalina, sob atmosfera de N₂, danifique ou modifique a estrutura química e as propriedades das substâncias húmicas. Scheffer⁽³²⁾ e Welte⁽³³⁾ mostraram que o ácido húmico extraído com solução de hidróxido de sódio 0.5% tem absorbâncias altamente similares ao ácido húmico extraído com solução de fluoreto de sódio 1%. Outros trabalhos foram realizados e nenhuma diferença foi encontrada na análise elementar, no conteúdo de grupos funcionais contendo oxigênio (COOH, OH, C=O), nos fracionamentos por filtração em gel e nos espectros de infravermelho dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos por NaOH ou qualquer outro extrator⁽¹⁾.

Como os sais de cátions di e trivalentes são insolúveis em solução alcalina, antes da extração, é necessário lavar o solo com ácido clorídrico diluído. A solução ácida remove cálcio e outros cátions polivalentes, aumentando a eficiência do processo de extração da matéria orgânica com reagentes alcalinos. Certamente uma pequena quantidade de matéria orgânica (normalmente menos de 5% para solos superficiais) é removida neste processo, a

maior parte sendo ácido fúlvico de baixo peso molecular⁽¹³⁾.

Devido a extração alcalina, surgem algumas consequências, que são:

- a solução alcalina dissolve a argila do substrato mineral, que contamina o húmus extraído;
- a solução alcalina dissolve a matéria orgânica não húmica contida no solo. Como as

Figura II.6 - Fracionamento de Substâncias húmicas.

substâncias húmicas e não húmicas não são facilmente separadas, por poderem ligar-se covalentemente ao húmus, a solução alcalina dissolve a matéria orgânica não húmica contida no solo.

- sob condições alcalinas, ocorre auto-oxidação de alguns constituintes orgânicos quando estão em contato com o ar, porém em atmosfera de nitrogênio esta não é significativa.
- podem ocorrer outras modificações, como condensação entre aminoácidos e grupamentos carbonila de aldeídos ou quinonas para formar compostos tipo húmus.

Outros extraentes têm sido utilizados, apresentando vantagens e desvantagens, mas

com capacidade extratora inferior ao hidróxido de sódio.

Para o fracionamento das substâncias húmicas usa-se o método clássico baseado nas diferentes solubilidades (figura II.6). As frações obtidas fazem parte de uma mistura heterogênea de moléculas poli dispersas que se situam no intervalo de pesos moleculares, que variam de algumas centenas até milhões⁽¹⁴⁾. Entre as frações é encontrado: ácido húmico que é solúvel em álcali e insolúvel em ácido; ácido fúlvico solúvel tanto em base como em ácido e a humina que é insolúvel em álcali.

A porcentagem de húmus presente em cada fração húmica varia consideravelmente de um tipo de solo para outro.

As substâncias húmicas possuem natureza ácida devido a presença de grupos COOH e OH (presumivelmente fenólico). Cátions monovalentes (Na^+ , K^+) formam sais solúveis tanto com ácido húmico quanto com ácido fúlvico, enquanto que a solubilidade do húmus na forma ácida depende do peso molecular(AH).

II.4 - PURIFICAÇÃO

A fração de ácido húmico extraída dos solos, frequentemente contém uma considerável quantidade de impurezas inorgânicas. Pode-se encontrar um conteúdo de cinzas que chega a 30% para ácido húmico extraído de alguns tipos de solos. Entretanto, pode-se reduzir esta quantidade através de repetidas etapas de dissolução-precipitação (com ácido mineral), e passagem através de resina de troca iônica. Uma maneira efetiva para remover argilas é a centrifugação a alta velocidade, após redissolver o ácido húmico em pH levemente alcalino.

Um método eficiente para purificar o ácido húmico é lavá-lo à temperatura ambiente com uma solução diluída de $\text{HCl} - \text{HF}$ ⁽³⁸⁾. Após a agitação por um período que varia de 12 à 48 horas, a mistura ácida é removida por filtração e o resíduo lavado com água destilada.

Desta forma consegue-se obter o teor de cinzas inferior a 1%. Essa eficiência pode ser explicado devido a sua capacidade de dissolver argilas hidratadas e formar complexos com cátions di e trivalentes.

Outro método que tem sido usado é a diálise⁽¹²⁾. Neste são facilmente removidos os sais e compostos orgânicos de baixo peso molecular, enquanto que os metais complexados ou fortemente adsorvidos não podem ser facilmente eliminados.

De maneira geral, os íons metálicos encontram-se ligados ao ácido húmico por ligações de coordenação. Assim a redução no conteúdo de cinzas implica em uma perda de substâncias húmicas, possivelmente por liberação de ácido fúlvico de baixo peso molecular que está ligado ao ácido húmico através do metal.

III- RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA*

Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é o fenômeno de absorção de energia pelos elétrons desemparelhados de um átomo, molécula ou íon, por interação com radiação eletromagnética quando estes se encontram sujeitos a aplicação de um campo magnético. Assim, a condição necessária para a utilização desta técnica é que o sistema em estudo apresente elétrons não emparelhados. Nesse aspecto, os íons de metais de transição (Fe, Cu, Mn, Co, Mo, entre outros) e radicais livres são adequados.

Algumas características desta técnica são:

- alta sensibilidade (detecta até 10^{12} spins em 0.1ml)
- estudos em amostras nos estados sólido, líquido e gasoso;
- não é destrutiva e não usa radiação ionizante;
- identificação e determinação da concentração do elemento paramagnético;
- informação sobre o estado de valência e simetria do íon metálico;
- localização e identificação dos radicais livres

Descoberta em 1914, pelo russo E. Zavoisky, a técnica de RPE teve suas primeiras aplicações no campo da física e depois foi usada na química. Hoje é muito utilizada também por bioquímicos e biofísicos, entre outros.

Em sistemas biológicos, é particularmente útil no estudo das chamadas

*No resumo de RPE apresentado neste capítulo foram usados vários livros textos de Ressonância magnética (15,16,17 e 36)

metaloproteínas, pois estas, geralmente, apresentam íons de metais de transição no seu centro ativo. Também tem sido explorada na detecção de radicais livres, envolvidos em eventos como a destruição de membranas e tecidos biológicos. No campo da física, continua sendo uma técnica de grande utilidade, inclusive no estudo das recém-descobertas cerâmicas supercondutoras a altas temperaturas.

Na agropecuária, muitos problemas importantes estão sendo estudados com a utilização desta técnica⁽¹⁹⁾. Alguns exemplos são:

- fotossíntese - detecção do Mn(II) e radicais livres nos cloroplastos;
- fixação de nitrogênio pelas plantas - a enzima nitrogenase tem em seu centro ativo íons de ferro e molibidênio;
- complexação de micronutrientes (Cu, Fe, Mn, V) em matéria orgânica (ácido húmico e ácido fúlvico) do solo;
- estudo da absorção de micronutrientes pelas raízes de plantas - resultados interessantes foram obtidos com o íon de Cu(II);
- efeitos de radiação X, γ , e outras em alimentos - produção de radicais livres.

III.1 - CONDIÇÃO DE RESSONÂNCIA

O momento magnético de um elétron livre é dado por

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{S} = g \beta \vec{S} \quad (\text{III.1})$$

onde γ é a razão giromagnética, β é o magneton de Bohr, e g é o fator giromagnético para o elétron.

Na presença de um campo magnético H a interação deste elétron com o campo magnético será dada pela hamiltoniana:

$$H = \vec{\mu} \cdot \vec{H} = g\beta \vec{S} \cdot \vec{H} \quad (\text{III.2})$$

Esta hamiltoniana descreve o efeito Zeeman e a sua solução fornece as possíveis energias para o sistema.

Para o caso de um campo magnético H_0 aplicado na direção z têm-se:

$$H = g\beta H_0 S_z \quad (\text{III.3})$$

$$E = g\beta H_0 M_s \quad (\text{III.4})$$

onde M_s são as possíveis projeções do spin ao longo do eixo de quantização z . No caso de um elétron as projeções possíveis são $M_s = \pm 1/2$ e as energias de cada um dos estados serão:

$$E = \pm \frac{1}{2} g\beta H_0 \quad (\text{III.5})$$

A transição entre os dois níveis ocorrerá quando uma energia $\Delta E = g\beta H_0$ for fornecida ao sistema. Quando a condição de ressonância é satisfeita, o momento magnético transiciona de uma posição paralela ao campo magnético H_0 para uma posição antiparalela a este. A energia ΔE normalmente é fornecida ao sistema através da exposição a um campo de microondas de frequência fixa perpendicular ao campo H_0 que é adiabaticamente variado, até que ocorra a transição.

III.2 - INTERAÇÕES

III.2.1 - Interação Spin-Órbita

Este efeito surge da interação entre o momento magnético orbital μ_L e o momento magnético de spin μ_s do elétron e pode ser descrito pela hamiltoniana:

$$H = \lambda \vec{L} \cdot \vec{S} \quad (\text{III.6})$$

Quando a hamiltoniana spin-órbita atua no estado fundamental ($3d^n$)^{**} (com S e L definidos) μ_L e μ_S são acoplados para formar um novo estado fundamental caracterizado pelo momento angular total $J = L + S$. Este nível será $(2J + 1)$ vezes degenerado, e será desdobrado pela interação Zeeman dada pela expressão:

$$H = \beta(\vec{L} + g_e \vec{S}) \cdot \vec{H} \quad (\text{III.7})$$

que difere da equação (III.2) por levar em conta o momento magnético orbital βL .

Os valores de energia correspondentes a (III.7) serão:

$$E = g_L \beta H M_J \quad (\text{III.8})$$

com $M_J = -J, -J + 1, \dots, +J$ e g é o fator de Landé.

III.2.2 - Efeito do campo cristalino - Interação Fina

Os elétrons em um átomo ou íon livre encontram-se sujeitos a um campo elétrico central, com interações descritas pela hamiltoniana:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m} \sum_k \nabla_k^2 + V \quad (\text{III.9})$$

onde V é o potencial elétrico que inclui a atração entre os elétrons e o núcleo e a repulsão entre os elétrons.

Quando o íon está ligado, a presença dos ligantes na vizinhanças próxima ao íon livre cria sobre os elétrons um potencial eletrostático adicional e V da equação (III.9) tem duas

^{**}Este estado é característico dos íons de transição do grupo do ferro.

contribuições:

$$V = V_{\text{ion}} + V_L$$

onde V_{ion} é o potencial esférico e V_L é o potencial dos ligantes

Para os casos em que o potencial dos ligantes (V_L) é maior que a interação spin-órbita (por exemplo para os íons dos metais de transição do grupo do ferro) o campo elétrico que atua sobre os elétrons perde a simetria esférica do íon livre; o nível fundamental a ser desdobrado por H não é mais caracterizado por J e o fator giromagnético medido não é o previsto pela equação (III.7). A presença do campo cristalino é responsável também pelo "quenching" do momento angular orbital que é de ocorrência comum entre íons do grupo de transição do ferro, e devido a isso os valores de g encontrados para esses íons, são normalmente próximos de 2 já que a contribuição relevante vem somente do momento angular de spin.

Assim para $V_L > \lambda L.S$ o potencial será uma perturbação ao nível fundamental $3d^n$. Pelo método de campo cristalino os ligantes são substituídos por cargas pontuais negativas, e seu efeito computado em cada um dos orbitais que compõem $3d^n$. Para tanto suponha os ligantes dispostos nos vértices de um octaedro como mostra a figura III.1 (a) e o íon metálico no centro deste octaedro. Os orbitais t_{2g} (d_{xy} , d_{yz} , d_{zx}) e e_g ($d_{x^2-y^2}$ e d_z^2) interagem com os ligantes como mostrado na figura III.1 (b). Devido à simetria dos orbitais, os elétrons nos orbitais e_g sofrem maior repulsão, uma vez que as cargas apontam diretamente para seus vértices, e sua energia é incrementada. O desdobramento $3d^n$ é mostrado na figura III.1 (c) para a simetria octaédrica, e octaédrica com distorções tetragonal e rômbrica. Nestes níveis os n elétrons do metal são distribuídos.

Para os casos em que o spin eletrônico é maior que 1/2 a contribuição do potencial

Figura III.1- (a) Simetria Octaédrica dos ligantes. (b) Parte real do orbital. (c) Desdobramento dos níveis de energia a várias geometrias.

criado pelos ligantes é introduzida acrescentando um termo adicional na hamiltoniana das interações. Este termo, chamado interação fina, está relacionado aos desdobramentos dos níveis em campo magnético zero. É expresso por:

$$H_f = D(S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)) + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (\text{III.10})$$

onde D e E são os parâmetros de desdobramento de campo zero associados ao campo eletrostático ao redor do íon.

III.2.3 - Interação Hiperfina

Por interação hiperfina entende-se a interação do elétron paramagnético com o momento magnético dos núcleos vizinhos, provocando a separação das linhas no espectro de RPE.

O número de linhas é dado por $(2I + 1)$ onde I é o spin nuclear da espécie considerada. Para $I = 1/2$ (próton), cada núcleo dá duas linhas hiperfinas como mostrado na figura III.2.

O desdobramento hiperfino dos níveis de energia é dado por $A/2$, onde A é conhecido como constante de desdobramento hiperfino. Assim a equação para a diferença de energia, quando é considerada a estrutura hiperfina resulta em:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \pm \frac{1}{2}Am_I \quad (\text{III.11})$$

onde m_I são os vários valores possíveis de I_z .

Essencialmente há dois tipos distintos de interação hiperfina que são a interação dipolar ou anisotrópica e a interação isotrópica que também é conhecida como de contato ou de Fermi.

No primeiro caso ocorre uma interação clássica de dois dipolos μ_s e μ_I separados por

Figura III.2- Interação hiperfina para transições com frequências constantes. A é a constante de separação hiperfina

uma distância r . Esta interação depende do ângulo entre a linha que liga os dois dipolos e o campo magnético externo.

Devido a sua natureza direcional, desempenha um importante papel na determinação de espécies paramagnéticas em sólidos e experimentos com "spin label". A hamiltoniana que representa esta interação é descrita pela equação:

$$H_{HF} = \frac{\vec{\mu}_s \cdot \vec{\mu}_I}{r^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_s \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_I \cdot \vec{r})}{r^5} \quad (\text{III.12})$$

onde μ_s é o momento magnético devido ao spin eletrônico, μ_I é o momento magnético devido ao spin nuclear, e r é o vetor que une os dois dipolos.

A segunda é um tipo de interação não clássica e se origina da probabilidade finita de encontrar o elétron na posição do núcleo. Esta propriedade é encontrada apenas para elétrons no orbital s. Os elétrons nos orbitais p, d, f... têm um nó no núcleo.

$$H = \left(\frac{8\pi}{3}\right)\vec{\mu}_s \cdot \vec{\mu}_I[\Psi_{(0)}]^2 \quad (\text{III.12a})$$

Assim, os elétrons no orbital s exibirão uma interação hiperfina isotrópica, enquanto os elétrons nos orbitais p, d, f... exibirão somente interação hiperfina anisotrópica.

Para o caso de radicais livres em solução de baixa viscosidade, todas as posições são igualmente prováveis, devido a rapidez do movimento molecular. Assim, mesmo que haja interação anisotrópica só a interação isotrópica será observada.

III.3 - ABSORÇÃO DE ENERGIA, RELAXAÇÃO SPIN-REDE, SATURAÇÃO

Pela teoria da probabilidade a transição entre os níveis de spins somente ocorre na presença de um campo eletromagnético. Como este é oscilante, pode produzir tanto transições do estado inferior para o superior (absorção de energia), como do superior para o inferior (emissão de energia). No equilíbrio térmico, o número de spins no estado fundamental é maior que do estado excitado, porque é energeticamente mais favorável para o spin ficar no estado de menor energia. Para ocorrer a absorção de energia é necessário uma diferença de população entre os dois níveis, sendo os elétrons distribuídos de acordo com a distribuição de Boltzmann. Assim, se N^+ é o número de elétrons no nível excitado com energia E^+ e N^- é o número de elétrons no nível inferior com energia E^- , então:

$$\frac{N^+}{N^-} = e^{-\left[\frac{g\beta H}{kT}\right]} \quad (\text{III.13})$$

mas $g\beta H$ é muito menor que kT , então a exponencial pode ser expandida:

$$\frac{N^+}{N^-} \approx 1 - \frac{g\beta H}{kT} = 1 - \frac{h\nu}{kT} \quad (\text{III.14})$$

À temperatura ambiente e para uma frequência de 10^{10}Hz , $N^+/N^- = 0.9984$, sendo portanto, que apenas uma pequena fração de elétrons contribuem para a absorção.

Parece então que as microondas atuariam de tal forma que as populações dos dois níveis de energia seriam igualadas, mas isso não ocorre devido os spins estarem em contato com a rede que se comporta como um reservatório de calor que tende a manter a diferença de população correspondente ao equilíbrio térmico.

A absorção de microonda pelo conjunto de spins pode ser encarada como uma competição entre o campo de microondas tentando igualar as populações e a rede tentando restaurar o equilíbrio térmico.

De forma quantitativa, pode-se escrever a diferença entre as populações como:

$$n = N^- - N^+ \quad (\text{III.15})$$

A taxa de variação de n é governada pelo campo de microondas e pela rede:

$$\frac{dn}{dt} = \left(\frac{dn}{dt}\right)_{\text{microondas}} + \left(\frac{dn}{dt}\right)_{\text{rede}} \quad (\text{III.16})$$

Se $P(N^+ \rightarrow N^-)$ é a probabilidade de transição por unidade de tempo (induzida pelo campo de microondas), do estado superior ao inferior, pode-se mostrar que $P(N^+ \rightarrow N^-) = P(N^- \rightarrow N^+) = P$. Então:

$$\left(\frac{dn}{dt}\right)_{\text{mic.}} = \frac{dN^-}{dt} - \frac{dN^+}{dt} = -2Pn \quad (\text{III.17})$$

A taxa na qual a rede restaura a diferença de população a seu valor de equilíbrio n_0

(ausência de microondas) é governada pelo acoplamento dos spins com a rede. Este acoplamento é descrito por um tempo característico - tempo T_1 - de relaxação spin-rede.

Assim tem-se:

$$\frac{dn}{dt}_{rede} = (n_0 - n) \frac{1}{T_1} \quad (\text{III.18})$$

e a taxa de variação total será

$$\frac{dn}{dt} = -2Pn + (n_0 - n) \frac{1}{T_1} \quad (\text{III.19})$$

No estado de equilíbrio com microondas $dn/dt = 0$. Então

$$n = n_0 \frac{1}{1 + 2PT_1} \quad (\text{III.20})$$

A equação acima mostra que para $P \gg (1/T_1)$, isto é, a situação da qual a rede não consegue mais ser eficiente com relação às transições induzidas pelas microondas, a diferença de população n tende a zero. Em RPE esta condição é chamada saturação, podendo ser evitada reduzindo-se a potência de microondas incidente.

É necessário aqui introduzir o conceito de temperatura de spin. A temperatura de spin de um sistema é definida pelo fator de Boltzmann, ou seja, pela razão das populações dos níveis de spin.

No caso da saturação completa, por exemplo, as populações se igualam, isto é

$$\frac{N^+}{N^-} = 1 = e^{\frac{g\beta H}{kT_s}} \quad (\text{III.21})$$

Esta condição é satisfeita quando o expoente $g\beta H/kT_s$ é nulo, isto é, quando se tem uma temperatura de spin infinita.

III.4 - METAIS DE TRANSIÇÃO

Os metais de transição são os elementos que possuem os subníveis 3d, 4d e 5d incompletos. Entre eles somente o V, Mn, Fe, Co, Cu e Mo são encontrados em quantidade suficiente em sistemas biológicos. O espectro de RPE destes íons apresenta as seguintes características:

- O acoplamento spin-orbita é normalmente forte e apresenta grande anisotropia;
- Depende fortemente da vizinhança do íon;
- Frequentemente é necessário baixas temperaturas (77K) para observar a ressonância;
- Para íons com número par de elétrons desparelhados é geralmente impossível observar o espectro.

III.4.1 - ÍON V^{4+}

Inicialmente será discutido o íon V^{4+} devido ao fato de possuir apenas um elétron no orbital d. Para o íon V^{4+} gasoso há cinco orbitais d que, em primeira aproximação, têm a mesma energia. Em um sólido ou líquido, entretanto, o íon usualmente é cercado por um número de ligantes que podem ser tanto negativamente carregados como negativamente polarizados. Pode-se encontrar dois arranjos básicos para os ligantes: o caso mais comum tem os seis ligantes na estereoquímica octaédrica e uma forma menos comum que tem os quatro ligantes nos vértices de um tetraedro. Esses ligantes têm o efeito de separar o orbital d em um conjunto de dois e em um conjunto de três níveis, separados por uma energia Δ (figura III.1 (b)). Entretanto o V^{4+} é normalmente encontrado como o íon Vanadil VO^{2+} com mais cinco ligantes fracos. A presença do íon O^{2-} resulta em uma forte distorção do octaedro tal que toda degenerescência é removida (a última distorção de um octaedro é uma

configuração quadrado planar).

Embora o momento angular orbital do elétron é usualmente "quenched" no estado fundamental, os estados excitados podem se misturar com o estado de menor energia, desde que algum momento angular orbital é introduzido. Isto cria um campo magnético local dependente que afeta o fator g . Assim encontra-se para o íon de transição o fator g como sendo:

$$g = g_e - k \frac{\lambda}{\Delta} \quad (\text{III.22})$$

onde g_e é o fator g para o elétron livre; λ é a constante de acoplamento spin-orbita para o íon livre, Δ é a separação devido ao campo cristalino e k é uma constante que depende da coordenação do ligante. Para os íons em que o subnível d está menos do que a metade preenchido $\lambda > 0$, então $g < g_e$; no caso em que o subnível d está mais do que a metade preenchido $g > g_e$. Como o íon V^{4+} encontra-se no primeiro tipo, então o fator g é ligeiramente menor de que g_e .

O espectro do V^{4+} , como mostrado na figura III.4, tem uma separação hiperfina de oito linhas devido ao núcleo do ^{51}V com $I = 7/2$

III.4.2 - ÍONS DE Mn^{2+} e Fe^{3+}

Os íons Mn^{2+} e Fe^{3+} são isoeletrônicos, tendo cada um deles cinco elétrons d . Se a separação devido ao campo cristalino não for muito grande, os íons estarão no estado de "alto spin" com cinco elétrons desemparelhados. Para um Δ grande, ocorrerá a situação de "baixo spin" com um elétron desemparelhado.

No caso de "alto spin" todo o momento angular orbital é cancelado porque há um elétron em cada orbital d . Assim para uma simetria octaédrica pura o fator g é

Figura III.3- Espectros do Vanádio .(a) isotrópico e (b) anisotrópico.

aproximadamente igual ao do elétron livre. Entretanto há uma separação fina que é causada pela interação dipolar entre os cinco elétrons desemparelhados.

O Mn^{2+} e o Fe^{3+} são normalmente encontrados na forma octaédrica distorcida. Isto resulta que a degenerescência dos cinco elétrons desemparelhados ($S = 5/2$) é separada em três estados com degenerescência igual a dois. Neste caso o hamiltoniano é dado por:

$$H = \beta(g_x S_x H_x + g_y S_y H_y + g_z S_z H_z) + D \left[S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) \right] + E(S_x^2 - S_y^2) \quad (III.23)$$

o primeiro termo é devido ao efeito Zeeman e os termos contendo D e E são devido a interação fina ou de campo magnético zero e estão associadas ao campo eletrostático ao redor do íon. D e E são associados a desdobramentos axial e rômico respectivamente.

O hamiltoniano de spin (equação III.23) pode ser escrito, de outra maneira, em termos de um fator g efetivo (g_{ef}), onde está contido as contribuições de D e E também, com a

seguinte forma:

$$H = g_{ef} \beta \vec{s} \cdot \vec{H} \quad (\text{III.24})$$

Os valores de g_{ef} serão aqueles medidos diretamente no espectro de RPE.

O íon Fe^{3+} livre apresenta como termo fundamental ${}^6S_{5/2}$ e quando submetido a um campo magnético desdobra os três dubletos de Kramers ($\pm 5/2$, $\pm 3/2$, $\pm 1/2$) como mostra a figura III.4.

Figura III.4 - Níveis de energia de um íon com $S=5/2$. (a) Campo magnético externo. (b) campo cristalino com $H_0 \parallel z$. (c) Campo cristalino com $H_0 \perp z$.

Quando o sistema está sujeito a um campo cristalino axial ($E=0$) fraco, criado pelos ligantes, os três dubletos desdobram-se em três níveis com diferentes energias em campo magnético zero. A figura mostra os casos de aplicação de um campo magnético paralelo e perpendicular, respectivamente ao eixo z do sistema. Os diferentes desdobramentos podem ser entendidos considerando que o eixo de quantização (z) para o sistema não depende do

Figura III.5 - Espectro de absorção típico de centros aleatoriamente orientados. (a) linha contínua é a curva teórica e a pontilhada é o sinal observado experimentalmente, mostrando o alargamento da linha. (b) representação da derivada da linha de absorção.

campo magnético externo mas sim do campo cristalino criado pelos ligantes, ou seja $D \gg g\beta H$.

O espectro típico de RPE para o íon Fe(III) , em uma solução congelada, sujeito a um campo cristalino axial fraco ($S=5/2$), é mostrado na figura III.5, onde observam-se duas linhas de absorção, uma em campo baixo, $g \sim 6$, e outra em campo alto $g \sim 2$.

Nas considerações feitas até agora, E da equação (III.23) foi desprezado. Esse termo origina-se devido a uma distorção rômbrica do campo cristalino que circunda o íon. Isso leva a uma quebra de simetria fazendo com que as direções x e y não sejam mais magneticamente

Figura III.6 - Valores de g efetivo em função de $\lambda = E/D$.

equivalentes.

Convenientemente define-se o parâmetro $\lambda = E/D$, e a variação dos valores fisicamente distintos restrito a $\lambda < 1/3$. Na figura III.6 é mostrado a variação do fator g efetivo em função do parâmetro λ para os três doubletos de Kramers, proposto por Wickman.

Observa-se na figura III.6 que:

- para $E=0$, $\lambda=0$, a simetria é axial e para o dubleto de menor energia tem-se as transições em $g_{\text{ef}}=2$ ($g_x = g_{\parallel}$) e $g_{\text{ef}}=6$ (g_x e $g_y = g_{\perp}$)
- para E grande, ou seja, $\lambda = 1/3$ tem-se para o dubleto do meio ($\pm 3/2$) uma única transição em $g_{\text{ef}} = 4,3$ (g_x , g_y e g_z)
- para valores intermediários de λ ($0 - 1/3$) uma série de transições podem ser observada.

Os fatores g_x e g_y são dados pela seguintes relações:

$$\begin{aligned} g_x &= 6 - 24 \frac{E}{D} \\ g_y &= 6 + 24 \frac{E}{D} \end{aligned} \quad (\text{III.25})$$

Dos fatores g no plano (x,y) , a relação E/D pode ser calculada dando:

$$\frac{E}{D} = \frac{|g_x - g_y|}{48} \quad (\text{III.26})$$

Assim como $E/D < 0,33$, o grau de distorção rômica, ou rombicidade, do sistema pode ser definido como:

$$\% \text{ Rombicidade} = \frac{|g_x - g_y|}{16} \cdot 100\% \quad (\text{III.27})$$

Uma situação diferente ocorre para o íon Fe(III) , quando este se encontra sujeito a um campo cristalino intenso porque, nesse caso, o estado de spin é $1/2$. Não há separação de campo magnético zero e o hamiltoniano de spin é dado por:

$$H = \beta \vec{s} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H} \quad (\text{III.28})$$

O valor médio de g novamente é próximo de 2.

Os desvios acentuados dos fatores g do valor 2,0023, do elétron livre, são devido a contribuição relevante do momento angular orbital para o momento magnético total. Observa-se também que a simetria em torno do íon Fe(III) é rômica (três valores distintos de g).

O íon Mn^{2+} comporta-se de maneira análoga ao Fe^{3+} exceto que toda linha é separada em seis componentes devido a interação hiperfina com o núcleo de ^{55}M ($I = 5/2$).

III.4.3 - ÍON DE Cu^{2+}

O íon Cobre (II) é um íon de metal de transição típico com respeito a formação de coordenação de complexos, mas menos típico na tendência para apresentar uma estereoquímica regular octaédrica ou tetraédrica. A configuração eletrônica exterior $3d^9$ quebra a simetria cúbica e portanto produz formas distorcidas de estereoquímica básica.

A configuração d^9 teoricamente é um sistema simples, pois pode ser tratado como um buraco positivo na configuração completa d^{10} .

O modo como o buraco positivo comporta-se em diferentes estereoquímicas pode ser entendido qualitativamente usando teoria de campo cristalino para prever a ordenação dos níveis orbitais de um elétron.

Neste caso o buraco do Cu^{2+} só tem um momento angular associado com o spin eletrônico, $S = 1/2$, e portanto o valor do fator g é aproximadamente igual ao do elétron livre ($g_e = 2,0023$). Entretanto o íon de Cu^{2+} pode ficar algum tempo no nível de maior energia, perturbando assim o valor do fator g . (equação (III.22)).

Para uma simetria octaédrica o fator g será isotrópico, enquanto para uma simetria tetragonal este será anisotrópico.

Em uma solução congelada (ou em amostra policristalina à temperatura ambiente ou não) a distribuição do complexo paramagnético é aleatória, todas as orientações do tensor g e A com relação ao campo magnético externo são possíveis, e tem o mesmo peso estatístico. Para cada orientação a posição de ressonância é dada pelo fator g e desdobramento A compatíveis com a orientação, e o espectro de pó é a soma de todos os espectros observados.

Na figura III.7 é mostrado um espectro típico do íon Cu^{2+} em uma solução congelada. O método de medir os parâmetros é indicado na figura e tem-se que a distância entre os picos de absorção em campo baixo correspondem à constante de desdobramento

Figura III.7 - Espectro típico do íon Cu(II) em uma solução congelada.

hiperfino ($A_{\parallel}$) com o campo magnético paralelo ao eixo de simetria do complexo. O valor $g_{\parallel}$ é encontrado medindo-se o centro de gravidade destas linhas. A medida de $g_{\perp}$ também é mostrada e $A_{\perp}$ corresponde a distância entre os picos de absorção em campo alto, mas raramente é "resolvido" experimentalmente para os complexos de cobre.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas amostras de latossolo roxo distrófico obtidas dos campos experimentais do IAPAR, situado em Londrina - PR. Foram caracterizadas amostras de ácido húmico provenientes de uma região com 11 anos de cultivo, submetidos a diferentes manejos e rotação de culturas, e área de floresta nativa.

A separação das frações húmicas foi realizada de acordo com a metodologia de Kononova⁽²⁾, que é baseada na solubilidade.

Como as substâncias húmicas, uma vez estabilizadas, se diferenciam pela quantidade de elementos químicos presentes na molécula, foi feita a Análise Elementar do ácido húmico, com o objetivo de conhecer e quantificar os elementos químicos que formam a molécula polimérica.

Já é conhecido que o manejo inadequado do solo pode causar mudanças quantitativas e qualitativas na matéria orgânica. Uma das formas de avaliação destas mudanças é através do grau de humificação das substâncias húmicas.

Um dos métodos propostos na literatura é utilizar a técnica de absorção eletrônica para medir a razão E_4/E_6 (Absorbância em 465nm / Absorbância em 665nm). Esta medida por ser independente da concentração de ácido húmico e variar com materiais extraídos de diferentes solos é um indicativo simples do grau de humificação.

Através da técnica de RPE foi possível quantificar os radicais livres semiquinona e consequentemente determinar o grau de humificação em cada amostra de ácido húmico. Para

isto utilizou-se o método do padrão secundário descrito por Singer, 1959⁽²⁰⁾.

Entretanto para algumas amostras não foi possível obter o sinal dos radicais livres devido a interação com íons metálicos residuais presentes no ácido húmico.

Como a formação dos complexos dos íons micronutrientes com as substâncias húmicas é um dos aspectos de interesse agropecuário, foi dedicada uma parte do trabalho a caracterização dos metais complexados com ácido húmico.

É apresentado também um estudo dos efeitos do Carbonato de Cálcio quando colocado no solo, pois em trabalho recentemente realizado no IAPAR⁽²¹⁾ constatou-se que em latossolo roxo submetido à calagem ocorre redução no conteúdo da matéria orgânica e decréscimo na razão AH/AF. Esse resultado é muito preocupante dada à necessidade de grande utilização do calcário em solos brasileiros.

IV.1 - AMOSTRAS

Para investigar quais os efeitos que o Carbonato de Cálcio faz sobre o ácido húmico, foi usado turfa da região de Ribeirão Preto.

As amostras de ácido húmico analisadas são provenientes da Estação Experimental do IAPAR, situada em Londrina-PR. Possuem as seguintes características:

1. Solo - Latossolo roxo distrófico.
2. Culturas - Rotação anual de soja-trigo e milho-trigo.
3. Manejos do solo - Áreas com plantio direto, manejo convencional e áreas com florestas de vegetação nativa (chamada de "testemunha").
4. Profundidade - 0-5cm, 5-10cm e 10-20cm.
5. Período de cultivo- Onze anos.

As características de cada amostra estudada estão dadas na tabela IV.1 .

Tabela IV.1 - Características das amostras usadas.

Nº da Amostra	Profundidade(cm)	Manejo	Culturas
1	0-5	Convencional	rotação soja-trigo
2	5-10	Convencional	rotação soja-trigo
3	10-20	Convencional	rotação soja-trigo
4	0-5	Convencional	rotação milho-trigo
5	5-10	Convencional	rotação milho-trigo
6	10-20	Convencional	rotação milho-trigo
7	0-5	Plantio Direto	rotação soja-trigo
8	5-10	Plantio Direto	rotação soja-trigo
9	10-20	Plantio Direto	rotação soja-trigo
10	0-5	Plantio Direto	rotação milho-trigo
11	5-10	Plantio Direto	rotação milho-trigo
12	10-20	Plantio Direto	rotação milho-trigo
13	0-5	Mata Virgem	
14	5-10	Mata Virgem	
15	10-20	Mata Virgem	

IV.2- EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO HÚMICO

A extração e purificação do ácido húmico foram realizadas segundo a metodologia de Kononova⁽²⁾ no laboratório de Radioquímica e Química Ambiental do IFQSC-USP. Para isto utilizou-se o mesmo procedimento descrito na literatura⁽³⁴⁾.

O solo foi seco ao ar, desagregado em almofariz e passado em peneira de malha 60-As. Foi lavado diversas vezes com solução de HCl 0,5N a temperatura ambiente, para decompor carbonatos e remover metais, Calderoni e Schnitzer⁽²²⁾. O sobrenadante ácido foi removido por centrifugação e em seguida o solo foi lavado com água destilada para neutralizar o pH.

A extração foi feita conforme o esquema mostrado na figura IV.1, usando-se uma solução de Hidróxido de Sódio 0,5N em atmosfera de nitrogênio, para evitar a oxidação à temperatura ambiente.

O sobrenadante alcalino foi separado do resíduo e centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos, para eliminar a argila. O extrato foi acidificado a pH 2 com solução de ácido clorídrico 6N e deixado em repouso durante 24 horas. O sobrenadante, ácido fúlvico, foi separado do material insolúvel, ácido húmico, por sifonação e centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos.

Como a quantidade de ácido fúlvico extraído foi muito pequena, não foi possível purificá-lo.

O precipitado de ácido húmico foi lavado com 1 litro de solução de ácido clorídrico e fluorídrico a pH 2 durante 13 horas, com leves agitações para degradação da argila. O resíduo foi lavado com água destilada para remover íons cloretos e fluoretos, até se verificar no filtrado a ausência de íons Cl^- , testando-se com AgNO_3 .

O ácido húmico foi redissolvido em solução diluída de NH_4OH . Esta solução foi

Figura IV.1- Esquema do processo de extração e purificação do ácido húmico e ácido fúlvico.

passada várias vezes por uma coluna com resina de troca iônica na forma ácida, para remover cátions metálicos.

Após a purificação em resina catiônica o material foi passado numa resina iônica na forma básica para garantir a completa remoção dos íons fluoretos.

O volume do extrato foi reduzido em rotavapor a temperatura de 40°C e liofilizado. O ácido húmico, liofilizado, foi seco e dissecado a vácuo com pentóxido de fósforo.

IV.3 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO

A identificação e caracterização do ácido húmico, bem como as alterações qualitativas e quantitativas destes compostos foram efetuadas através do uso da técnica química de Análise Elementar e técnicas espectroscópicas: Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Absorção Eletrônica.

IV.3.1 - ANÁLISE ELEMENTAR

A composição elementar das substâncias húmicas é determinada com o objetivo de conhecer a quantidade dos elementos químicos que formam parte da molécula polimérica.

As substâncias húmicas, depois de estabilizadas são diferenciadas pela quantidade de elementos químicos presentes na molécula.

A partir da composição elementar é possível calcular a relação entre as concentrações de C e de N em % (C/N), que indica o grau de incorporação de N na estrutura húmica. Pode-se calcular as razões entre os números de átomos de H e de C, dividindo-se o percentual obtido pela massa atômica, ou seja, dividindo a porcentagem de C por 12, de O por 16 e de H por 1. Pelas razões atômicas O:C e H:C, determinamos o grau de oxidação e o índice de aromaticidade, para os ácidos húmicos.

No nosso trabalho, a análise elementar das amostras foi realizada no Instituto de Química da USP (São Paulo). Através dela foram detectadas a porcentagem de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio das substâncias húmicas. A porcentagem de Oxigênio foi obtida pela diferença de 100%, descontado o teor de cinzas que nessas amostras estava relativamente alto.

IV.3.2 - MEDIDAS DE RPE EM RADICAIS LIVRES

Substâncias húmicas são conhecidas por serem ricas em radicais livres estáveis^{4,39,40}. As reações químicas das substâncias húmicas no solo não podem ser somente atribuídas aos grupos funcionais, mas também ao conteúdo relativamente alto de radicais livres estáveis. Parece provável que os radicais livres desempenham importante papel nas reações de polimerização e depolimerização das substâncias húmicas, e em reações com moléculas tais como inseticidas e outros poluentes.

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) dos ácidos húmico e fúlvico consistem geralmente de uma única linha simétrica desprovida de qualquer desdobramento hiperfino, o que indica radicais de estrutura complexa⁴. O valor do desdobramento espectroscópico (g) varia de 2,0031 a 2,0045, sendo a largura da linha de 2,0 a 3,6 Gs ou (2,0 a 3,6)x10⁻⁴ T.

Rex³⁹ acredita que os radicais livres são semiquinonas formadas pela dehidrogenação ou remoção oxidativa de hidrogênio de grupos -OH, -NH₂ e -SH de anéis aromáticos (equação (1))

Steelink e Tollin⁴⁰ sugerem que hidroxiquinonas e outras estruturas, ainda não o suficientemente estudadas, podem ser as fontes de radicais livres nas substâncias húmicas. Espécies químicas como as mostradas na figura IV.2 podem existir no ácido húmico através da interação entre OH e quinóides mono e biradicalares⁴⁴.

Figura IV.2 - Estruturas provenientes das interações entre hidroxiquinonas.

Senesi e Schnitzer⁴¹, estudaram os efeitos causados por variações de pH, redução química e irradiação sobre parâmetros de RPE para obter informações sobre os radicais livres. Dois tipos de radicais livres foram detectados no ácido fúlvico:

- a) Um permanente, com vida longa
- b) Um transitório, com vida curta, gerado em grande concentração, na seguinte ordem decrescente de tratamento: redução química > irradiação > variações de pH. O valor do fator de desdobramento espectroscópico (g) foi o mesmo para os dois tipos de radicais, indicando estruturas similares. O valor assumido por g parece indicar que os radicais livres são semiquinonas substituídas, que em solução alcalina se estabilizam como ânion de semiquinona⁴².

Senesi e colaboradores⁴³ encontraram que soluções aquosas de ácido fúlvico, tratadas à temperatura ambiente com H_2O_2 diluído, a pH 7, e com Ag_2O , a pH 13, produzem espectros de 3 linhas, com constante de acoplamento de 1,45Gs. As três linhas igualmente espaçadas do triplete indicam interações do elétron desemparelhado com dois protons equivalentes. Após duas horas de oxidação, o sinal começou a decair. Quando mais oxidante foi adicionado, o triplete bem resolvido reapareceu. De forma que os autores propuseram um mecanismo de duas etapas para a oxidação de um elétron, conforme mostrado na equação (2).

Onde R_1 e R_2 podem ser CO_2H , grupo alquil ou grupo mais complexo contendo carbono.

De fato os sinais de RPE de ácidos húmico e fúlvico são difíceis de resolver, provavelmente porque mais de um tipo de radical esteja presente, e seus sinais se superpõem.

Substâncias húmicas podem desempenhar o papel de doadores ou aceptores de elétrons, via radical livre intermediário, participando desse modo de reações redox, com metais de transição e nos sistemas biológicos do solo. As reações de oxi-redução são reversíveis, ocorrem via semiquinonas e envolvem principalmente os radicais livres do tipo transitório. Estes radicais não têm tempo de vida suficiente para serem detectados em condições oxidativas, mas podem ser detectados nos meios redutivos e após irradiações.

Figura IV.3- Reações de oxi-redução via semiquinonas.

As reações podem ser resumidas sob qualquer condição de pH pelo esquema mostrado na figura IV.3.

As descobertas feitas por Senesi e colaboradores⁴³ contribuíram com o desenvolvimento da ciência dos solos, mas, muitos pontos obscuros devem ser ainda elucidados para que se possa compreender melhor os mecanismos de formação dos húmus, bem como, a sua participação nos processos fisiológicos, tecnológicos, bioquímicos e geoquímicos.

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Varian da linha E-Century E-109 que trabalha em banda X (9GHz) utilizando uma cavidade retangular (multi - purpose cavity E-231) e 100KHz de frequência de modulação.

As amostras foram colocadas em tubos de quartzo de 3mm de diâmetro interno. Na parte inferior da cavidade foi preso um rubi que serviu como padrão secundário durante as medidas, conforme mostra a figura IV.4.

A sensibilidade do espectrômetro aumenta consideravelmente com o aumento da potência de microondas. Entretanto, essa potência não pode ser aumentada muito

Figura IV.4 - Esquema da cavidade de microonda.

devido à saturação das linhas de RPE.

Assim foi feita a curva de saturação de potência de microondas para o sinal de RPE para todas as amostras de AH utilizadas. O ponto onde a intensidade do sinal ainda está aumentando e não atingiu a saturação é para 0,2mW para a fonte de microondas utilizada.

Sendo assim, todas as medidas de radicais livres foram realizadas nas seguintes condições: Potência = 0,2mW, $H_0 = 3400\text{G}$, $\Delta H = 100\text{G}$ e $\nu \approx 9,51\text{GHz}$.

A amplitude de modulação igual a 1 Gauss pico a pico foi determinado de forma tal que o sinal fosse o mais intenso possível sem ocasionar alargamento de linha.

IV.3.2.1-DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE SPINS

Para determinar o número de spins, usamos o método do padrão secundário, descrito por Singer⁽²⁰⁾. Existem outros métodos para se determinar o número de spins como o de se substituir a amostra por uma outra com o número de spins conhecido e o de se colocar ao mesmo tempo a amostra desconhecida e a padrão dentro da cavidade. O método que utiliza a substituição tem a desvantagem de poder ocorrer alterações na sensibilidade do sistema, principalmente no fator de qualidade Q da cavidade e no acoplamento, devido as diferenças nas propriedades dielétricas entre a amostra desconhecida e o padrão. O segundo método elimina este problema mas é muito difícil encontrar um padrão que tenha ressonância tal que não interfira no sinal de ressonância a ser medido, pois a maioria dos materiais têm absorção de RPE num campo magnético que corresponde a $g \approx 2$ e esta interferência frequentemente é problemática. Outro problema que surge é que a maioria dos materiais paramagnéticos utilizados como padrão não ficam estáveis quimicamente durante longos períodos de tempo.

O método descrito por Singer utiliza como padrão secundário o Rubi sintético (Al_2O_3 , contendo cerca de 5% de Cr^{3+} por peso), que é quimicamente estável, e apesar de ficar fixo na cavidade não interfere nas ressonâncias em torno de $g = 2$.

Em banda X, o espectro do rubi consiste de um pico intenso de absorção em aproximadamente 5KGauss e 3 picos de absorção superpostos em aproximadamente 2KGauss (com eixo z paralelo a H). Inicialmente o padrão é calibrado em relação a outro padrão com número de spins conhecido que é medido na mesma posição da cavidade na qual ficará a amostra desconhecida. No nosso caso, foi usado um pitch KCl Varian com 10^{13} spins/cm.

Quando se realiza este tipo de medida deve-se levar em conta a forma, a largura e a intensidade das linhas.

Nas figura IV.5 encontramos as curvas de absorção e sua derivada primeira. Sendo

y' a derivada do sinal de RPE determinado experimentalmente, então a número de spins N será proporcional à área da curva, isto é:

$$N \approx \iint y' dx^2 \quad (\text{IV.1})$$

Figura IV.5-(a) Curva de absorção de RPE. (b) Derivada da curva de absorção.

A determinação gráfica do 1º momento da ressonância experimental é igual à integral dupla

$$\iint y' dx^2 = \int xy' dx \quad (\text{IV.2})$$

Halbach⁽²⁴⁾ propõe a aproximação de que o 1º momento é proporcional à amplitude de modulação H_m vezes o número de spins N :

$$\int xy' dx \propto H_m N \quad (\text{IV.3})$$

A expressão matemática da forma de uma raia de absorção tipo Lorentz, em função

da intensidade do campo magnético H é:

$$y(H) = \frac{y_m}{1 + \frac{(H-H_0)^2}{\left(\frac{1}{2}\Delta H_{1/2}\right)^2}} \quad (\text{IV.4})$$

onde y_m representa a amplitude máxima em $H=H_0$; $\Delta H_{1/2}$ é a largura de linha medida onde a amplitude é a metade da máxima

A 1ª derivada será:

$$y'(H) = \frac{16y_m' \left[\frac{H-H_0}{\frac{1}{2}\Delta H_{pp}} \right]}{\left[3 + \left(\frac{H-H_0}{\frac{1}{2}\Delta H_{1/2}} \right)^2 \right]^2} \quad (\text{IV.5})$$

onde ΔH_{pp} é a largura da linha medida pico a pico na 1ª derivada da curva de absorção

A expressão para a intensidade y'_m é a seguinte:

$$y'_m = \frac{3}{4}y_m(\Delta H_{pp})^{-1} \quad (\text{IV.6})$$

$$\Delta H_{1/2} = \sqrt{3}\Delta H_{pp}$$

Essas expressões estão normalizadas com relação à amplitude.

Da expressão (IV.3) vem

$$N = \frac{k'}{H_m} \int \int y'(x) dx^2 = \frac{k'}{H_m} \int x y'(x) dx \quad (\text{IV.7})$$

onde k' é uma constante de proporcionalidade

Mas $x = H - H_0$, então

$$N = \frac{k'}{H_m} \int (H - H_0) y' dH \quad (\text{IV.8})$$

Substituindo $(H - H_0)$ pelo correspondente na equação (IV.4), e resolvendo a integral, obtemos

$$N = \frac{k' y'_m}{H_m G_m} \Delta H_{pp}^2 \quad (\text{IV.9})$$

onde y'_m é a intensidade da 1ª derivada, H_m é a amplitude de modulação e ΔH_{pp} a largura de linha e G_m é o ganho.

Considerando que N é o número de spins da amostra e N^* o número de spins do padrão e dividindo N por N^* , obtêm-se

$$\frac{N}{N^*} = \frac{k'}{k'^*} \frac{y'_m}{y'^*_m} \frac{\Delta H_{pp}^2}{\Delta H_{pp}^{*2}} \frac{H_m^*}{H_m} \frac{G_m^*}{G_m} \quad (\text{IV.10})$$

Vamos chamar de

$$k = \frac{k'}{k'^*} \frac{N^*}{\Delta H_{pp}^{*2}} \quad (\text{IV.11})$$

Então ficamos com um número de spins

$$N = k \frac{y'_m}{y'^*_m} (\Delta H_{pp})^2 \frac{H_m^*}{H_m} \frac{G_m^*}{G_m} \quad (\text{IV.12})$$

A constante de proporcionalidade k será determinada medindo-se o espectro de RPE do padrão secundário junto com o padrão que tenha o número de spins conhecido.

IV.3.3 - MEDIDAS DE RPE EM METAIS DE TRANSIÇÃO

Para detectar os íons metálicos que naturalmente encontram-se complexados no AH, as medidas foram realizadas a temperatura de nitrogênio líquido com um campo central H_0 igual a 3300G e uma varredura de 2000G. A amplitude de modulação usada foi de 5,0Gauss pico a pico.

Medindo-se os parâmetros espectroscópicos, pudemos identificar em nossas amostras os íons Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} e V^{+4} , complexados com os ácidos húmicos.

IV.3.4 - MEDIDAS COM CARBONATO DE CÁLCIO

Para observar o efeito da calagem nos solos brasileiros, diluímos 100mg de turfa em 3ml de água destilada, separamos esta solução em duas alíquotas de 1,5ml cada, sendo que uma delas ficou como amostra testemunha e na outra misturamos 5,3mg de CaCO_3 cujo peso molecular é 100.09. Para realizar a medida de RPE utilizamos uma cubeta de quartzo plana, já que a nossa amostra estava diluída. O campo central utilizado, H_0 , foi igual a 3370 G com uma varredura de 100 G, amplitude de modulação de 1 Gauss pico à pico e potência de microondas igual a 0,2mW.

IV.4 - MEDIDAS DA RAZÃO E_s/E_g POR ABSORÇÃO ELETRÔNICA

A absorção de energia radiante por compostos orgânicos na região do ultravioleta e visível, envolve promoção de elétrons dos orbitais σ , π e n do estado normal para os estados de maior energia. Compostos que contêm elétrons não ligantes em átomos de O, N, S e halogênio são capazes de exibir absorções devidas a transições $n - \sigma^*$, enquanto que, sistemas contendo duplas ligações $\text{C} = \text{C}$, exigem absorções devidas às transições $\pi - \pi^*$.

Acredita-se que várias estruturas em conjugação sejam as responsáveis pela cor escura

das substâncias húmicas, principalmente estruturas quinóides (estrutura I e II) e grupos carbonila de cetonas conjugadas (estrutura III e IV), associadas poliméricamente.

Figura IV.6 - Estruturas em conjugação.

Os espectros de absorção dos ácidos húmico e fúlvico, na região do ultravioleta e visível, são pouco característicos, porque não apresentam regiões de absorção máxima ou mínima.

A razão entre as absorbâncias a 465 e 665 nm, referida como razão E_4/E_6 , de soluções aquosas dos ácidos húmicos e fúlvicos, tem sido amplamente usada para fins de caracterização. Enquanto, tem sido sugerido que a razão E_4/E_6 está relacionada com o grau de condensações em anéis aromáticos², conteúdo de carbono, e peso molecular das substâncias húmicas^{10,45}, são poucas as evidências experimentais rigorosas, disponíveis na literatura, para confirmar essas hipóteses.

Chen e colaboradores⁴⁶ estudaram todos estes parâmetros que parecem controlar a razão E_4/E_6 e incluíram entre estes a concentração da substância húmica, pH, volume e peso molecular da partícula, concentração de radical livre. Os autores concluíram que a razão E_4/E_6

e governada principalmente pelo volume e peso molecular da substância húmica. E como parâmetros secundários a relação existente entre a razão e o pH, o teor de O, C, CO₂H e acidez total que são funções do volume e peso da partícula. Chen e colaboradores⁴⁶ consideraram ainda os inúmeros estudos de degradação química⁴⁷ onde os produtos identificados contêm estruturas aromáticas, que não parecem ocorrer no material húmico como estruturas altamente condensadas. Outros trabalhos como^{48,49} que indicam o comportamento de polieletrólito sintético, linear e flexível para as substâncias húmicas e a ocorrência de significativa concentração de estruturas aromáticas individuais. Desta forma Chen e colaboradores⁴⁶ concluíram que há pouca evidência de uma relação entre a razão E_4/E_6 e a concentração de anéis aromáticos condensados nos materiais húmicos.

Por outro lado, os produtos de degradação química separados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, representam apenas uma pequena fração (na maioria dos casos cerca de 30% do material inicial) que se apresenta volátil para tais análises, por isto parece-nos questionáveis tais afirmações.

A razão E_4/E_6 é independente da concentração da substância húmica, na faixa de concentração de 100 a 500 mg de material húmico por litro de solução aquosa⁴⁶.

O melhor procedimento para se determinar a razão E_4/E_6 é dissolver de 2 a 4 mg da substância húmica purificada em 10,0ml de solução de NaHCO₃ 0,05N, a qual propicia um pH próximo a 8 para medidas de absorbância⁴⁶.

Para a medida foi utilizado o espectrofotômetro VARIAN pertencente ao IFQSC - USP. As soluções analisadas foram preparadas de tal forma que 0.6mg do material foi diluído em 2ml de solução de NaHCO₃ 0.05N, resultando num pH de $8,7 \pm 0,1$. Foi feita a varredura do espectro de ultravioleta e visível e a leitura de absorbâncias nos comprimentos de onda 465 nm e 665 nm.

V - RESULTADOS

Nosso trabalho baseou-se na caracterização de amostras de ácido húmico extraído de um latossolo roxo distrófico provenientes da Estação Experimental do IAPAR situada em Londrina - PR.

Como está discutido na tabela IV.1, as amostras estão especificadas por manejo, profundidade e rotação de cultura, sendo que as seis primeiras são de manejo convencional, de 7 a 12 plantio direto e as três últimas correspondem à mata virgem.

Tabela V.1 - *Rendimento porcentual de ácidos húmicos obtidos das amostras do latossolo roxo distrófico.*

Amostra	pH do Solo	Teor de Cinzas	Rendimento
1	5,34	10,64%	0,12%
2	5,27	12%	0,08%
3	5,06	11,5%	0,17%
4	5,45	13,1%	0,07%
5	5,26	10,1%	0,27%
6	5,22	5,75%	0,07%
7	5,54	8,4%	0,10%
8	5,36	2,9%	0,09%
9	5,53	8,0%	0,05%
10	5,47	14,2%	0,17%
11	5,01	12,4%	0,03%
12	5,12	10,15%	0,36%
13	5,19	9,8%	0,07%
14	4,78	10,11%	0,17%
15	4,53	14,3%	0,09%

Desta forma, quantificamos os radicais livres semiquinona das diferentes amostras de ácido húmico para a comparação entre os três tipos de manejo e analisamos os espectros à temperatura de nitrogênio dos complexos metálicos para três diferentes estágios de purificação (antes de passar na coluna de troca catiônica, ácido húmico purificado e tratado com Ácido Fluorídrico).

Outra experiência realizada foi a adição de Carbonato de Cálcio (CaCO_3) em uma turfa da região de Ribeirão Preto, para observar os efeitos em relação aos radicais livres semiquinona.

V.1 -RADICAIS LIVRES

Para quantificar os radicais livres registrou-se o espectro de RPE à temperatura ambiente em um campo central de 3400 Gauss com uma varredura de 100 Gauss e frequência em torno de 9,5GHz. O espectro observado, como mostra a figura V.1 para algumas amostras, consiste de uma única linha de absorção fina e simétrica. Como usamos o método do padrão secundário, aparece em nosso espectro uma linha larga com fase oposta ao sinal do radical que é o sinal do Rubi. Este está 180 graus fora de fase devido ao fato de estar colocado por baixo na cavidade de ressonância, como mostra a figura IV.4; sendo assim as linhas de campo da microonda estão em direção oposta àquelas que incidem na amostra de AH.

Os valores encontrados para a largura de linha e para a concentração de radicais estão mostrados na tabela V.2. Como esta é uma medida quantitativa, o que está mostrado é a media de várias medidas realizadas nas mesmas condições e o respectivo desvio padrão.

Figura V.1 - Espectro de RPE das amostras de AH mostrando o sinal dos radicais livres semiquinona. a) AH - amostra (5). b) AH - amostra (11)

Tabela V.2 - Nível de radicais livres semiquinona (em spins/gr de ácido húmico) para o latossolo roxo distrófico.

Amostra	Larg. de Linha(gauss)	Nº de Spins($\times 10^{14}$ spins/g)
1	$7,14 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,5$
2	--	---
3	--	---
4	--	---
5	$6,38 \pm 0,09$	$2,3 \pm 0,3$
6	$6,4 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,7$
7	$7,2 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,5$
8	$5,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3$
9	$7,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,5$
10	$6,8 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,6$
11	$5,7 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$
12	$7,2 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,5$
13	---	---
14	$6,3 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,6$
15	$4,5 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,8$

Como podemos ver a tabela está incompleta devido ao fato que para algumas amostras não foi possível obter o sinal dos radicais livres, provavelmente devido a interações com íons metálicos residuais presentes no ácido húmico (Fe, Mn, Cu, V e outros) e que interferem nas análises de RPE.

Como estamos trabalhando com muitos parâmetros diferentes, vamos separar a tabela para amostras com o mesmo tipo de manejo e mesma profundidade, sem levar em conta o tipo de cultura (tabela V.3)

Tabela V.3 - Nível de radicais livres para os diferentes tipos de manejo

Manejo	Profundidade 0-5 cm	Profundidade 5-10 cm	Profundidade 10-20 cm
Convencional	$3,7 \times 10^{14}$	$2,3 \times 10^{14}$	$5,0 \times 10^{14}$
Plantio direto	$4,75 \times 10^{14}$	$2,25 \times 10^{14}$	$4,3 \times 10^{14}$
Mata virgem	---	$3,2 \times 10^{14}$	$6,1 \times 10^{14}$

V.2 - RAZÃO E_4 / E_6

Um dos métodos propostos na literatura⁽¹⁾ para determinar o grau de humificação é através da razão E_4 / E_6 (absorbância em 465 nm / absorbância em 665 nm). Os espectros de ultravioleta e visível para as amostras de ácido húmico em solução de NaHCO_3 não apresentam bandas de absorção máximas ($\lambda_{\text{máx}}$) na região de 400 à 700 nm, tendo como característica a diminuição da densidade ótica com o aumento do comprimento de onda.

As medidas foram obtidas em $\text{pH } 8,7 \pm 0,1$ e os valores da razão E_4 / E_6 estão listados na tabela V.4.

Procedendo da mesma forma que a experiência anterior vamos separar a tabela por tipo manejo e profundidade. Para isso, vamos fazer a média dos valores encontrados para a mesma profundidade e com o mesmo tipo de manejo, mas diferentes rotações de culturas (tabela V.5).

Tabela V.4 - Medidas da razão E_4/E_6 de soluções de ácido húmico

Amostra	E_4/E_6
1	$6,0 \pm 0,6$
2	$4,6 \pm 0,4$
3	$5,6 \pm 0,5$
4	$4,4 \pm 0,8$
5	$6,9 \pm 0,8$
6	$5,9 \pm 0,1$
7	$4,9 \pm 0,9$
8	7 ± 1
9	$5,8 \pm 0,9$
10	$5,3 \pm 0,4$
11	$6,2 \pm 0,5$
12	$6,4 \pm 0,4$
13	$6,7 \pm 0,5$
14	$5,9 \pm 0,6$
15	$5,4 \pm 0,5$

Tabela V.5 - Razão E_4/E_6 para diferentes manejos

Manejo	Profundidade 0-5 cm	Profundidade 5-10 cm	Profundidade 10-20 cm
Convencional	5,18	5,76	5,76
Plantio direto	5,11	6,73	6,14
Mata Virgem	6,67	5,92	5,37

V.3 ANÁLISE ELEMENTAR

A partir dos dados da análise elementar podemos encontrar a razão entre a concentração de Carbono e de nitrogênio(C/N) dada em porcentagem e as razões atômicas O:C e H:C.

Na tabela V.6 estão apresentadas as porcentagens dos elementos químicos, assim como o valor obtido para a relação C/N e as razões atômicas O:C e H:C.

Tabela V.6-Análise elementar das amostras de ácido húmico.

Amostra	%C	%H	%N	%O	C/N(%)	O:C	H:C
1	40,11	5,83	4,50	49,56	8,91	0,93	1,744
2	30,94	4,84	4,32	59,9	7,16	1,45	1,877
3	29,13	5,04	3,16	62,67	9,22	1,61	2,076
4	27,62	4,44	2,90	65,04	9,52	1,77	1,929
5	25,93	5,22	3,06	65,79	8,57	1,90	2,416
6	35,99	5,89	3,95	54,17	9,11	1,13	1,964
7	36,47	5,75	3,80	53,98	9,60	1,11	1,892
8	37,67	5,53	4,56	52,24	8,26	1,04	1,762
9	38,66	5,55	4,91	50,88	7,87	0,99	1,723
10	43,45	6,04	4,66	45,85	9,32	0,79	1,668
11	42,07	6,18	5,33	46,42	7,89	0,83	1,763
12	38,08	5,51	4,41	52,00	8,63	1,02	1,736
13	35,93	5,33	5,55	53,19	6,47	1,11	1,780
14	42,97	6,49	6,25	44,29	6,88	0,77	1,812
15	42,57	6,50	5,94	44,99	7,16	0,79	1,832

Para facilitar esta análise vamos dividir a tabela, sem levar em conta a rotação de culturas, nas tabelas V.7a ,V.7b, V.8a e V.8b

Tabela V.7a - Porcentagem de C e N para os diferentes tipos de manejo.

Profundidade(cm)	%C			%N		
	0-5	5-10	10-20	0-5	5-10	10-20
Manejo conv.	33,86	28,44	32,56	3,7	3,69	3,56
Plant, direto	39,96	39,87	38,37	4,23	4,95	4,66
Mata Virgem	35,93	42,97	42,57	5,55	6,25	5,94

Tabela V.7b - Porcentagem de H e O para os diferentes tipos de manejo.

Profundidade(cm)	%H			%O		
	0-5	5-10	10-20	0-5	5-10	10-20
Manejo conv.	5,13	5,03	5,46	57,3	62,84	58,42
Plant, direto	5,89	5,86	5,53	49,92	49,33	51,44
Mata Virgem	5,33	6,49	6,50	53,19	44,29	44,99

Tabela V.8a- Relação C/N e razão atômica O:C para cada tipo de manejo .

	C/N			O:C		
Profundidade(cm)	0-5	5-10	10-20	0-5	5-10	10-20
Manejo conv.	9,25	7,86	9,16	1,35	1,66	1,37
Plant, direto	9,46	8,08	8,25	0,95	0,94	1,01
Mata Virgem	6,47	6,88	7,16	1,11	0,77	0,79

Tabela V.8b- Razão atômica H:C para diferentes manejos.

	H:C		
Profundidade(cm)	0-5	5-10	10-20
Manejo conv.	1,84	2,15	2,02
Plant, direto	1,78	1,76	1,73
Mata Virgem	1,78	1,81	1,83

V.4-DIFERENTES ESTÁGIOS DE PURIFICAÇÃO

A tabela V.9 mostra os valores encontrados para a concentração de radicais livres semiquinona em três estágios de purificação diferentes.

A primeira coluna refere-se a amostras que ainda não passaram pela coluna de troca catiônica. Notamos que está incompleta, pois como as amostras de ácido húmico ainda não passaram pelo processo de purificação total, o sinal dos metais presentes nas amostras analisadas estão superpostos ao sinal do radical livre.

Na segunda coluna encontram-se as amostras que completaram o esquema da purificação mostrado na figura IV.1. Estes valores são os mesmos mostrados na tabela V.2; só foram colocados novamente aqui para facilitar a comparação.

Na terceira coluna estão listados os valores obtidos para os radicais livres nas amostras de AH após serem tratadas com ácido fluorídrico. O tratamento com HF foi realizado pelo Grupo de Radioquímica do IFQSC da USP com o objetivo de retirar os íons metálicos residuais presentes nas amostras purificadas. A coluna encontra-se incompleta, pois algumas amostras apresentam um sinal muito pequeno que não foi possível medir e outras não havia quantidade suficiente de material para fazer a medida.

V.5 - MEDIDA COM CARBONATO DE CÁLCIO

Como a adição de calcário nos solos é uma prática muito comum entre os produtores com o intuito de diminuir a acidez, dedicamos uma parte de nosso trabalho para observar quais os efeitos da adição de CaCO_3 em uma turfa.

A amostra, que possui um sinal do radical livre bastante intenso, foi diluída e separada em duas alíquotas. Uma delas ficou como amostra testemunha e na outra adicionamos Carbonato de Cálcio.

Tabela V.9- Concentração de radicais livres para os três estágios de purificação

Amostra	s/ purificação		Purificada		Tratada com HF	
	$\Delta H_{pp}(G)$	$n(10^{14}spins/g)$	$\Delta H_{pp}(G)$	$n(10^{14}spins/g)$	$\Delta H_{pp}(G)$	$n(10^{14}spins/g)$
1	----	----	$7,1 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,5$	-----	-----
2	$5,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	----	-----	$5,2 \pm 0,4$	$0,78 \pm 0,07$
3	-----	-----	-----	-----	$4,6 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,1$
4	$4,94 \pm 0,07$	$4,9 \pm 0,6$	-----	----	$5,2 \pm 0,2$	$0,48 \pm 0,05$
5	-----	-----	$6,38 \pm 0,09$	$2,3 \pm 0,3$	----	----
6	$5,81 \pm 0,06$	$0,178 \pm 0,001$	$6,4 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,7$	5,25	0,13
7	4,75	$12,19 \pm 0,05$	$7,2 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,5$	5,0	0,52
8	$5,4 \pm 0,1$	$0,192 \pm 0,007$	$5,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3$	5,5	0,14
9	-----	-----	$7,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,5$	5,0	0,52
10	5,0	$3,5 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,6$	5,0	0,81
11	5,0	$10,8 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$	-----	----
12	-----	-----	$7,2 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,7$
13	$6,06 \pm 0,06$	$10,5 \pm 0,4$	-----	-----	6,5	2,51
14	-----	-----	$6,3 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,6$	----	----
15	-----	-----	$4,5 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,8$	-----	----

Acompanhamos a evolução do pH e da concentração dos radicais livres durante 45 dias.

O resultado obtido está mostrado na figura V.2, onde plotamos a medida do pH com relação ao tempo, tanto para a amostra testemunha como para a com $CaCO_3$.

Figura V.2- Gráfico do pH x tempo para a amostra testemunha e para a amostra com CaCO_3 .

Na figura V.3 encontra-se o gráfico da concentração normalizada (equação V.1) de radicais livres versus o pH para a amostra testemunha. A concentração é dada por:

$$C = \frac{I(\Delta H_{pp})^2}{G_m H_m} \quad (\text{V.1})$$

onde I é a intensidade do sinal em cm, ΔH_{pp} é a largura de linha, G_m é o ganho e H_m é a amplitude de modulação.

Fazendo a regressão linear para esses dados, encontramos um grau de correlação (r) igual a $0,9173 \pm 0,0003$.

O mesmo gráfico para a amostra em que adicionamos CaCO_3 está mostrado na figura

Figura V.3- Gráfico do nível de radicais livres x pH para a amostra testemunha

Figura V.4 - Gráfico do nível de radicais livres x pH para a amostra com CaCO₃

V.4. Dos quatro pontos alinhados encontramos $r = (0,8273 \pm 0,0005)$.

Entretanto, o nosso objetivo é investigar o que acontece com o nível de radical livre quando esta prática é empregada.

Sendo assim, plotamos a concentração para as duas amostras em relação ao tempo, como é mostrado na figura V.5.

Figura V.5- Gráfico da concentração de radicais livres x tempo para a amostra testemunha e para a amostra com CaCO_3 .

V.6 - COMPLEXOS COM METAIS DE TRANSIÇÃO

Dando continuidade ao nosso trabalho medimos o espectro total das amostras de ácido húmico à temperatura de nitrogênio para os três estágios de purificação.

Um espectro típico obtido para as amostras de ácido húmico purificado está mostrado na figura V.6. Este consiste de dois picos de absorção em $g = 4.3$ e em $g = 2.0$. O valor

Figura V.6- Espectro total da amostra (2) purificada à temperatura de 77K, para $P=20\text{mW}$.

de $g = 4,3$ é devido ao Fe (III) com simetria rômica.

A figura V.7 mostra um espectro típico de amostra de ácido húmico após ser tratada com ácido fluorídrico. Apresenta absorções em:

- $g = 4,3$, devido ao Fe (III) com simetria rômica
- $g = 2,003$ que é um parâmetro característico ao radical livre semiquinona
- $g_{//} = 2,245$ ($A_{//} = 175$ Gauss) e $g_{\perp} = 2,038$ devido ao complexo de Cu (II)

Para as amostras sem passar pela coluna de troca catiônica obtivemos três tipos de espectro diferentes.

A maioria deles encontramos o mesmo tipo de sinal das amostras purificadas com uma banda larga em $g = 2,0$ e um pico intenso de absorção em $g = 4,3$ (devido ao Fe).

As amostras 1 (figura V.8), 9 e 15 possuem espectros semelhantes pois foram encontrados os mesmos parâmetros:

- $g_{//} = 2,265$ e $A_{//} = 170G$ devido ao complexo de Cu.
- $g_{//} = 1,936$ e $A_{//} = 168$ Gauss , $g_{\perp} = 1,989$ e $A_{\perp} = 61G$, devido ao íon Vanadil(VO^{2+})⁽³⁵⁾
- $g = 4,3$ proveniente da presença de Fe (III).

A figura V.9 mostra o espectro da amostra 2 que é semelhante ao espectro da amostra 6 , tendo os seguintes parâmetros espectroscópicos:

- $g_{//} = 2,265$ e $A_{//} = 170G$ devido ao complexo de Cu.
- $g = 4,3$ devido a presença de Fe (III)
- $g_{//} = 1,935$ ($A_{//} = 168$ Gauss) e $g_{\perp} = 1,982$ devido ao íon Vanadil (VO^{2+}).
- $g = 2,003$ e $A = 90G$ que são parâmetros característicos do Mn^{2+}

Com o objetivo de simular os espectros resultantes para obter os parâmetros

Figura V.7-Espectro da amostra (2) após ser tratada com ácido fluorídrico à temperatura de 77K e $P=20\text{mW}$.

$$H_0 = 3300\text{G}$$

$$\Delta H = 2.0\text{KG}$$

$$\nu = 9.140\text{GHz}$$

Figura V.8- Espectro da amostra (1) sem passas pela coluna de troca catiônica, em temperatura de 77K.

espectroscópicos e determinar com mais segurança as espécies presentes utilizamos um recurso em nossas medidas. Registramos os espectros para a potência de 20mW e para a potência de 160mW nas mesmas condições, pois os elementos Cobre e Vanádio saturam a

$$H_0 = 2600\text{G}$$

$$\Delta H = 4\text{KG}$$

$$\nu = 9.154\text{GHz}$$

Figura V.9- Espectro da amostra (2) sem purificação.

potências diferentes, sendo que a do último é bem menor com relação à do cobre. Desta forma pudemos fazer a subtração espectral identificando facilmente para a amostra 1 e 15 o

Figura V.10 - Espectro da amostra (2) sem purificação , em torno de $g=2,0$.As componentes paralelas e perpendiculares são devido ao vanádio, $g=2,003$ é do Mn.

espectro do íon Vanádio(figura V.11).

Figura V.11- Espectro do Vanádio obtido a partir da subtração espectral da amostra (1), para potências de 0,2 e 160 mW.

VI - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

VI.1 - RADICAIS LIVRES

Observa-se pela tabela V.1 que o pH dos solos dos quais foram extraídos os ácidos húmicos analisados é em torno de 5.0, sendo portanto um solo ácido.

Como podemos observar pela tabela V.2, a mata virgem contém maior número de radicais livres semiquinona do que as áreas cultivadas. Entretanto, de acordo com a literatura⁽¹⁾, um número maior de radicais livres implica em um maior grau de humificação do ácido húmico. Em nosso estudo, observamos que o cultivo dos solos nos dois diferentes manejos, levou a uma redução no grau de humificação dos ácidos húmicos.

Pela tabela V.3, notamos que a área de floresta nativa possui uma quantidade de radicais livres que aumenta diretamente com a profundidade. Na literatura⁽²⁹⁾ encontramos resultados, principalmente com solos de florestas, mostrando que há um aumento do grau de humificação com a profundidade, o que está coerente com os nossos resultados. Para uma liteira propõe-se que o aumento da concentração de radicais livres é devido à um avanço no estágio de humificação com a profundidade. Neste caso o material que vai ficando mais humificado tende a se deslocar para as camadas mais abaixo, ficando na superfície os resíduos de plantas mais novos que estão chegando ao solo (por exemplo folhas que caem) que têm pouca humificação.

Entretanto para as áreas cultivadas esta relação com a profundidade não ocorre. Deve-se ao fato de que pelo menos no manejo convencional há um revolvimento das camadas do solo com implementos agrícolas e isso poderia alterar a distribuição dos ácidos húmicos mais humificados não se observando a mesma tendência para os solos de áreas de florestas. Para o plantio direto, no entanto, o revolvimento não ocorre, mas não foi possível saber se antes de ser iniciada a experiência com o plantio direto, houve manejo convencional.

Outro fator que pode influenciar as áreas cultivadas com os diferentes manejos quando comparado com uma área de floresta é a ação dos fatores climáticos entre eles estão a quantidade de umidade e efeitos dos ciclos de umedecimento e secagem do solo, acesso do ar, pH, temperatura, luz solar na camada superficial e a atividade microbiana que atua como sintetizadora de material para humificação ou com características mais próximas das substâncias húmicas.

VI.2 - RAZÃO E_4 / E_6

A razão E_4 / E_6 é um método muito usado pelos cientistas que trabalham com solos para identificar o grau de humificação das substâncias húmicas, pois não depende da concentração mas varia para amostras obtidas de diferentes tipos de solos⁽¹⁾.

Observando a tabela V.5 notamos que a razão E_4 / E_6 para a mata virgem é maior na camada superficial, diminuindo com a profundidade, o que implica que o grau de humificação das substâncias húmicas aumenta com a profundidade.

Para a camada de 5-10 cm encontramos uma razão E_4 / E_6 maior do que para as outras profundidades o que implica em um grau menor de humificação.

Para avaliar a coerência entre as experiências fizemos um gráfico da razão E_4 / E_6 x nível de radicais livres (como está mostrado na figura VI.1). O grau de correlação linear (r)

obtido foi de 0.8 ± 0.4 que é razoável considerando que nossos dados são de amostras obtidas de solos em condições de campo.

Figura VI.1- Gráfico da razão E_4/E_6 versus a concentração de radicais livres.

VI.3 - ANÁLISE ELEMENTAR

Comparando os resultados para os diferentes manejos e mesma profundidade encontramos:

- para a profundidade de 0-5 cm, observa-se um menor conteúdo de C, H e N para áreas de manejo convencional, enquanto a maior porcentagem de C e H encontra-se em áreas de plantio direto e a de N está na mata virgem. A porcentagem de O é maior para o manejo convencional e menor para o plantio direto. A razão C/N é menor na mata virgem e a razão

atômica O:C é maior para o manejo convencional e menor para o plantio direto, enquanto que a razão atômica H:C é maior para o manejo convencional e praticamente igual para o plantio direto e mata virgem.

- para as profundidades de 5-10 cm e 10-20 cm encontramos a maior porcentagem de C, H e N na área de floresta nativa enquanto a menor quantidade destes elementos estão em áreas de manejo convencional. A porcentagem de O segue a ordem inversa. A razão C/N e a razão atômica O:C são menores para a mata virgem sendo que a última apresenta valores maiores para as áreas de manejo convencional. A razão atômica H:C possui valores maiores para as áreas de manejo convencional e menores para áreas de plantio direto.

Como a razão H:C indica o grau de aromaticidade, o aumento desta para valores acima de um implica em uma diminuição da aromaticidade nas amostras⁽²⁸⁾.

Sendo assim, as amostras de AH das áreas cultivadas com o manejo convencional possuem maior quantidade de estruturas alifáticas do que as outras áreas caracterizadas.

A razão atômica O:C permite estimar a abundância de grupos funcionais que contêm oxigênio e portanto é um indicativo do grau de oxidação⁽²⁸⁾.

Quanto maior o grau de oxidação⁽²³⁾ maior a potencialidade de reação com o meio ambiente, isto é, a formação de sais, complexos, quelatos, interação com argilas, etc.

Para identificar melhor a influência das razões atômicas H:C e O:C traçamos um gráfico de H:C versus O:C (figura VI.2). Encontramos um índice de correlação igual a 0.8 ± 0.1 que indica que com a diminuição da aromaticidade há concomitantemente um aumento da oxidação.

Esse resultado é um indicativo da degradação dos ácidos húmicos que ocorre principalmente no manejo convencional.

Pela tabela V.8(a) vemos que a razão C/N é maior na superfície do que para as outras

profundidades nas amostras de manejo convencional e plantio direto. É interessante observar que a camada de 5-10 cm tem o valor da razão menor que as outras profundidades. Para a mata virgem esta relação aumenta com a profundidade.

Como a razão C/N indica o grau de incorporação de nitrogênio na estrutura húmica,

Figura VI.2- Gráfico da razão atômica H:C versus O:C.

sendo esta mais importante para solos com alta atividade biológica⁽²⁸⁾, podemos concluir que as áreas de plantio direto e manejo convencional têm atividade biológica mais intensa na superfície.

VI.4 - DIFERENTES ESTÁGIOS DE PURIFICAÇÃO

Analisando a tabela V.9 não encontramos nenhuma relação entre os valores obtidos para as amostras que chamamos de sem purificar com as purificadas.

Entretanto, em relação as tratadas com Ácido Fluorídrico nota-se uma clara tendência de diminuição do nível de radicais livres. Com este resultado podemos concluir que devemos tomar alguns cuidados quando é realizado o tratamento com HF pois este além de retirar metais da amostra de AH, destrói também radicais livres de uma quantidade que varia de uma amostra para outra.

VI.5 - MEDIDA COM CaCO_3

Observando a figura 3 notamos que o pH da amostra misturada com CaCO_3 cresce rapidamente com o tempo, variando de 3.33 (medido no dia da mistura) à 5.34 (45 dias após), enquanto que o da amostra testemunha fica praticamente constante. Entretanto o pH não aumenta indefinidamente, mas em torno do décimo quinto dia começa a saturar em um valor próximo de 6,0.

Pela figura V.3 notamos que a concentração tem uma tendência linear com o aumento do pH para a amostra testemunha. Entretanto para a amostra diluída com CaCO_3 o pH tem uma tendência linear até 6,0, ponto no qual se estabiliza, enquanto que a concentração de radicais livres continua crescendo. Analisando a figura V.5 notamos que a concentração de radicais livres para a amostra misturada aumenta nos primeiros dias logo após a adição de CaCO_3 , mas em torno do décimo quinto dia começa a diminuir. Para a amostra testemunha a tendência é de aumentar o nível dos radicais livres com o passar do tempo.

Sendo assim, podemos concluir que para uma turfa submetida a calagem com o passar do tempo há uma redução na concentração de radicais livres o que implica em uma

diminuição do grau de humificação.

Novos experimentos com diferentes concentrações de CaCO_3 deverão ser feitos para confirmar esses interessantes e preocupantes dados preliminares.

VI.6 - COMPLEXOS COM ÍONS DE METAL DE TRANSIÇÃO

Observamos que para todos os espectros, independentemente do estágio de purificação, encontramos $g = 4.3$. Este corresponde ao Fe (III), magneticamente diluído na porção orgânica com simetria rômica⁽²⁶⁾.

Tanto para as amostras sem purificar como as tratadas com ácido fluorídrico encontramos complexo de Cu (II) com simetria axial, com $g_{\parallel} = 2.265$ e $A_{\parallel} = 175$ Gauss. Comparando com as características espectrais obtidas por Senesi et al⁽¹⁹⁾ para o ácido fúlvico encontramos que o Cu está coordenado com quatro átomos de Oxigênio (proposição assumida devido à ausência de interações super-hiperfina).

As outras linhas que estão presentes na figura V.9 são devido ao complexo do íon Vanadil ($g=1.98$ $I=7/2$)^(35, 37). Encontramos os parâmetros espectroscópicos considerando simetria axial, embora não tenhamos feito simulação espectral para determinação mais precisa dos mesmos.

A presença de seis linhas superpostas as linhas de Vanádio e Cu^{2+} são devido ao acoplamento dos elétrons desemparelhados com os núcleos de ^{55}Mn ($I = 5/2$) cujos parâmetros espectroscópicos característicos são $g = 2,00$ e $A = 95$ Gauss⁽¹⁵⁾.

Um resultado surpreendente foi o fato das amostras purificadas apresentarem uma linha larga em torno de $g = 2,0$ e não apresentar as linhas dos complexos com íons metálicos, já que nas amostras sem purificar, isto é, sem passar pela coluna de troca catiônica e portanto com mais metais, apresentaram estas linhas.

Encontramos um trabalho⁽²⁶⁾ no qual o aumento da intensidade do sinal e a diminuição da largura de linha na região de $g = 2,0$ está diretamente relacionada com a diminuição do pH. Como foi observado pelo efeito Mossbauer essa mudança ocorre devido à produção de Fe(II). Este não pode contribuir diretamente nesta ressonância pois a separação entre seus níveis é muito grande o que exigiria um campo magnético muito alto, entretanto pode estar ocorrendo interações de troca com o Fe (III) que são provavelmente ferromagnéticos. Esta interação de troca ferromagnética poderia levar ao aumento da amplitude e estreitamento das linhas. Portanto, pode ter ocorrido que as amostras de AH ao passarem pela coluna de troca catiônica sofreram uma diminuição do pH, o que provocou um aumento da intensidade da linha em torno de $g=2$, superposto ao sinal dos metais.

Se esta interpretação estiver correta parte do Fe (II) e Fe (III) estão interagindo magneticamente, formando aglomerados de ferro envolvendo pontes de óxidos ou hidróxidos entre os íons.

VII - CONCLUSÕES

O objetivo do nosso trabalho foi analisar amostras de ácido húmico extraído de um latossolo roxo distrófico provenientes da Estação Experimental do IAPAR, situado em Londrina - PR, utilizando análise elementar e técnicas espectroscópicas como RPE e absorção eletrônica.

As áreas foram cultivadas durante um período de 11 anos usando dois diferentes tipos de manejo que são o convencional e o plantio direto. Para comparação usamos amostras de mata virgem. Para todas as áreas foram caracterizadas amostras em três profundidades diferentes.

A concentração de radicais livres semiquinona nos ácidos húmicos é em torno de 10^{14} spins/g que concorda com os resultados obtidos para os ácidos húmicos extraídos de solos da Ilha de Cananéia⁽²⁵⁾. Esse baixo valor para a concentração de radicais livres comparado com os resultados obtidos pela literatura, em torno de 10^{17} spins/g, ocorre devido a baixa humificação em nossas amostras.

O resultado obtido pela técnica de RPE e pela razão E_4 / E_6 foram compatíveis.

O maior grau de humificação do ácido húmico foi encontrado para as áreas de floresta nativa. Para esta área foi possível observar o aumento do grau de humificação com o aumento da profundidade, resultado não obtido para as áreas cultivadas. Para as últimas pode-se entender o resultado para o manejo convencional pois neste há o revolvimento das camadas

do solo com implementos agrícolas o que pode alterar a distribuição dos ácidos húmicos mais humificados.

Através da análise elementar foi possível concluir, pela porcentagem encontrada de cada elemento e pelas razões atômicas H:C e O:C, que o ácido húmico para o manejo convencional sofreu maior degradação, enquanto a menor foi encontrada para a mata virgem.

Assim comparando os manejos convencional e o plantio direto, podemos concluir que o manejo convencional gerou maiores alterações nos compostos húmicos presente na matéria orgânica dos solos estudados.

O espectro total obtido permitiu uma clara identificação de diferentes complexos de micronutrientes com substâncias húmicas.

Identificamos em todas as amostras, independentemente do estágio de purificação, a presença do íon de Fe (III), de spin 5/2 com simetria rômica.

Para as amostras tratadas com ácido fluorídrico foi encontrado também o íon de Cu^{2+} coordenado com quatro átomos de Oxigênio.

Para algumas amostras de AH sem passar na coluna de troca catiônica encontramos os íons Vanádio na forma VO^{2+} e Mn^{2+} e Cu^{+2} .

Entretanto o espectro das amostras purificadas mostraram apenas uma linha larga em torno de $g = 2,0$. O estreitamento da linha e o aumento da sua intensidade nesta região pode ser provocada pela produção de Fe(II), que ocorre devido a uma provável diminuição do pH das amostras de ácido húmico ao passar pela coluna de troca catiônica. O Fe(II) não pode contribuir diretamente na ressonância, entretanto pode estar ocorrendo interações de troca com o íon Fe(III).

As medidas das concentrações de radicais livres para as amostras em diferentes estágios de purificação mostraram alterações significativas . Esse resultado é importante e

deve ser cuidadosamente interpretado através de novos experimentos sistemáticos, levando em conta o controle preciso do pH, força iônica e concentração da solução em cada estágio.

Outra experiência realizada foi com uma turfa que foi diluída em água e adicionado CaCO_3 , com o objetivo de verificar os efeitos provocados pela calagem, sendo esta prática muito comum para diminuir a acidez do solo. Como já era esperado, a adição de Carbonato de Cálcio provocou uma elevação do pH, mas com o passar do tempo a quantidade de radicais, e portanto o grau de humificação, diminuiu.

Este trabalho é um dos primeiros realizados no Brasil e mesmo a nível internacional não há muitos, apesar que estes não podem ser extrapolados para nossos solos e condições climáticas.

Dando continuidade a esse trabalho estão sendo purificadas outras amostras do solo da Estação Experimental do IAPAR pelo grupo de Radioquímica e Química Ambiental do IFQSC - USP com o objetivo de extrair maiores quantidades de ácido húmico e ácido fúlvico. Medidas de Ressonância Magnética Nuclear e de Infravermelho serão realizadas para verificar mudanças estruturais nas substâncias húmicas nos diferentes manejos e identificar grupos funcionais presentes nos ácidos húmicos.

Outros estudos têm sido realizado para um solo de Pindorama/SP onde estão sendo medidas as concentrações e o espectro total de ácido húmico para todos os estágios de purificação.

VIII - REFERÊNCIAS

- (1) SCHNITZER, M & KHAN, S.U. Soil Organic Matter, Elsevier Scientific Publishing C.O., Amsterdam, The Netherlands (1978).
- (2) KONONOVA, M. M. Soil Organic Matter. Oxford Pergamon (1966).
- (3) SENESI, N; BOCIAN, D. F; SPOSITO, G. Soil Science Soc. Amer. J., 49, 114-119(1985)
- (4) RIFFALDI, R. & SCHNITZER, M. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 36 , 301-305.
- (5) STEVENSON, F. J.(1982). Humus Chemistry. New York, John Wiley & Sons, cap.8,195-219 (1972).
- (6) SORENSEN, H. J. Gen. Microb., 27, 21 (1962).
- (7) DORMAAR, J. F.(1979). Can. J. Soil Sci., 59 , 27(1979).
- (8) FLAIG,W. Suomen Kem., 33,229(1960).
- (9) STEVENSON, F. J. Bioscience, 22 , 643(1972).
- (10) SCHNITZER, M. & KHAN, S. V. Humic Substances in the Environmet., New York, Marcel Decker Inc., 327(1972).
- (11) MAXIMOV, O. B.; SHVETS, T. V. & EKIV, Yu. N.Geoderma, 19 , 63(1977).
- (12) TOLEDO, A. P. P. & JUSSARA, C.L. Ciência e Cultura, 37 , 7(1985).
- (13) STEVENSON, F. J. Humus Chemistry. New York, John Wiley & Sons, cap. 2,36-47 (1982).

-
- (14) GHOUDRY, G. G., The Handbook of Environmental Chemistry. Ed. by O. Hutzinger, vol.1, Part C. p.1-24
- (15) KNOWLES, P.F. - "Magnétic Resonance of Biomolecules", John Wiley & Sons (1976)
- (16) PAKE, G.E. and ESTLE, T.L- "The Physical Principles of Eletron Paramagnetic Resonance", W.A Benjamin, Inc. (1973).
- (17) ABRAGAM, A. AND BLEANEY, B.- "Eletron Paramagnetic Resonance", Clarendon Press-Oxford (1970).
- (18) CALDERONI, G. & SCHNITZER, M. Geochim. Cosmochim. Acta, 48 , 2045 (1984).
- (19) SENESI, N.; BOCIAN, D. F. & SPOSITO, G. - Soil Sci. Soc. Am. J., 49 , 114-9 (1985).
- (20) SINGER, L. S. J. Appl. Physiol. 30 , 1463 (1959).
- (21) ROTH, C. H.; WILCZYNSKI, W. & CASTRO FILHO, C. VIII Congresso Brasileiro e Encontro Nacional de Pesquisa sobre Conservação do Solo, pg.66 (1990).
- (22) CALDERONI, G. & SCHNITZER, M.. Geochim. Cosmochim. Acta, 48 , 2045 (1990).
- (23) GARCÉS PÉREZ, N.; FERNÁNDES PÉREZ, L. Ciencias de La agricultura, 39 , 113-121 (1990).
- (24) HALBACH, K. (1969). Physical Review, 119 , pg 1230-1233 (1969)
- (25) MARTIN NETO, L.; NASCIMENTO, O.; TALAMONI, J.; POPPI, N. Soil Science, 151 , 369-376 (1991).
- (26) GOODMAN, B. A.; CHESHIRE, M. V. The Science of the Total Environment, 62 , 229 - 240 (1987).

- (28) BRAVARD, S.; RIGHI, D. *Geoderma*, 48, 151-162(1991).
- (29) TAM, S.; SPOSITO, G.; SENESI, N. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 55, 1320-1325 (1991)
- (30) ROSELL, R. A., ANDRIULO, A. E., SCHNITZER, M., CHESPO, M. B. & MIGLIERINA, A. M. *The Science of the Total Environment*, 81/82, 391-400 (1989).
- (31) ANDRIULO, A. E., ROSELL, R. A. & CRESPO, M. B., *The Science of the total Environment*, 62, 453-456(1987).
- (32) SCHEFFER, F. AND WELTE, E., *Z. Pflanzenernähr. Düng Bondek.*, 48, 250-263(1950).
- (33) WELTE, E., *Z. Pflanzenernähr. Düng Bondek.*, 56, 105-139(1952).
- (34) POPPI, N. R., *Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos*(1988).
- (35) LAKATOS, B.; TIBAI, T. & MEISEL, J., *Geoderma*, 19, 319-338(1977).
- (36) SWARTZ, H. M.; BOLTON, J. R.; BORG, D. C., *Biological Applications of electron spin resonance*, Wiley-interscience, John Wiley & Sons, Inc.(1972).
- (37) RAGHUNATHAN, P. and DAS, B. B., *Chem. Phys. Lett.*, 160, 627(1989).
- (38) OGNER, G. & SCHNITZER, M., *Can. J. Chem.*, 49, 1053 (1971)
- (39) REX, W., *Nature*, 188, 1185 (1960)
- (40) STEELINK, G. & TOLLIM, G. "Free Radicals in Soil". In: McLAREN, A. D. & PETERSEN, G. H., *Soil Biochemistry*. New York, Marcel Dekker, 147-169 (1967)
- (41) SENESI, N. & SCHNITZER, M., *Soil Sci.*, 123, 224 (1977)
- (42) STEENK, C., *Geochim. Cosmoch. Acta*, 28, 1615 (1964)
- (43) SENESI, N.; CHEN, Y. & SCHNITZER, M., *Soil Biol. Biochem.*, 9, 37 (1977)

-
- (44) SCHNITZER, M.; WRIGHT, J. R. & DESJARDIN, J. G. Can. J. Soil Sci., 38, 49 (1958)
- (45) GRIFFITH, S. M. & SCHNITZER, M. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 39, 861 (1975)
- (46) CHEN, Y.; SENESI, N. & SCHNITZER, M. Soil Sci. Soc. Am. J., 41 (2), 352 (1977)
- (47) NRIAGU, J. O. Environmental Biogeochemistry. Mich, Ann Arbor Science Publishers Inc., 89 - 107 (1976)
- (48) CHEN, Y. & SCHNITZER, M. Soil Sci. Soc. Am. J., 40, 866 (1976)
- (49) LINDLECK, M. R. & YOG, J. L. , Soil Sci., 101, 366 (1966)